

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش -الجزائر

ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH-ALGER

## *Thèse*

*En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences agronomiques*

*Option: Production et Amélioration végétales*

## *Thème*

---

*Évaluation et caractérisation de la symbiose niébé/rhizobia à forte efficience  
d'utilisation du phosphore (EUP) pour la fixation symbiotique de l'azote sous  
déficiency en P*

---

*Par: M<sup>me</sup> BENLAHRECH Samia*

*Membres de jury*

*Président : M<sup>me</sup> LAOUAR M. (MCA à l'ENSA)*

*Directeur de thèse : M. OUNANE S.M. (Professeur à l'ENSA)*

*Examineurs : M<sup>me</sup> ALKAMA N. (MCA à l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou)*

*M. AMIALI M. (Professeur à l'ENSA)*

## **Remerciements**

*Ce travail est le fruit d'une collaboration scientifique entre le laboratoire AIPV à l'ENSA El Harrach-Alger et le laboratoire de l'UMR Eco&Sol INRA-Montpellier. C'est avec un grand plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

*J'exprime tout d'abord ma reconnaissance et mes vifs remerciements à Monsieur **OUNANE S.M.**, Professeur à l'ENSA d'avoir accepté de m'encadrer pour la deuxième fois et de parrainer sans réserve ce travail. Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude.*

*J'exprime aussi mes remerciements à Monsieur **DREVON J.J.** directeur de recherche à l'INRA de Montpellier, d'avoir accepté de me co-diriger, pour son accueil, sa disponibilité, son intérêt pour ce travail et pour ses nombreux conseils avisés.*

*J'exprime aussi mes remerciements à Madame **PLASSARD C.** directrice de recherche à l'INRA de Montpellier, pour l'intérêt qu'elle a manifesté dans ce travail.*

*J'exprime mon grand respect et mes remerciements à :*

<i>M<sup>me</sup></i>	<i>LAOUAR M.</i>	<i>d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.</i>
<i>M<sup>me</sup></i>	<i>ALKAMA N.</i>	<i>d'avoir accepté d'examiner mon travail.</i>
<i>M.</i>	<i>AMIALI M.</i>	<i>d'avoir accepté d'examiner mon travail.</i>

*Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel d'Eco&Sol : Cathy, Carlos, Didier B., Philippe D, Philippe B., Agnes, Didier A., J.M.S, Dam's, Anne-Laure, Laurie et Josiane pour leurs contributions ainsi que pour leurs précieux conseils.*

*Mes remerciements s'adressent également à Imane, Najat, Amine, Sushy, Houcine-Fouad, Soum, Laarbi, Aicha, Faty, Momo, Chemani, Slimani, Hadjer, Mus, Yacine, Ghiles, Fella, Djahida et Ismahane.*

## ***Dédicace***

*À la mémoire de mes grands parents*

*« Que Dieu les bénisse et les accueille dans son vaste paradis »*

*À mes parents, pour leur soutien et leurs encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de ma scolarité ;*

*À mon mari ;*

*À tata Kheira ;*

*À mes frères et sœurs ;*

*À toute ma famille ;*

*À tous mes amis.*

## TABLES DES MATIERES

---

<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>E</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>F</b>
<b>LISTE DES ABREVIATION</b> .....	<b>I</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I: Synthèse bibliographique</b> .....	<b>4</b>
I. Partenaires de la symbiose rhizobia-niébé.....	4
I.1. Le macrosymbiote <i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp.) .....	4
I.1.1. Taxonomie et origine .....	4
I.1.2. Morphologie et description du niébé .....	5
I.1.3. Exigences climatiques et édaphiques du niébé .....	6
I.1.4. Intérêts économiques et valeurs alimentaires .....	6
I.1.5. La culture du niébé en Algérie .....	7
I.1.6. Les contraintes de la culture du niébé.....	7
I.2. Le microsymbiote .....	7
I.2.1. Diversité des rhizobia.....	7
I.2.2. Processus de la nodulation.....	8
I.2.3. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique .....	10
I.3. Le phosphore (P).....	11
I.3.1. Phytodisponibilité du P dans le sol .....	11
I.3.2. P organique, formes et minéralisation.....	12
I.3.3. Activité enzymatique dans la rhizosphère .....	13
I.3.4. Caractéristiques et classification des phytases.....	14
I.3.5. Intérêt et rôles des phytases .....	15
I.3.6. Effet de la déficience en P sur la plante et sur la fixation symbiotique de l'N <sub>2</sub> .....	16
<b>CHAPITRE II: Effet de l'inoculation et des régimes de phosphore sur la fixation symbiotique de l'azote et l'efficacité de l'utilisation du phosphore chez le niébé (<i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp.)) en Algérie</b> .....	<b>17</b>
II.1. Introduction .....	17
II.2. Matériel et méthodes.....	18

II.2.1. Le sol .....	19
II.2.2. Bactéries .....	21
II.2.3. Conditions de culture.....	21
II.2.4. Collecte de données .....	21
II.2.5. Teneur en P de la plante.....	21
II.2.6. Efficacité d'utilisation du phosphore EUP.....	22
II.2.7. Analyses statistiques.....	22
II.3. Résultats.....	23
II.3.1. Effet de la déficience en P sur la croissance des plantes .....	23
II.3.2. Variation de l'efficacité d'utilisation du phosphore pour la FSN .....	26
II.3.3. Effet de la déficience en phosphore sur la nodulation des plantes .....	26
II.3.4. Efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne pour la croissance des plantes ...	28
II.5. Discussion.....	29
II.5. Conclusion .....	32
II.6. Références bibliographiques.....	33
<b>CHAPITRE III: Caractérisation et diversité génétique des souches de rhizobia nodulant le niébé (<i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp.)) en Algérie.....</b>	<b>36</b>
III.1. Introduction .....	36
III.2. Matériel et méthodes .....	37
III.2.1. La collecte des échantillons de sol et piégeage .....	37
III.2.2. Matériel végétal et conditions de culture .....	38
III.2.3. Prélèvement et stérilisation des nodules.....	38
III.2.4. Isolement des souches .....	39
III.2.5. Vérification de la pureté des souches .....	39
III.2.6. Test de la tolérance au pH, à la salinité et à la température .....	39
III.2.7. Caractérisation biochimique.....	40
III.2.8. Caractérisation moléculaire.....	40
a. Extraction de l'ADN.....	40
b. Amplification du gène ADNr 16S.....	40
c. Amplification du gène <i>nifH</i> .....	40
d. Révélation.....	41
e. Séquençage et analyses des données .....	41

III.3. Résultats et discussion.....	43
III.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols .....	43
III.3.2. Evaluation du pouvoir nodulant des sols.....	44
III.3.3. Caractérisation phénotypique des souches .....	44
III.3.4. Caractérisation biochimique des souches.....	46
III.3.5. Tolérance des souches aux stress abiotiques.....	49
III.3.6. Caractérisation moléculaire.....	51
a. Extraction de l'ADN.....	51
b. Amplification du gène ADNr 16S.....	51
c. Amplification du gène <i>nifH</i> .....	54
III.4. Conclusion.....	58
III.5. Références bibliographiques .....	59
<b>CHAPITRE IV: Criblage et caractérisation de souches de rhizobia solubilisatrices de phytate isolées à partir de nodules de niébé (<i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp)). .....</b>	<b>63</b>
IV.1. Introduction.....	63
IV.2. Matériel et méthodes .....	65
IV.2.1. Criblage des souches produisant la phytase BPP .....	65
IV.2.2. Screening des souches produisant la phytase HAP.....	67
IV.2.3. Expression du gène de la phytase alcaline BPP .....	68
IV.2.4. Expression du gène de la phytase acide HAP .....	69
IV.2.5. Séquençage et analyses des données.....	70
IV.3. Résultats et discussion .....	70
IV.3.1. Screening des souches minéralisant le phytate .....	70
IV.3.2. Amplification de la phytase BPP .....	74
IV.3.3. Amplification de la phytase HAP .....	75
IV.4. Conclusion .....	78
IV.5. Références bibliographiques .....	79
<b>CHAPITRE V : Effet de la déficience en phosphore sur l'activité phytase bactérienne de la symbiose rhizobia-niébé.....</b>	<b>82</b>
V.1. Introduction .....	82
V.2. Matériel et méthodes .....	84
V.2.1. Matériel biologique et conditions de culture .....	84

V.2.2. Mesures réalisées.....	85
V.2.3. Analyses des données .....	86
V.3. Résultats et discussion.....	86
V.3.1. Authentification des souches et nodulation.....	86
V.3.2. Poids sec des parties aériennes et racinaires .....	88
V.3.3. Teneurs en P des nodules, des parties aériennes et racinaires.....	91
V.3.4. Teneurs en N des parties aériennes et racinaires .....	94
V.3.5. Efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne.....	97
V.4. Conclusion.....	99
V.5. Références bibliographiques .....	100
<b>CHAPITRE VI : Localisation par Rt PCR in situ du gène <math>\beta</math>-propeller phytase dans les nodules de la symbiose rhizobia-niébé .....</b>	<b>104</b>
VI.1. Introduction.....	104
VI.2. Matériel et méthodes .....	106
VI.2.1. Matériel biologique et conditions de culture.....	106
VI.2.2. Co-extraction d'ARN/ADN, rétrotranscription et clonage .....	107
VI.2.3. RT-PCR in situ des transcrits du gène BPP .....	109
VI.2.4. Mesures réalisées .....	112
VI.2.5. Analyses des données.....	112
VI.3. Résultats et discussion .....	113
VI.3.1 Clonage du gène BPP.....	113
VI.3.2 Localisation et expression du gène BPP .....	113
VI.3.3. Effet de la déficience en P sur la nodulation, la croissance et la fixation symbiotique de l'azote des plantes.....	116
VI.4. Conclusion .....	118
VI.5. Références bibliographiques .....	119
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>122</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>125</b>
<b>ANNEXES</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1.</b> Principales caractéristiques morphologiques des accessions de niébé utilisées....	19
<b>Tableau 2.</b> Propriétés granulométriques et chimiques du sol utilisé .....	20
<b>Tableau 3.</b> Sites des prélèvements du sol et leurs précédents culturaux correspondants.....	38
<b>Tableau 4.</b> Mix PCR par tube pour un volume de 20µl final.....	41
<b>Tableau 5.</b> Analyses physico-chimiques et granulométriques des sols.....	43
<b>Tableau 6.</b> Nomenclature des souches et leurs sites de piégeage correspondants .....	45
<b>Tableau 7.</b> Principales caractéristiques des souches .....	46
<b>Tableau 8.</b> Caractères biochimiques des différentes souches .....	47
<b>Tableau 9.</b> Tests de tolérance des souches à la température, la salinité et au pH .....	50
<b>Tableau 10.</b> Composition du milieu pour détection de la phytase alcaline.....	65
<b>Tableau 11.</b> Composition du milieu pour détection de la phytase acide HAP .....	67
<b>Tableau 12.</b> Mix PCR par tube pour un volume final de 25µL (gène BPP). .....	68
<b>Tableau 13.</b> Mix PCR par tube pour un volume final de 25 µL (gène HAP). .....	69

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1.</b> Morphologie d'une plante de niébé ( <i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp.)) .....	5
<b>Figure 2.</b> Illustration schématique du processus de nodulation.....	10
<b>Figure 3.</b> Illustration de la minéralisation du phytate.....	13
<b>Figure 4.</b> Accessions de niébé utilisées.....	18
<b>Figure 5.</b> Effet des régimes de P sur le poids sec de la partie aérienne des accessions sous contrôle (T) (a), inoculation (S2) (b), inoculation (S1) (c) et co-inoculation (S1-S2) (d). Les données sont les moyennes de 4 répétitions au stade floraison $\pm$ ES.....	24
<b>Figure 6.</b> Effet des régimes de P sur la biomasse aérienne ( $\text{g plant}^{-1}$ ) (a), la teneur totale en P ( $\text{mg P g plante}^{-1}$ poids sec) (b) et l' EUP ( $\text{poids sec P}^{-2} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$ ) (c) au stade floraison. Les valeurs sont les moyennes de 24 répétitions. Les barres indiquent l'erreur standard. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ .....	25
<b>Figure 7.</b> Effet de la nutrition en P sur le poids sec des nodules ( $\text{g plante}^{-1}$ ) (a) et le nombre de nodules (b) au stade floraison. Les valeurs sont les moyennes de 4 répétitions. Les barres indiquent l'erreur standard. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ .....	27
<b>Figure 8.</b> Effet des régimes de P sur l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne chez les accessions du nord de niébé. Les données sont les moyennes de 24 répétitions au stade floraison à $p < 0,05$ .....	28
<b>Figure 9.</b> Effet des régimes de P sur l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne pour chaque accession de niébé. Une régression significative n'a été observée que pour NE10 sous inoculation S1. Les données sont les moyennes de 4 répétitions au stade floraison à $p < 0,05$ .....	29
<b>Figure 10.</b> Zone d'étude et localisation des sites d'échantillonnage.....	37
<b>Figure 11.</b> Programme PCR optimisé du gène <i>nifH</i> .....	41
<b>Figure 12.</b> Profil d'extraction d'ADN sur gel d'agarose 1%.....	51
<b>Figure 13.</b> Gel d'agarose de contrôle des amplifications de la PCR du gène ADNr 16S. ....	52

<b>Figure 14.</b> Arbre phylogénique des différentes séquences du gène ADNr 16S. La signification de chaque branche est indiquée par une valeur ( $\geq 60\%$ ) calculée pour 1000 répétitions, l'échelle indique le nombre de substitutions par site. ....	53
<b>Figure 15.</b> Gel d'agarose de contrôle des amplifications de la PCR du gène <i>nifH</i> . ....	55
<b>Figure 16.</b> Arbre phylogénique des différentes séquences du gène <i>nifH</i> . La signification de chaque branche est indiquée par une valeur ( $\geq 60\%$ ) calculée pour 1000 répétitions, l'échelle indique le nombre de substitutions par site. ....	56
<b>Figure 17.</b> Programme PCR optimisé du gène BPP. ....	69
<b>Figure 18.</b> Programme PCR optimisé du gène HAP. ....	70
<b>Figure 19.</b> Mise en évidence de la dégradation du phytate sur milieux solides (A) phytase BPP, (B) phytase HAP. ....	71
<b>Figure 20.</b> Cinétique de croissance des bactéries en culture libre (A) phytase BPP, (B) phytase HAP. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ . ....	72
<b>Figure 21.</b> Mesures du Pi libéré dans le milieu liquide (A) activité phytase BPP, (B) activité phytase HAP. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ . ....	74
<b>Figure 22.</b> Gel d'agarose de contrôle des amplifications de la PCR du gène BPP. ....	75
<b>Figure 23.</b> Gel d'agarose de contrôle des amplifications du gène HAP. ....	76
<b>Figure 24.</b> Vue générale de l'essai expérimental en serre. ....	85
<b>Figure 25.</b> Effet de la nutrition en P sur le poids sec des nodules formés par les différentes souches. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard. ....	87
<b>Figure 26.</b> Effet de la déficience en P sur le poids sec des parties aériennes (A) et des parties racinaires (B). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard. ....	89
<b>Figure 27.</b> Effet de la déficience en P sur la teneur en P des nodules. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard. ....	91
<b>Figure 28.</b> Effet de la déficience en P sur la concentration en P des parties aériennes (A) et des parties racinaires (B). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard. ....	93

<b>Figure 29.</b> Effet de la déficience en P sur la concentration en N des parties aériennes (A) et des parties racinaires (B). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard.....	95
<b>Figure 30.</b> Efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne des couples symbiotiques à activité phytase bactérienne (rouge) versus les couples symbiotiques sans activité phytase bactérienne, en conditions de déficience en P (A) et en conditions de suffisance en P (B). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. ....	98
<b>Figure 31.</b> Colonies bleues/blanches (A) et vraies colonies blanches (B). ....	108
<b>Figure 32.</b> Nodules au stade 52 jours après transfert en bouteilles (A), microtome (B) et coupes de nodules sur lames (C). ....	111
<b>Figure 33.</b> Gel d'agarose de contrôle du clonage du gène BPP .....	113
<b>Figure 34.</b> Localisation <i>in situ</i> de l'expression du gène de la phytase BPP (fluorescence en vert) dans les nodules de niébé formés par la souche S21 (A, B, C) et la CB756 (D, E, F) en conditions de suffisance en P (B, E) et de déficience en P (C, F). A et D contrôles négatifs (sans RT). <i>CE</i> cortex externe, <i>CI</i> cortex interne, <i>TV</i> trace vasculaire et <i>ZI</i> zone infectée. ....	115
<b>Figure 35.</b> Poids sec de la plante (A), poids sec des nodules (B), teneur en P de la plante (C), teneur en P des nodules (D) et teneur en N de la plante (E) de la lignée IT 90 K 372-1-2 inoculée avec les souches CB756 et S21 en conditions de suffisance et déficience en P. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Les barres indiquent l'erreur standard. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ . ....	117

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ADNg** : Acide désoxyribonucléique génomique

**ADNr** : Acide désoxyribonucléique ribosomique

**AIA** : Acide indole acétique

**ANOVA** : Analysais Of Variance

**API** : Appareillage et Procédé d'Identification

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BET** : Bromure d'Ethidium

**BPP** :  $\beta$ -propeller phytase

**BSA** : Bovine sérum albumine

**C phy** : cystéine phytase

**DEPC** : diéthylpyrocarbonate

**DO**: Densité optique

**EUP** : Efficacité d'Utilisation du Phosphore

**EURS** : Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne

**FAO**: Food and Agriculture Organisation

**HAP:** Histidine acide phytase

**IP:** Inositol-Phosphates

**IPTG:** Isopropyl  $\beta$  -D-1 thiogalactopyranoside

**ITCMI :** Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles

**LB :** Lysogène bouillon

**MADR :** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

**N:** Azote

**N<sub>2</sub>:** Azote atmosphérique

**NCBI :** National Center for Biotechnology Information

**nDW:** Nodule Dry Weight.

**Nt:** Azote total.

**P:** Phosphore.

**PAP:** Purple acide phosphatase

**P ass:** Phosphore assimilable

**Pb:** Paire de base

**PBS:** Tampon phosphate salin

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PGPB:** Plant Growth Promoting Bacteria

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**Phy + :** Couples symbiotiques à activité phytase

**Phy - :** Couples symbiotiques sans activité phytase

**Pi :** Phosphore inorganique

**Ppm:** Partie par million

**rDW:** Root Dry Weight.

**RPM:** Rotation par minute

**Rt:** Rétrotranscription

**SAU:** Surface agricole utile

**sDW:** Shoot Dry Weight.

**TAE:** Tris-Acétate, EDTA

**X-Gal:** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

**YEM:** Yeast Extract Mannitol

## INTRODUCTION GENERALE

En Algérie, le système de culture prédominant est caractérisé par la rotation blé-jachère où cette dernière occupe annuellement plus de 40% de la surface agricole utile (SAU) (**Abbas et Abdelguerfi, 2005**). Sa résorption fait l'objet depuis de nombreuses années, d'une réflexion dont l'objectif est de rechercher une alternative à ce système en proposant des cultures qui peuvent remplacer la jachère et par conséquent doubler la production agricole. A cette situation s'ajoute la faible disponibilité du phosphore dans la majorité des zones céréalières, caractérisées par une forte présence de calcaire et des pHs alcalins, qui favorisent la précipitation et l'insolubilisation de cet élément (**Halitim, 1985**).

L'introduction des légumineuses dans ce système de culture, offre des avantages substantiels dans la production agricole. En symbiose avec des rhizobia, elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de solubiliser le phosphore précipité du sol. Ainsi, on peut économiser dans une large mesure, les fertilisants chimiques qui posent actuellement de graves problèmes de pollution de l'eau, du sol, et des végétaux (**Cellier et al., 2015**). L'intérêt écosystémique est largement reconnu dans le choix des systèmes de cultures qui respectent l'environnement et la durabilité du milieu (**Vertes et al., 2010**).

Pour cette étude, le choix de la plante modèle s'est porté sur le niébé qui a la capacité de tolérer les sols pauvres en favorisant le développement du système racinaire pour explorer les sols (**Hamidou et al., 2018**). Comme toutes légumineuses, il est cependant, très exigeant en phosphore pour fixer l'azote atmosphérique. De ce fait la déficience en cet élément devient un facteur limitant sévère de la production de cette légumineuse.

Malgré leur forte teneur en P organique ou P insoluble, la plupart des sols des hautes plaines céréalières sont généralement pauvres en P assimilable. Le P organique constitue l'essentiel du P dans le sol, représentant environ 55 à 85% du phosphore total (**Turner et al., 2002**). Bien qu'il comporte diverses formes, le pool de P organique est généralement composé d'une forme majoritaire qui est le phytate (*myo*-inositol *hexakis*phosphate) (**Turner et al., 2002**). La libération de P minéral par déphosphorylation du phytate est assurée par des enzymes spécifiques appelées phytases (**Mullaney et al., 2007**). Les données récentes ont montré que la sécrétion de phytases par les microorganismes est largement supérieure à celle

des plantes et que la microflore rhizosphérique joue un rôle déterminant dans la biodisponibilité du P et son acquisition par les plantes (**Plassard et al., 2015**).

Tout processus impliquant une régulation biologique pouvant contribuer à la libération de P dans le sol mérite une attention particulière et peut constituer ainsi une alternative à l'utilisation de fertilisants phosphatés, (sources non renouvelables, onéreux et polluants). En effet la majorité du P soluble apporté sous forme d'engrais est rapidement insolubilisé en présence de teneurs élevées de calcium du sol (**Darrah et al., 2006**). Ce pool de P inaccessible aux plantes peut cependant redevenir disponible grâce à l'intervention de microorganismes (bactéries ou mycorhizes) capables de créer des conditions favorables à sa solubilisation et son assimilation par les racines de la rhizosphère (**Plassard et al., 2015**). Le P minéral est solubilisé grâce à l'acidification de la rhizosphère par les exsudats des racines des légumineuses (**Plassard et al., 2015**). Le P organique est libéré par l'activité enzymatique des phytases (**Mullaney et al., 2007**).

Les recherches récentes s'intéressent aux communautés microbiennes impliquées dans la minéralisation du phosphore organique avec une plus grande attention aux symbioses mycorhiziennes (**Plassard et al., 2015**). Le phosphore organique (phytate) est hydrolysé par les enzymes secrétées par les bactéries (phytases). Ce mécanisme est très important dans les processus de minéralisation du phytate, (forme majoritaire du P organique), en P minéral assimilable par les plantes. Les symbioses rhizobiennes solubilisatrices de phytate suscitent un intérêt particulier. C'est dans cette optique que s'enregistre notre thématique.

L'objectif global de cette thèse est la compréhension des mécanismes qui améliorent l'assimilation du phosphore chez le niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)). L'outil de base s'appuie sur des symbioses rhizobia-niébé fixatrices d'azote performantes sous déficience en P.

La première étape consiste en la sélection de génotypes de niébé performants sous déficience en phosphore, et de vérifier si leur origine géographique affecte l'efficacité d'utilisation du phosphore (EUP) ? (Chapitre II).

La deuxième étape vise à isoler des rhizobia à partir de nodules de niébé dans le but de constituer une collection de souches nodulant cette espèce (Chapitre III), de les caractériser et d'évaluer leur biodiversité vis-à-vis de la minéralisation des phytates (Chapitre IV).

L'hypothèse de départ est qu'il existerait des souches de rhizobia productrices de phytases bactériennes intervenant dans le mécanisme adaptatif de la symbiose rhizobia-niébé à la déficience en P (Chapitre V). L'expression de l'activité phytase bactérienne BPP ( $\beta$ -propeller phytase) est localisée *in situ*, par la Rt PCR, au niveau du nodule (Chapitre VI).

## CHAPITRE I Synthèse bibliographique

### I. Partenaires de la symbiose rhizobia-niébé

Les mutualismes entre bactéries et plantes peuvent se traduire soit par des associations lâches, souvent appelées interactions associatives, soit par des associations étroites, désignées par des symbioses où ce mutualiste bactérien est appelé ‘symbiote’ la plante forme ainsi le macrosymbiote alors que la bactérie représente le microsymbiote (**Beattie, 2007**).

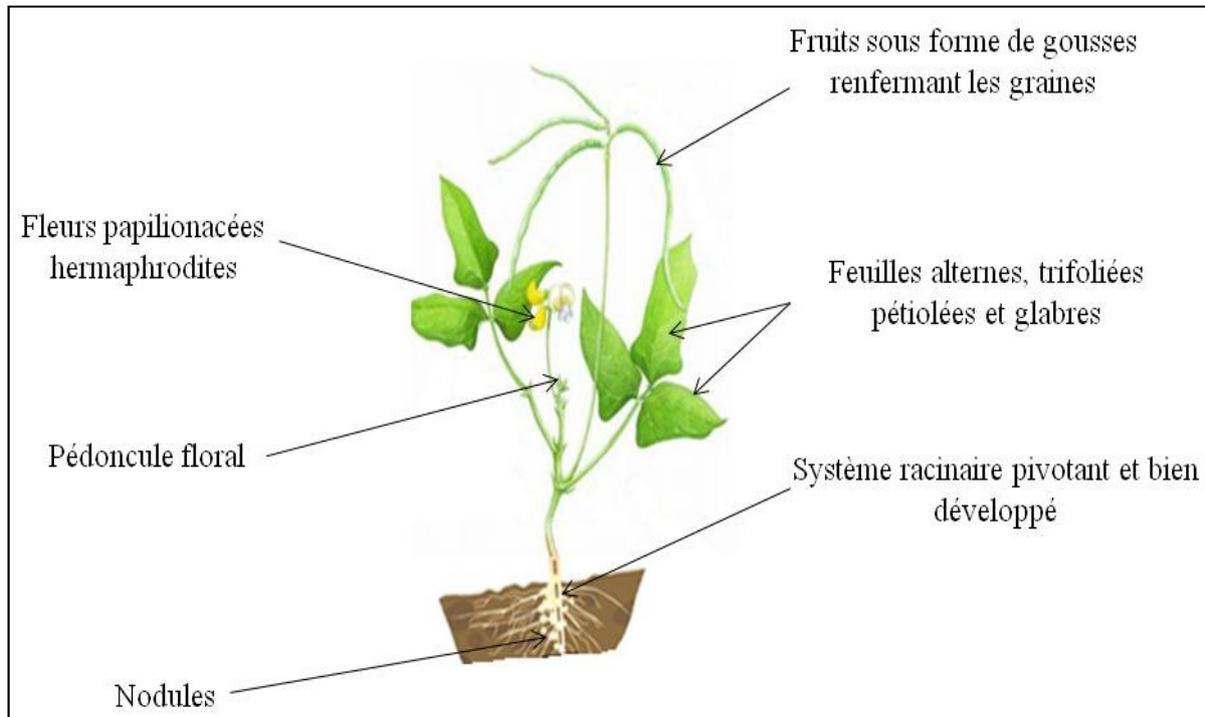
#### I.1. Le macrosymbiote *Vigna unguiculata* L. (Walp.)

Bien que le niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) soit considéré comme la légumineuse la plus importante économiquement dans le monde (**Ng et Padulosi, 1991**), les études réalisées sur cette espèce restent faibles comparées aux autres légumineuses (soja et haricot) (**Pedalino et al., 1990**).

##### I.1.1. Taxonomie et origine

Le genre *Vigna* est composé de plus de 100 espèces distribuées à travers les régions tropicales et sub-tropicales (**Paino et al., 1990**). La taxonomie de ce genre est très controversée, en raison de la présence d'espèces de différentes origines caractérisées par une grande diversité écologique et morphologique (**Maréchal et al., 1978**). Les espèces du genre *Vigna* sont des plantes dicotylédonaire qui appartiennent à la famille des *fabaceae*, tribu des *Phaseoleae*, cette dernière a subi plusieurs révisions, ce qui étendrait le genre *Vigna* pour inclure diverses espèces de *Phaseolus* à petites graines cultivées en Asie (**Rachie et Rawal, 1976**).

Selon **Hadi et al. (2012)**, le niébé est originaire de l’Afrique de l’Ouest, sa culture s’est propagée à travers le monde entier notamment en Asie et en Amérique du Sud. **Pasquet et Baudoin (2001)**, quant à eux supposent que les premières formes domestiquées du niébé seraient apparues dans le nord-est de l’Afrique. Selon **Ba et al. (2004)**, uniquement sept espèces, sont domestiquées ; deux sont africaines dont le niébé (*V. unguiculata* L. (Walp.)) et Cinq sont asiatiques la plus connue étant (*V. radiata* L. (Wilczek)).



**Figure 1.** Morphologie d'une plante de niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.))

### I.1.2. Morphologie et description du niébé

Le niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) ou dolique à œil noir est une légumineuse à grain capable d'entrer en symbiose avec les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* grâce à la formation de nodules (organes symbiotiques) au niveau des racines (Tampakaki et al., 2017). C'est une plante herbacée annuelle grimpante parfois rampante pouvant atteindre 80cm de hauteur à germination épigée. Les feuilles sont alternes, pétiolées, glabres de forme plutôt lancéolée. La couleur des fleurs varie d'une population à une autre allant du blanc au violet (Yoka et al., 2014). Les fruits sont des gousses cylindriques de longueur allant de 8 à 20 cm et pouvant renfermer plus de 10 graines (Fig. 1). Les graines sont réniformes, oblongues dissymétriques de tailles et de couleur variable (Susmitha et Rai, 2017). Le système racinaire est pivotant, profond et bien développé, lui permettant de puiser l'eau dans les profondeurs (Kopittke et al., 2011).

Une prospection réalisée par Ghalmi et al., (2010) a permis de récolter 122 accessions de niébé. Leur étude a montré une grande variabilité de la couleur des graines (noire, beige, voire marron), de forme (rhomboïde, réniforme, ou sphérique) avec un tégument lisse à ridé. La couleur de l'œil varie allant du noir au beige.

### **I.1.3. Exigences climatiques et édaphiques du niébé**

Le niébé est particulièrement cultivé dans les régions tropicales et subtropicales. Il possède une capacité d'adaptation considérable aux conditions climatiques rudes des régions arides et semi-arides (Sawadogo, 2009). Pour son développement, le niébé exige des températures entre 15 et 30 °C, une température supérieure à 38°C peut réduire sa croissance, affecter sa nodulation et provoquer l'avortement des jeunes gousses. Il craint les gelées et sa température optimale de croissance se situe autour de 27°C (Yoka et al., 2014).

Le niébé est adapté aux régions dont les précipitations sont comprises entre 300 et 420 mm. Il est adapté à la sécheresse, son système racinaire est développé lui permettant d'aller puiser l'eau en profondeur (Kouakou et al., 2007).

Le niébé est tolérant à l'aluminium, aux sols pauvres, à pH très alcalin et à pH très acide, avec une préférence aux sols à pH 6-7 ; il est mieux adapté aux sols sableux ayant un bon drainage (Ehlers et Hall, 1997).

Le cycle végétatif du niébé des accessions algériennes, du semis à la récolte varie de 87 à 144 jours (Ghalmi et al., 2010).

### **I.1.4. Intérêts économiques et valeurs alimentaires**

De nos jours, le niébé n'est plus considéré comme une culture de subsistance mais une culture de rente et constitue donc à l'échelle mondiale une source de revenu remarquable. En 2014, la production mondiale a dépassé 9 millions de tonnes dont 95,8 % proviennent de l'Afrique (FAOSTAT, 2017). Cependant, sa commercialisation rencontre quelques contraintes comme les fluctuations des prix et la qualité des graines qui est affectée par les conditions de stockage et les attaques d'insectes (Sarr et al., 2001)

Le niébé représente l'une des principales sources de protéines alimentaires en Afrique et en particulier dans les régions du Sahel, pouvant se substituer aux protéines animales. En effet, c'est une culture hautement nutritive, avec une teneur en protéines de graine sèche d'environ 25% et une digestibilité des protéines plus élevée que celle des autres légumineuses (Marconi et al., 2002)

Par ailleurs, les légumineuses sont riches en sels minéraux et en vitamines et représentent donc un équilibre des rations alimentaires des accessions rurales (Sawadogo, 2009). Les fanes du niébé constituent un excellent fourrage pour le bétail (Kouakou et al., 2007).

### **I.1.5. La culture du niébé en Algérie**

En Algérie, selon une prospection réalisée par **Ghalmi et al. (2010)**, le niébé est cultivé dans les régions de Kabylie, El Kala et les Oasis du Sahara, essentiellement pour l'autoconsommation. Les surfaces consacrées à cette culture sont très faibles. Les données statistiques agricoles les plus récentes sur les superficies, productions et rendement du niébé en Algérie remontent à 2012. Ainsi, la superficie est estimée à 573ha ; la production à 240 quintaux et le rendement à 0,41 quintaux/ha (**MADR, 2012**).

### **I.1.6. Les contraintes de la culture du niébé**

Le problème majeur de la culture du niébé réside en l'attaque des insectes au moment de la floraison (thrips et les chenilles s'attaquent surtout aux bourgeons floraux et détruisent les fleurs), durant la période de stockage (les bruches ou charançons (*Callosobruchus maculatus*)) causent des dégâts considérables affectant ainsi le rendement et la qualité des grains (**Raja et al., 2001**). Certaines maladies comme (la buse bactérienne causée par (*Xanthomonas sp.*) ; le mildiou causé par (*Oidium sp.*) ; Fusariose causée par (*Fusarium oxysporum*) et la pourriture (*Choanephora cucurbitarum*)) peuvent faire des ravages considérables sur la culture du niébé (**Rodrigues et Menezes, 2005 ; Okechukwu et al., 2010**).

## **I.2. Le microsymbiote**

Les microorganismes dits diazotrophes sont capables de fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et ce en réduisant l' $N_2$  en ammoniacque ( $NH_3$ ) par le biais de l'enzyme nitrogénase.

Le groupe le plus important des bactéries diazotrophes est désigné par « Rhizobia » capable d'établir la symbiose en infectant les racines des légumineuses, entraînant la formation d'organes spécialisés qu'on appelle nodules, sièges de la fixation biologique de l'azote atmosphérique (**Voisin et Gastal, 2015**). Cette symbiose a une grande importance économique et écologique en réduisant l'utilisation des engrais azotés et la pollution de l'environnement (**Freire et Saccol, 2006**). La symbiose est à bénéfices réciproques : la bactérie fixe l'azote et le fournit à la plante ; en contre partie, la plante loge la bactérie et apporte l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des nodosités et à leur fonctionnement grâce aux produits de la photosynthèse (**Voisin et Gastal, 2015**).

### **I.2.1. Diversité des rhizobia**

Les espèces rhizobiennes décrites jusqu'ici sont très diverses et ne forment pas un clade homogène évolutif. Elles appartiennent à la sous-classe  $\alpha$ 2-protéobactéries et sont liés

phylogénétiquement à des bactéries non symbiotiques dont certaines sont pathogènes (**Zakhia et De Lajudie, 2001**). Ces micro-organismes sont répartis dans l'ordre rhizobiales qui comporte plusieurs familles parmi lesquelles on trouve cinq à intérêt agronomique (**Garrity et al., 2001**) :

- Famille Rhizobiaceae
  - Genre *Rhizobium*
  - Genre *Sinorhizobium*
- Famille Phyllobacteriaceae
  - Genre *Allorhizobium*
  - Genre *Mesorhizobium*
- Famille Bradyrhizobiaceae
  - Genre *Bradyrhizobium*
- Famille Hyphomicrobiaceae
  - Genre *Azorhizobium*
- Famille Methylobacteriaceae
  - Genre *Methylobacterium*

Habituellement les nodules se forment au niveau des racines des plantes mais chez certaines plantes, par exemple, *Sesbania rostrata*, la tige est infectée par *Azorhizobium caulinodans*. De même chez *Neptunia natans* infectée par *Allorhizobium* (**Sy et al., 2001**).

### **I.2.2. Processus de la nodulation**

La formation de nodules racinaires efficaces (fixateurs d'azote) nécessite une expression temporelle et spatio-temporelle coordonnée des gènes végétaux et bactériens (**Zahrn, 2006**). Les principales étapes du déroulement de la nodulation sont résumées dans la figure 2 :

**Phase de reconnaissance spécifique** : La nodulation est un processus fortement spécifique, uniquement certaines souches de rhizobia peuvent induire la formation de nodules chez une espèce donnée de légumineuse (**Beattie, 2007**). Cette reconnaissance spécifique est établie entre les deux partenaires par émission de signaux moléculaires. La plante excrète par les racines des composés flavonoïdes, ces derniers sont détectés par la bactérie et elle se traduit par l'activation des gènes bactériens codant pour les facteurs 'Nod' responsables de la déformation spécifique des poils racinaires, de la formation de nodosités et interviennent dans le métabolisme des bactéroïdes (**Jones et al., 2007**).

**Phase de pré-infection**: Les exsudats racinaires stimulent la multiplication des rhizobia dans la rhizosphère qui adhèrent au poil absorbant de la racine grâce aux glycoprotéines, lectines et des enzymes secrétées par la plante qui dégradent les

polysaccharides des bactéries et provoquent par la suite la courbure du poil absorbant en présence d'acide indole acétique (**Dazzo, 2008**).

**Phase d'infection:** Cette phase est marquée par la pénétration des rhizobia à l'intérieur du poil absorbant et la formation d'un cordon d'infection dans lequel les rhizobia se multiplient activement, ce cordon traverse la paroi pectocellulosique des cellules hôtes et se ramifie à l'intérieur du cortex racinaire (**Dazzo, 2008**). On distingue deux modes d'infection ; l'infection intracellulaire caractéristique des légumineuses tempérées où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers les poils absorbants après digestion partielle de la paroi de ces derniers et l'infection intercellulaire présente chez les légumineuses tropicales appelée aussi entrée par fissure dont la pénétration se fait à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (**Svistoonoff, 2003**).

**Phase de formation et de maturation du nodule:** Les cellules du cortex se différencient en méristème durant cette phase l'ADN plasmidique passe de la bactérie à la cellule hôte. L'acidité du méristème induit la croissance et le développement des nodosités. Le cordon d'infection poursuit sa ramification tandis que les rhizobia continuent de se multiplier (**Alkama, 2010**). Les bactéries sont ensuite libérées, hors du cordon infectieux, dans le cytoplasme de l'hôte où elles se divisent activement, augmentent de taille et se différencient en bactéroïdes séparés du cytoplasme des cellules de l'hôte par une membrane de séquestration (**Dupuy et Nougier, 2005**). En parallèle, les cellules de l'hôte augmentent de taille et forment le tissu central du nodule renfermant de la leghémoglobine (couleur rougeâtre) dans leur cytoplasme ainsi le nodule devient actif et fixe l'azote (**Oke & Long, 1999**).

**Phase de sénescence des nodosités:** A la floraison, la croissance végétative atteint son apogée, la leghémoglobine se dégrade et devient verdâtre, la nodosité dégénère et la fixation d'azote s'arrête (**Svistoonoff, 2003**). En se détachant de la plante, les nodules se lysent et déversent leur contenu protéique dans le sol ainsi que les bactéroïdes (**Dupuy et Nougier, 2005**).

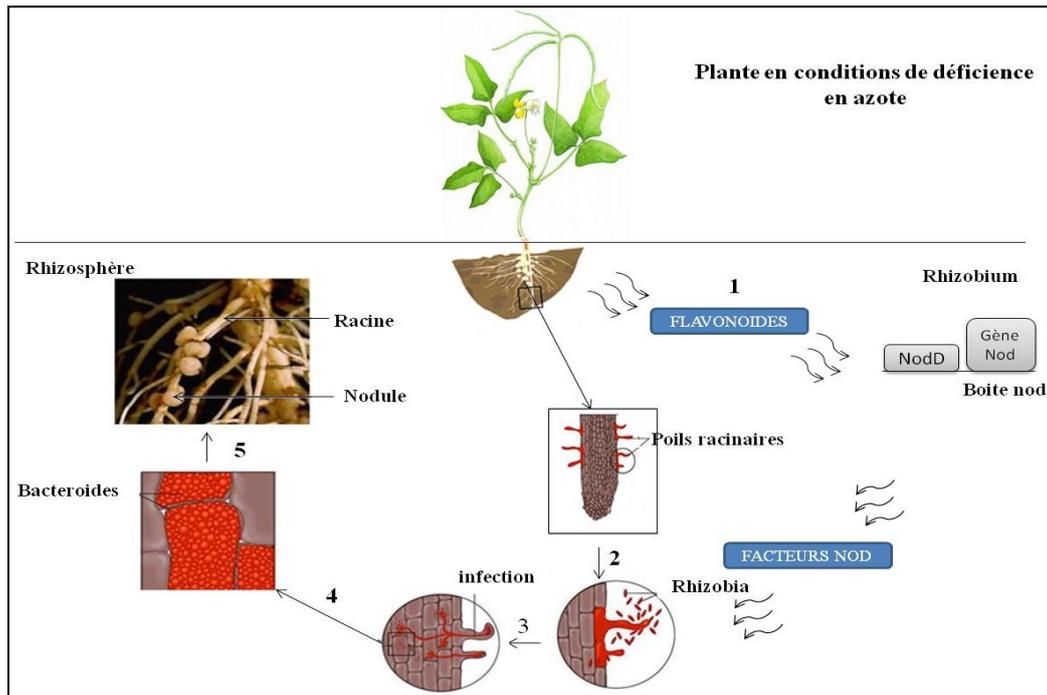
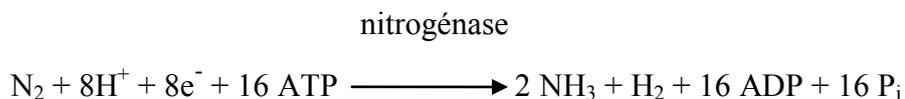


Figure 2. Illustration schématique du processus de nodulation.

Les aspects morphologiques et physiologiques des nodosités varient en fonction des partenaires de la symbiose. Deux types de nodules peuvent être distingués ; les nodules à croissance déterminée caractéristiques des espèces tropicales (exemple chez le niébé, les nodules sont sphériques et toutes les cellules ont un état de différenciation identique) ; et les nodules à croissance indéterminée en forme allongée (suite à la persistance de la zone méristématique) caractéristique des espèces des climats tempérés (Svistoonoff, 2003).

### I.2.3. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote atmosphérique par la symbiose rhizobia-légumineuse est localisée au niveau des bactéroïdes (Vasse et al., 1990 ; Krishnan et Bennett, 2007). La réduction de l'azote atmosphérique en ammoniacque est catalysée par la nitrogénase selon la réaction suivante, qui produit deux moles d'ammoniacque à partir d'une mole d'azote atmosphérique (Philippot and Germon, 2005):



Le complexe enzymatique nitrogénase est constitué de deux protéines conservées: la MoFe dinitrogénase codée par les gènes *nifD* et *nifK* et la Fe di-nitrogénase réductase codée par le gène *nifH* (Philippot and Germon, 2005). La nitrogénase est extrêmement sensible à la présence d'O<sub>2</sub>, elle est protégée par une chromoprotéine (la léghémoglobine) comparable à

l'hémoglobine, qui est formée de deux sous-unités, l'hème (partie non protéique) synthétisée par les rhizobia et la globine 16Kd (partie protéique) synthétisée par la plante. La lég'hémoglobine régule le métabolisme des bactéroïdes en les alimentant en oxygène (**Dupuy et Nougier, 2005**)

L'azote atmosphérique réduit en ammoniac, se combine à l'acide cétonique pour former des acides aminés qui sont exportés sous la forme d'asparagine, des nodosités vers les feuilles, pour servir à la synthèse des protéines (**Voisin et Gastal, 2015**).

Compte tenu du coût énergétique élevé du processus de la fixation symbiotique du N<sub>2</sub> pour la plante, ce processus n'est enclenché que lorsque l'azote minéral de la solution du sol se raréfie, ainsi, la plante commence par prélever l'azote minéral disponible dans le sol, puis la fixation symbiotique prend le relais (**Dupuy et Nougier, 2005**). En d'autres termes, l'abondance de nitrate dans le sol limite ou inhibe la fixation symbiotique de N (**Voisin et Gastal, 2015**). Tout type de stress (biotique ou abiotique) induit à la plante, affecte le processus de la fixation symbiotique d'N<sub>2</sub> (**Fox et al., 2007**).

### **I.3. Le phosphore (P)**

Le phosphore (P) est le cinquième élément constituant la matière vivante. Cependant, il est présent en faibles quantités dans la lithosphère, l'hydrosphère et la biosphère terrestre (**Bouwman et al., 2009**). Sous toutes ses formes, l'atome de P est associé aux atomes d'O<sub>2</sub> pour former le groupement phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Ce dernier, en s'associant à un deuxième groupement phosphate par une liaison anhydride d'acide, produit de l'énergie sous forme d'ATP ce qui lui confère un rôle fondamental dans le stockage de l'énergie cellulaire (**Plassard et al., 2015**). Le groupement phosphate est un composant des acides nucléiques, des enzymes, des phosphoprotéines et des phospholipides (**Lim et al., 2007**).

#### **I.3.1 Phytodisponibilité du P dans le sol**

Le phosphore (P) a une mobilité dans le sol très restreinte, du fait de la réactivité élevée des ions orthophosphates (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>4-</sup> et HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) qui représentent les seules formes de P utilisables. De ce fait l'approvisionnement en P à partir du milieu devient une contrainte majeure pour les plantes (**Tang et al., 2006**). Ainsi, les concentrations en ions orthophosphates libres dans la solution du sol sont très faibles (de 0,1 à 10 µM) (**Hinsinger, 2001**). La biodisponibilité ou phytodisponibilité du P, est la fraction de P susceptible d'être absorbée par une plante. Elle est régie, d'une part par la disponibilité du P dans la rhizosphère

(qui dépend des processus biochimiques et géochimiques dans le sol) et par l'absorption racinaire d'autre part (**Harmsen, 2007**).

L'absorption de P par la racine entraîne un appauvrissement de la concentration en P en solution dans la rhizosphère, suite à cette diminution un gradient de diffusion des ions orthophosphates se forme, et une modification du pH entraînant un changement des équilibres physico-chimiques (d'adsorption-désorption du P et de précipitation-dissolution des minéraux phosphatés). Il est reconnu que la vitesse de diffusion des ions orthophosphates est le facteur limitant majeur de l'acquisition de P par les plantes (**Barber, 1995**).

Les principaux facteurs gouvernants la biodisponibilité du P et qui contrôlent la solubilité et l'assimilabilité du phosphore du sol sont : (i) le pH de la solution du sol influencé par les racines et les micro-organismes par excrétion de protons, d'enzymes et d'acides organiques, (ii) la teneur en cations d'aluminium de fer et de calcium, (iii) la teneur et la nature de l'argile et la teneur en matière organique (**Nannipieri et al., 2011**).

### **I.3.2. P organique, formes et minéralisation**

Le P organique est représenté par l'ensemble des composés organiques formés par les organismes vivants et comprend un ou plusieurs groupes d'ions orthophosphates qui sont liés à un carbone par une liaison ester. Il représente entre 30 et 90% du P total du sol (**Jones et Oburger, 2011**).

Le P organique dans le sol se trouve majoritairement sous forme de phytate (inositol-6-phosphate) (approximativement 50% du P organique) et partiellement sous forme de phospholipides, de sucres phosphatés, d'acides nucléiques et des dérivés d'acides phosphoriques ((**Turner et al., 2002 ; Tarafdar et al., 2002 ; Quiquampoix et Mousain, 2005**).

Le P organique est minéralisé par des enzymes (phosphatases) de sources diverses (animale, végétale ou bactérienne) afin de faciliter son utilisation sous forme de Pi (ions orthophosphates) par les plantes et les micro-organismes du sol (**Richardson et Simpson, 2011**) (**Fig. 3**).

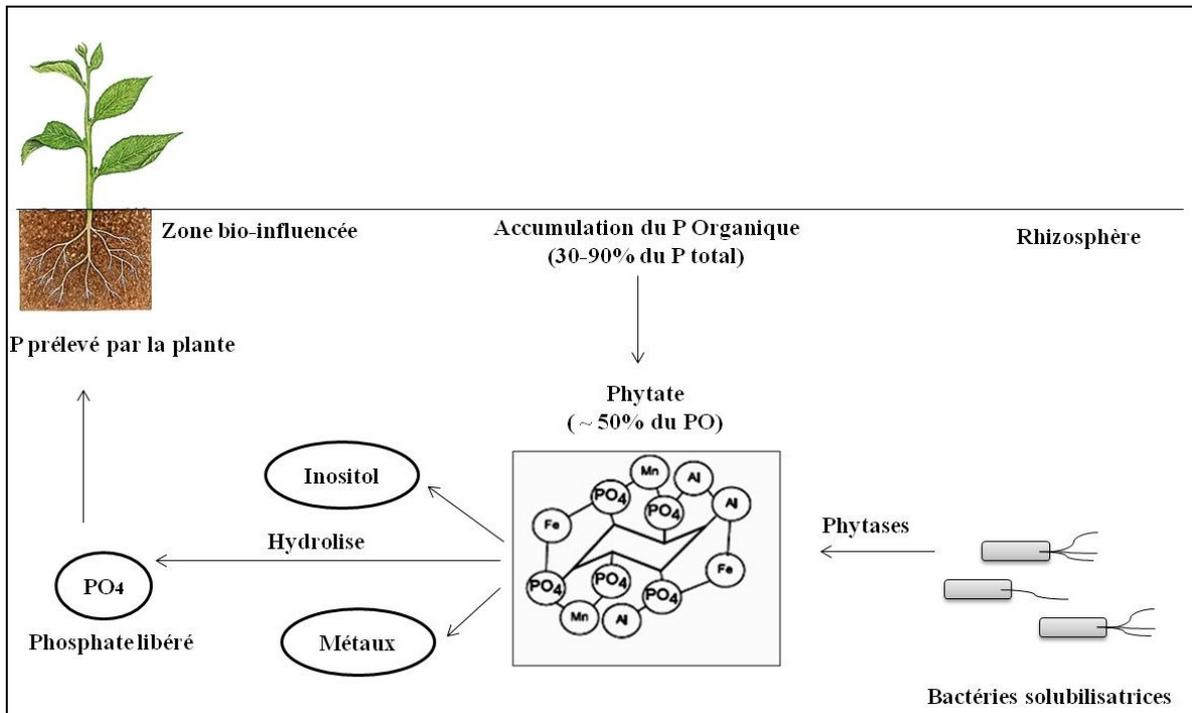


Figure 3. Illustration de la minéralisation du phytate

### I.3.3. Activité enzymatiques dans la rhizosphère

L'activité enzymatique est très présente dans la rhizosphère des plantes cette zone est considérée comme étant une zone bio-influencée (Plassard et al., 2015). Les phytases jouent un rôle majeur dans le cycle de P en minéralisant le P organique en Pi ; elles sont plus actives dans le sol rhizosphérique que dans le sol bulk (non rhizosphérique) (Spohn et Kuzyakov, 2013). On recense deux types d'activités enzymatiques : intracellulaires et extracellulaires seules ces dernières sont les mieux étudiées (Nannipieri et al., 2011).

Les phosphatases sont relâchées dans le sol soit par sécrétion active ou après lyse cellulaire (Tadano et al., 1993) afin de minéraliser le P organique extracellulaires (Jones et Oburger, 2011). Les phosphatases bactériennes prédominent dans le sol (Plante, 2007) et sont plus efficaces pour la libération de Pi (Tarafdar et al., 2001). Elles sont classées selon le pH optimal de leur activité (Hoffmann, 1968) :

- Des **phosphomonoestérases** incluant les phytases, capables de libérer du P à partir de l'acide phytique et sont les plus étudiées notamment chez les micro-organismes (Jones et Oburger, 2011). Ce sont des phosphatases de haut poids moléculaire (Rodríguez et al., 2006).
- Des **phosphodiesterases** qui hydrolysent les liaisons phosphodiester entre un groupement phosphate et deux molécules reliant entre elles des atomes de phosphore.
- Des **hydrolases** qui hydrolysent les fonctions anhydride d'acide ou les liaisons P-N.

Les Micro-organismes ont la capacité de produire aussi bien les phosphatases acides qu'alcalines, les plantes quant à elles ne produisent que des phosphatases acides (Nannipieri et al., 2011). Néanmoins, l'activité des phosphatases acides est liée à la présence de racines, alors que l'activité alcaline est plus largement distribuée dans le sol (Plassard et al., 2015)

Les propriétés catalytiques des phosphatases sont modifiées lorsque ces dernières sont adsorbées sur les argiles du sol (Quiquampoix et Mousain, 2005). Elles peuvent être adsorbées sur la phase solide du sol, en particulier sur les argiles, modifiant ainsi leurs propriétés catalytiques (Quiquampoix et Mousain, 2005). Elles sont aussi sujettes à des processus d'inhibition et de biodégradation dans le sol (Nannipieri et al., 2011).

La disponibilité du Pi dans le sol et/ou la teneur de ce dernier en matière organique régule les activités phosphatases (Štursová et Baldrian, 2011). Cependant, la quantité de Pi disponible dans les sols n'est pas forcément liée aux activités phosphatases (Venkatesan et Senthurpandian, 2006).

#### **I.3.4. Caractéristiques et classification des phytases**

Les phytases sont secrétées dans le sol par un large éventail d'organismes, dont les champignons, les bactéries et les plantes (Plassard et al., 2015). Selon leur mécanisme d'hydrolyse, la structure et thermostabilité de la protéine, leur spécificité de substrat et leur pH optimal, elles sont regroupées en quatre classes (Jorquera et al., 2008):

- **Les phosphatases acides à histidine (HAP)** et qui comprennent deux sous-classes ; PhyA (présente une forte activité spécifique pour le phytate à pH 5) et PhyB (dont l'activité optimale est à pH 2,5, cette valeur ne reflète pas les valeurs de pH des sols, même très acides), bien que ces deux sous-classes soient présentes chez les champignons filamenteux, les bactéries, les levures et les plantes, elles sont considérées en tant que phytases fongiques caractéristiques du champignon saprophyte *Aspergillus niger*. Les enzymes HAP libèrent jusqu'à cinq groupements Pi quand le phytate ne complexe aucun métal (Oh et al., 2004). Elles ne sont pas strictement spécifiques au phytate car elles sont actives en présence de plusieurs phosphomonoesters (Wyss et al., 1999)
- **Les phytases à hélice beta ou beta propeller phytase (BPP)** ce sont des phytases exclusivement bactériennes dont la présence a été détectée chez les Bacilles à Gram+ et *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas sp.* et *Enterobacter sp.* à Gram- (Plassard et al., 2015). Ces enzymes sont exigeantes en phytate de calcium, la présence de ce dernier est indispensable durant l'activité catalytique à pH optimal neutre à légèrement

alcalin (pH 7-8). Les enzymes BPP libèrent au maximum trois Pi par molécule de phytate (Oh et al., 2004).

- **Les phytases à cystéine (CPhy)** leur protéine est caractérisée par un motif à cystéine et peuvent libérer jusqu'à cinq groupements Pi à un pH optimal entre 4 et 5,5 (Mullaney et al., 2007).
- **Les phosphatases acides pourpres (PAP)** sont des phytases végétales principalement présentes chez les légumineuses. Jusqu'à présent, on n'a pu purifier aucune enzyme PAP à partir de bactéries (Jorquera et al., 2008).

Les phytases des microorganismes, notamment celles des champignons sont appelées 3-phytases car elles divisent le plus souvent le groupement phosphate au carbone C1 ou C3 de l'anneau inositol (D-et L configuration). Alors que les phytases végétales sont appelées les 6-phytases et hydrolysent le site d'initiation de phosphate préférentiellement au niveau du carbone C6 (Maougal, 2014).

La température optimale d'action de la plupart des phytases végétales et microbiennes se situe entre 45° et 60° C (Maougal, 2014).

### **I.3.5. Intérêt et rôles des phytases**

Les phytases sont abondantes dans la nature de sources différentes (micro-organismes, végétaux et dans certains tissus des animaux) dont le rôle varie d'un organisme à un autre (Maougal, 2014)

Les plantes en synthétisant leur phytases, réutilisent les réserves de Pi contenues dans le phytate des graines au moment de la germination de ces dernières (Plassard et al., 2015). Elles ne sécrètent pas de phytases dans le milieu externe et de ce fait sont incapables d'utiliser le phytate comme seule source dans le sol (Richardson et al., 2001).

Chez les micro-organismes, les phytases sont produites en réponse à une déficience en P. Elles sont plus présentes dans la rhizosphère qui abrite plus de bactéries minéralisatrices du phytate que dans le sol non-rhizosphérique (Jorquera et al., 2008 ; Maougal et al., 2014).

L'utilisation de phytases microbiennes présente une stratégie prometteuse pour améliorer la nutrition des plantes en P en mobilisant les réserves de phytate dans les sols déficients en P (Plassard et al., 2015).

**I.3.6. Effet de la déficience en P sur la plante et sur la fixation symbiotique de l' $N_2$**

De nombreuses études ont abordé le comportement des plantes en conditions de déficience en P, pour comprendre les différentes stratégies hautement spécialisées mises en place en réponse à cette déficience et ce par (i) la libération d'exsudats racinaires incitant la microflore à minéraliser le P organique (**Spohn et al., 2013**), (ii) la modification de la structure racinaire de façon à augmenter la surface d'exploration et d'absorption (**Hammod et al., 2004**), (iii) la sécrétion de phosphatases acides pourpres (**Plassard et al., 2015**), (iv) l'expression de gènes spécifiques augmentant chez les plantes l'acquisition et l'utilisation efficace du P (**Rani et Goel., 2012**)

La déficience en P dans le sol affecte considérablement la fixation de l'azote atmosphérique (**Latati et al., 2014**). Ainsi, le nombre, la taille et la biomasse nodulaire sont fortement diminués (**Kouas et al., 2005**).

L'activité de la nitrogénase est fortement corrélée à la disponibilité en P, elle augmente considérablement dans les nodules des légumineuses cultivées avec un apport de P (**Olivera et al., 2004**).

## CHAPITRE II

**Effet de l'inoculation et des régimes de phosphore sur la fixation symbiotique de l'azote et l'efficacité de l'utilisation du phosphore chez le niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) en Algérie****II.1. Introduction**

Les légumineuses, en tant que source fixatrice d'azote atmosphérique, jouent un rôle environnemental majeur dans les systèmes de culture, en réduisant l'utilisation d'engrais chimiques (Graham, 2008). Le niébé est une légumineuse importante dans l'alimentation humaine et animale (Murillo-Amador et al., 2006, Goenaga et al., 2008).

En Algérie, le niébé est principalement utilisé pour la consommation domestique et pour ses propriétés thérapeutiques. Ghalmi et al. (2010), ont étudié différentes accessions en provenance de deux régions, la Kabylie (Tizi-ouzou) et les oasis Sahariennes (El Gole'a, Adrar). Ils ont pu identifier deux groupes de cultivars le *Melanophthalmus* en Kabylie et le *Biflora* au Sahara.

La fixation symbiotique de l'azote (FSN) qui consiste en la conversion de l'azote atmosphérique en ammoniac se déroule uniquement dans les nodules, ces derniers sont formés spécifiquement au niveau des racines des macrosymbiotes (légumineuses) en réponse aux microsymbiotes bactériens (Beattie, 2007). La FSN est très sensible aux stress environnementaux, tels que les carences en phosphore (Drevon et Hartwig, 1997). L'exigence en P des légumineuses est augmentée lorsque la légumineuse dépend de la fixation de N<sub>2</sub> (Leidi et Rodriguez-Navarro, 2000 ; Gentili et Huss-Danell, 2003). La croissance des nodules est plus sensible à la carence en P que la croissance des plantes (Drevon et Hartwig, 1997). Ainsi, une carence en P conduit à un retard de nodulation (Kouas et al., 2005). En effet, la FSN est un processus énergétiquement coûteux qui nécessite plus de P inorganique que d'assimilation d'azote minéral (Vadez et Devon, 2001).

Le phosphore (P) est l'un des éléments nutritifs les plus importants après l'azote limitant la croissance des plantes (Deubel et Merbach, 2005, Richardson et al., 2009). La faible fertilité des sols en phosphore peut être due à la faible teneur en phosphore total, en particulier dans les sols à faible teneur en matière organique. La faible disponibilité de P est

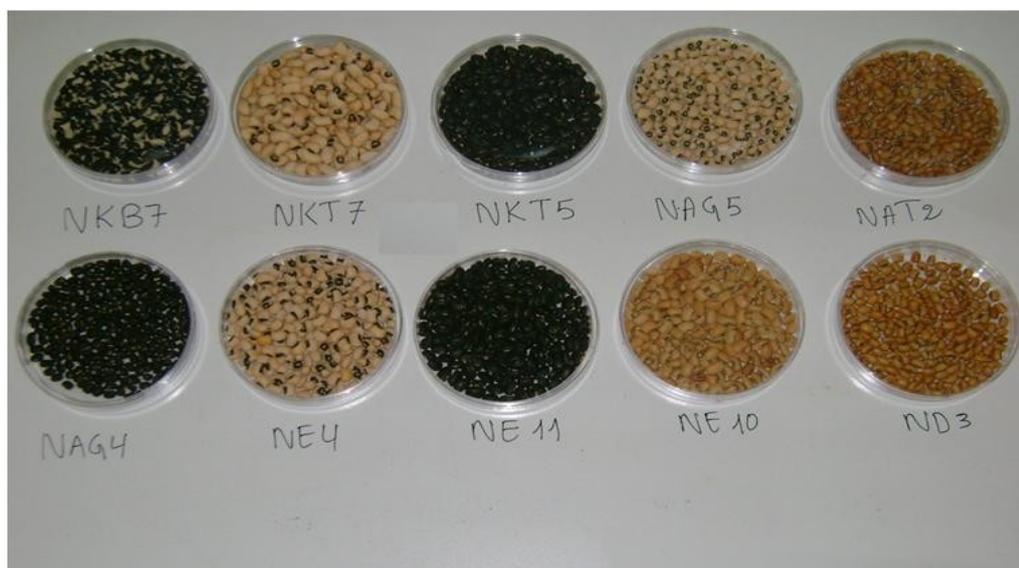
souvent due à la présence de cations tels que Ca, Al ou Fe le rendant insoluble (Alkama et al., 2012).

Cette étude consiste à déterminer si l'origine géographique des accessions affecte l'efficacité d'utilisation du phosphore (EUP) chez le niébé en Algérie. Le but est de caractériser les différentes accessions capables d'établir une symbiose avec les rhizobia et leur efficacité à fixer l'azote atmosphérique du sol d'une part et d'évaluer leur tolérance à la déficience en P d'autre part.

Ce chapitre fait l'objet d'un article (Under Press) publié dans la revue *Agronomy Research* (Annexe 1).

## II.2. Matériel et méthodes

L'étude a été menée au cours de l'année 2013-2014 à la station expérimentale de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure Agronomique) d'Alger (36 ° 30. 50 'N), comprenant dix accessions de niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) (Fig. 4), provenant de différentes régions de l'Algérie (Adrar, Bejaia, Djanet, Tizi-Ouzou et El Kala,) et obtenues à partir de la collection du laboratoire AIPV (Ghalmi et al., 2010). Les caractéristiques des graines sont données dans le tableau 1.



**Figure 4.** Accessions de niébé utilisées.

**Tableau 1.** Principales caractéristiques morphologiques des accessions de niébé utilisées.

	<b>Origine</b>	<b>Couleur des graines</b>	<b>Couleur de l'œil</b>	<b>Forme de la graine</b>	<b>Texture tégumentaire</b>	<b>Taille de la graine (mm)</b>	<b>Poids de 100 graines (g)</b>
<b>NKB7</b>	Bejaia	Holstein	Absent	Réniforme	Lisse	9	23,46
<b>NKT7</b>	Tizi-Ouzou	Crème	Noir	Réniforme	Lisse	12	27,34
<b>NKT5</b>	Tizi-Ouzou	Noir	Absent	Ovoïde	Lisse	5	7,83
<b>NAG5</b>	Adrar	Crème	Noir	Ronde	Lisse à rugueuse	5	14,38
<b>NAT2</b>	Adrar	Marron	Absent	Ovoïde	Lisse	4	10,82
<b>NAG4</b>	Adrar	Noir	Absent	Ovoïde	Lisse	4	9,49
<b>NE4</b>	EL-Kala	Crème	Noir	Ronde	Lisse	5	14,87
<b>NE11</b>	EL-Kala	Noir	Absent	Ovoïde	Lisse	6	15,33
<b>NE10</b>	EL-Kala	Marron	Absent	Ovoïde	Lisse	5	13,43
<b>ND3</b>	Djanet	Beige	Absent	Rhomboides	Lisse	4	10,1

### II.2.1 Le sol

Le sol utilisé pour cette étude provient de l'ITCMI situé dans la région de Staoueli. Le choix du sol est basé sur sa déficience en phosphore.

Le sol a fait l'objet d'analyses physico-chimiques (granulométrie, pH et conductivité électrique (CE), teneur en CaCO<sub>3</sub>, N-Total, P-Total et P-Olsen), les propriétés granulométriques et chimiques du sol expérimental sont présentées dans le tableau 2.

L'essai est mené dans des pots contenant 10 Kg de sol préalablement tamisé et désinfecté à l'aide d'un stérilisateur humide, les dimensions des pots sont de 25 cm de hauteur et 15 cm de diamètre.

**Tableau 2.** Propriétés granulométriques et chimiques du sol utilisé.

	Paramètres d'analyse	Teneurs	Méthodes d'analyse	Normes	Interprétations
<b>Granuloétrie</b>	Argiles (%)	20,3			
	Limons (%)	21,5	Méthode internationale par la pipette de ROBINSON	Triangle des textures de Henin	Sol à texture Sablo-limono-argileuse (AFNOR, 1987)
	Sables (%)	58,2			
	Calcaire total (%)	13,53	Méthode volumétrique par le calcimètre de BERNARD	12,5-25	Sol moyennement calcaire (AFNOR, 1987)
	Calcaire actif	0,24	Brouineau	< 5	Risque faible de chlorose
	pH-eau	8,1	Méthode électrométrique par le pH-mètre	7,75-8,5	Sol alcalin (AFNOR, 1987)
	Conductivité électrique CE <sub>1/5</sub> (mS/cm)	0,17	Conductimètre	< 1	Sol non salin (AFNOR, 1987)
	Azote total (%)	0,07	Méthode KJELDAHL	0,05-0,1	Sol pauvre en azote (AFNOR, 1987)
	Phosphore assimilable (ppm)	0,2	Olsen	0-5	Très basse
	P-total (mg/Kg)	235	Colorimétrique	0-300	Basse
	Carbone organique (%)	0,3	Méthode ANNE	-	-
	Matière organique (%)	0,516	C (%) x 1,72	< 1	Sol pauvre en MO
	Rapport C/N	4,28	-	< 9	Décomposition élevées de la matière organique

### II.2.2 Bactéries

Pour cette étude, deux isolats de bactéries (*Mesorhizobium sp.* (S1) à croissance rapide, *Bradyrhizobium sp.* (S2)) à croissance lente, provenant de la collection du labo AIPV sont utilisés. Ces bactéries sont multipliées sur un milieu d'agar à l'extrait de levure (YEAM) (Vincent, 1970). Les inoculums sont préparés dans YEAM liquide sans addition d'agar.

### II.2.3 Conditions de culture

Les dix accessions sont cultivées en serre sous trois régimes différents de P (P déficient (P0), P inorganique soluble sous forme de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (PP) ou P inorganique insoluble sous forme de phosphate tricalcique six fois hydraté ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2, 6\text{H}_2\text{O}$ ) (TCP), la dose de phosphate apportée a été calculée selon la norme (50kg/ha) correspondant aux exigences en P des légumineuses. Ces régimes sont combinés à quatre traitements d'inoculation (témoin sans inoculation (T), inoculés avec *Mesorhizobium sp.* (S1), *Bradyrhizobium sp.* (S2) ou co-inoculés (S1-S2)). Le dispositif expérimental adopté est un split plot avec quatre répétitions (comportant 480 pots).

Les graines de niébé sont stérilisées en surface en utilisant de l'éthanol pendant 10 secondes puis de l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 5 minutes; suivi de 10 lavages successifs d'eau distillée stérile (Vincent, 1970). Elles sont semées dans des pots en plastique désinfectés contenant 10 kg de sable stérile. Les plantules ont été inoculées en les enrobant avec 1 ml de culture bactérienne contenant  $10^8$  bactéries  $\text{ml}^{-1}$  et  $10^9$  bactéries  $\text{ml}^{-1}$  respectivement pour *Mesorhizobium sp.* et *Bradyrhizobium sp.* Une deuxième inoculation est effectuée 15 jours après semis.

### II.2.4 Collecte de données

Les prélèvements sont réalisés au stade pleine floraison, (qui est échelonné en fonction de la précocité des accessions), en séparant les parties aériennes des racines au niveau du collet. Les échantillons prélevés sont séchés à l'étuve pendant 48 h à 75°C et pesés. Les nodules sont détachés des racines, comptés, séchés à 75°C et pesés.

### II.2.5 Teneur en P de la plante

La teneur en P dans la plante (partie aérienne, partie racinaires et nodules) est déterminée par la méthode de la malachite verte après digestion avec les acides nitrique et perchlorique selon (Valizadeh et al., 2003). La teneur en P est calculée par la méthode de Betencourt et al. (2012).

### **II.2.6 Efficacité d'utilisation du phosphore EUP**

L'EUP représente l'efficacité de l'utilisation du phosphore par la plante, c'est le rapport entre le poids sec de toute la plante et la teneur en phosphore de la plante.

### **II.2.7 Analyses statistiques**

Le dispositif expérimental comporte trois facteurs :

**Facteur 1 :** Représente l'effet du P avec trois modalités de P0, PP et TCP.

**Facteur 2 :** Représente l'effet de la variation génotypique, avec dix accessions de niébé étudiées (NE4, NE10, NE11, NKT7, NKT5, NKB7, NAT2, NAG4, NAG5 et ND3),

**Facteur 3 :** Représente l'effet de l'inoculation, représenté par les traitements souche S1, souche S2, co-inoculation S1-S2 et du contrôle T,

Les effets de l'inoculation et de la nutrition P sur la croissance des plantes, la nodulation et la teneur en phosphore des plantes sont testés à l'aide de l'analyse de la variance multi-way ANOVA avec le logiciel R software version 3.0.2 (**R Core Team, 2013**) en utilisant Rcmdr package (**Fox, 2005**) et RcmdrPlugin.EZR (**Kanda, 2013**). Les moyennes sont comparées à l'aide du test de comparaison multiple de Tukey à un seuil de probabilité de 0,05. Les graphiques sont réalisés à l'aide de RcmdrPlugin.FactoMineR (**Husson et al., 2014**) et RcmdrPlugin.KMggplot2 (**Triad et Kengo, 2013**).

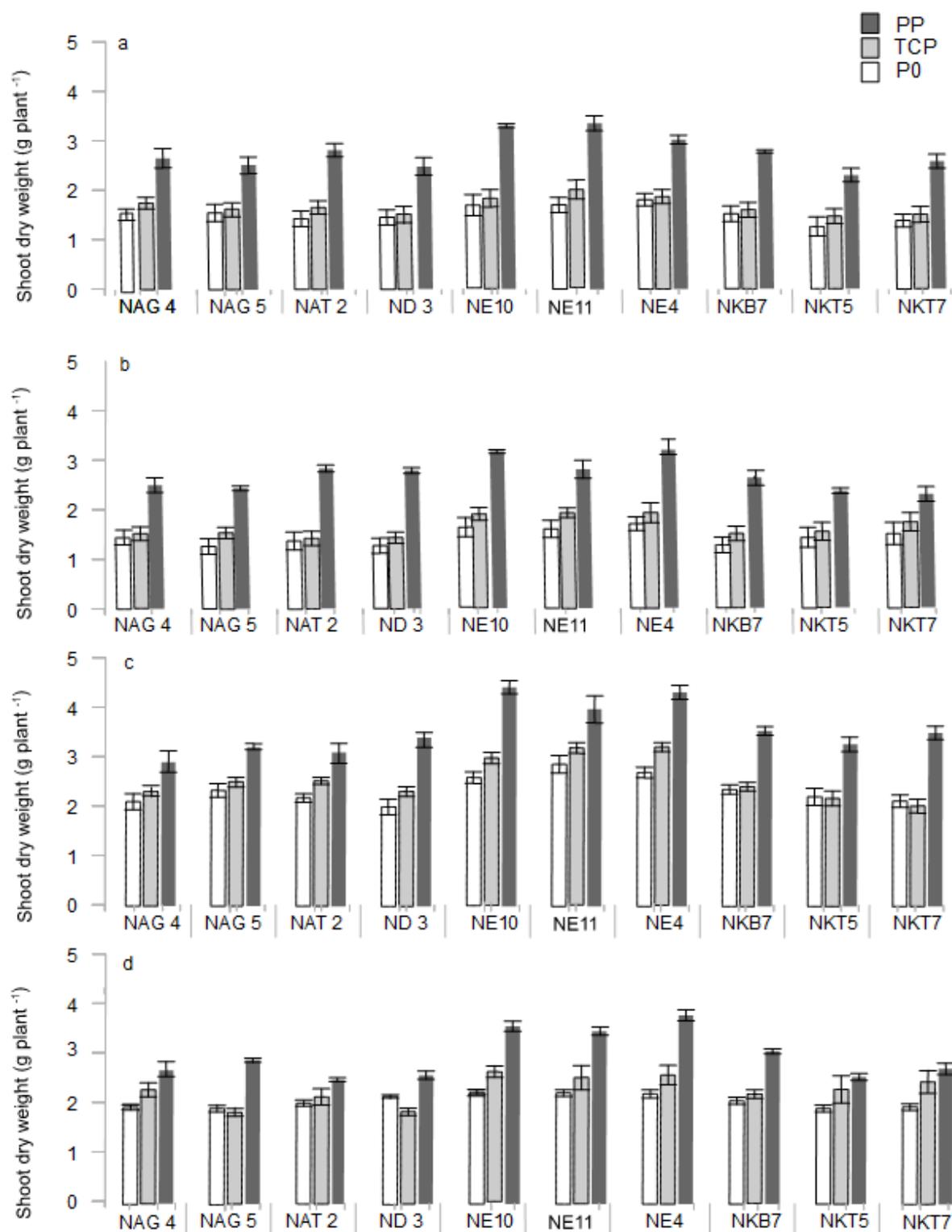
### II.3. Résultats et discussion

#### II.3.1 Effet de la déficience en P sur la croissance des plantes

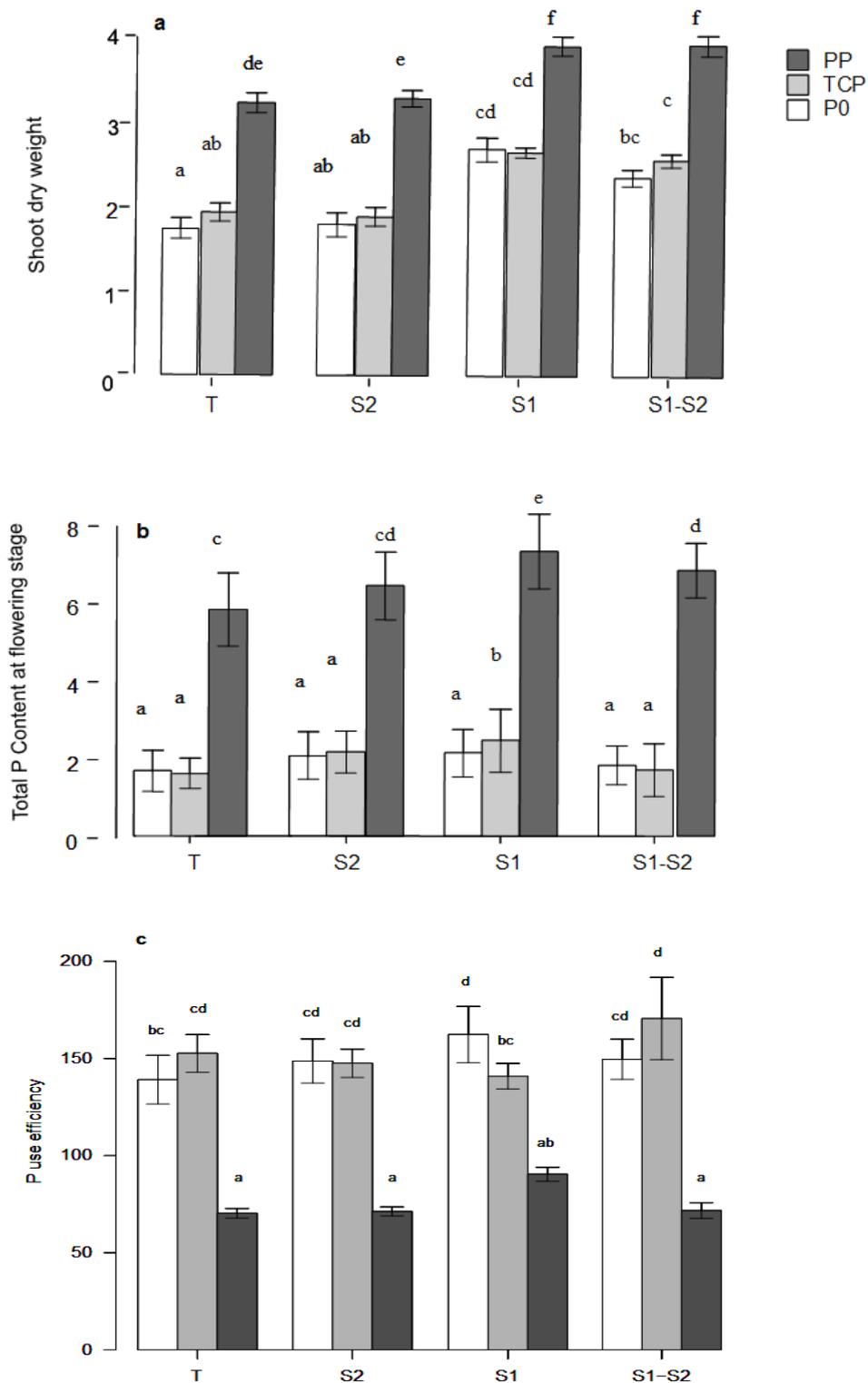
Afin d'évaluer l'effet de la déficience en P sur la croissance et la FSN, le poids sec de la partie aérienne des différentes accessions récoltées au stade floraison est mesuré et ce pour les différents types d'inoculation sous les régimes de P (**Fig. 5**). Les résultats de l'ANOVA du poids sec des parties aériennes sont présentés dans le tableau 1 (**Annexe 2**). L'ANOVA montre que les régimes de P, le type d'inoculation, les accessions de niébé, l'interaction entre les régimes de P et le type d'inoculation et l'interaction entre les régimes de P et les accessions affectent significativement le poids sec de la partie aérienne.

La figure 5 montre une grande variabilité entre les accessions associées à la souche rhizobienne pour la FSN. Le poids sec de la partie aérienne varie entre 1,4 et 3,2 g sDW pl<sup>-1</sup> pour NKT5 et NE11 à P0 (**Fig. 5a**), entre 1,2 et 3,1 g sDW pl<sup>-1</sup> pour NAG5 et NE11 pour l'inoculation S2 (**Fig. 5b**), entre 2 et 4,5 g sDW pl<sup>-1</sup> pour NAG4 et NE10 pour l'inoculation S1 (**Fig. 5c**) et entre 1,8 et 3,3 g sDW pl<sup>-1</sup> pour NAG5 et NE4 pour la co-inoculation S1-S2 (**Fig. 5d**). Sur la base de leur symbiose rhizobienne, seules les accessions NE10 et NE4 expriment le potentiel de production le plus élevé avec plus de 4 g sDW pl<sup>-1</sup> au stade floraison. De plus, cette étude révèle une variabilité considérable de la tolérance de la FSN à la déficience en P chez les accessions de niébé. En effet, la croissance sous TCP varie entre 1,3 et 3 g sDW pl<sup>-1</sup> respectivement chez les accessions du Sud et celles du nord de l'Algérie. Le meilleur comportement est enregistré pour les accessions NE4, NE11 et NE10 du nord de l'Algérie. La moyenne de sDW sous TCP pour ces accessions est 20% plus élevée que le reste (**Fig. 5**).

L'apport du P soluble entraîne une augmentation de la biomasse de la partie aérienne au stade floraison de 25% pour S1 et co-inoculation S1-S2 (**Fig. 6a**). En revanche, la baisse n'est pas significative pour les autres régimes P, avec moins de 10% pour l'inoculation S2 et le témoin non inoculé T. Cependant, l'inoculation S1 augmente respectivement de 22% et 30% le poids sec de la partie aérienne pour les traitements TCP et P0 (**Fig. 6a**). Alors que pour ces régimes P, la biomasse aérienne note une légère baisse avec l'inoculation S2.



**Figure 5.** Effet des régimes de P sur le poids sec de la partie aérienne des accessions sous contrôle (T) (a), inoculation (S2) (b), inoculation (S1) (c) et co-inoculation (S1-S2) (d). Les données sont les moyennes de 4 répétitions au stade floraison  $\pm$  ES.



**Figure 6.** Effet des régimes de P sur la biomasse aérienne (g plant<sup>-1</sup>) (a), la teneur totale en P (mg P g plante<sup>-1</sup> poids sec) (b) et l'EUP (poids sec P<sup>-2</sup> mg<sup>-1</sup> P) (c) au stade floraison. Les valeurs sont les moyennes de 24 répétitions. Les barres indiquent l'erreur standard. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

### **II.3.2 Variation de l'efficacité d'utilisation du phosphore pour la FSN**

Afin d'évaluer l'EUP des accessions, une première évaluation de l'impact de la déficience en P est réalisée en mesurant la teneur total en P des plantes. En fait, en réponse à une déficience en P, les plantes peuvent ajuster leurs besoins en P en optimisant l'efficacité d'utilisation du phosphore (EUP) en produisant globalement plus de biomasse par unité de P consommée, ce qui permet de fixer plus de N<sub>2</sub> par unité de P par la légumineuse (**Vadez et Drevon, 2001**).

Les résultats de l'ANOVA de la teneur total en P de la plante sont présentés dans le tableau 2 (**Annexe 2**).

La teneur totale en P au stade floraison est affectée significativement par le régime de P, les accessions, l'inoculation et l'interaction entre le régime P et l'inoculation. Sous PP, les concentrations totales en P augmentent respectivement de plus de 20% et de 16% pour S1 et la co-inoculation S1-S2 comparé au contrôle (T) (**Fig. 6b**). Sous TCP, les concentrations en P pour S1-S2 et T sont significativement basses par rapport à S1 (**Fig. 6b**). Cependant, l'inoculation S1 augmente la concentration en P pour les régimes TCP et T respectivement de 20% et 10% (**Fig. 6b**).

Les résultats de l'ANOVA de l'EUP sont présentés dans le tableau 3 (**Annexe 2**).

Les régimes de P, le type d'inoculation et l'interaction entre ces deux facteurs affectent significativement l'efficacité de l'utilisation du P. L'inoculation avec la souche (S1) augmente significativement l'EUP d'environ 8% et de 11% respectivement pour PP et P0 par rapport au contrôle non inoculé (T) (**Fig. 6c**). Cependant, l'efficacité d'utilisation de P diminue légèrement avec l'inoculation S2 pour le PP comparé à la co-inoculation S1-S2.

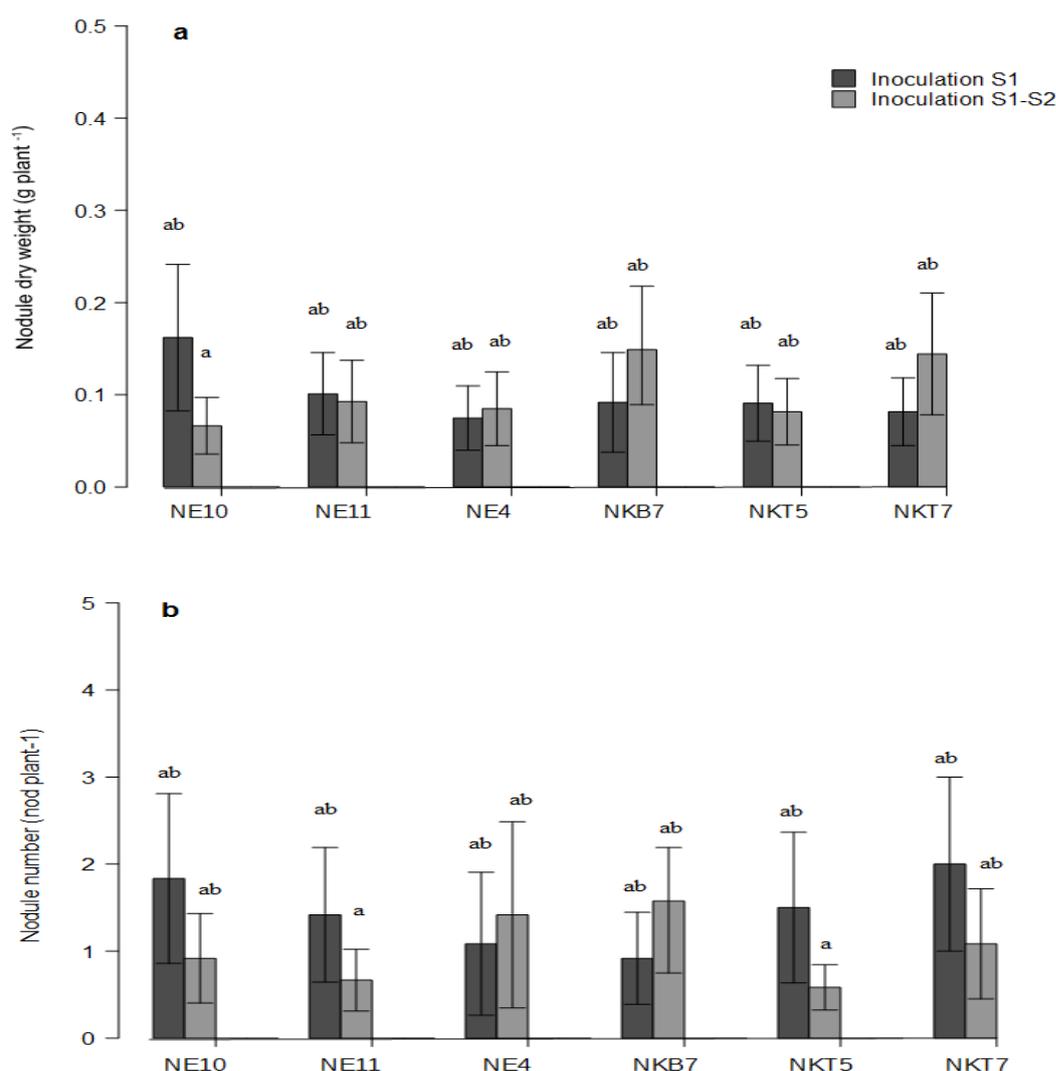
### **II.3.3 Effet de la déficience en phosphore sur la nodulation des plantes**

Afin d'évaluer l'effet de la déficience en phosphore sur la nodulation, la matière sèche et le nombre de nodules sont mesurés pour les différentes accessions récoltées au stade floraison (**Fig. 7**).

Les résultats de l'ANOVA du poids sec des nodules des six accessions qui ont nodulé sont présentés dans le tableau 4 (**Annexe 2**). Les accessions et le type d'inoculation affecte significativement le poids sec des nodules.

La nodulation n'est observée que sous PP pour les accessions provenant du nord de l'Algérie, à savoir; NE10, NE11, NE4, NKT7, NKB7 et NKT5. Une variation beaucoup plus importante du poids sec des nodules (nDW) est observée (**Fig. 7a**). Le poids sec des nodules nDW varie entre 50 et 180 mg nDW pl<sup>-1</sup> pour le traitement co-inoculation (S1-S2) et entre 80 et 230 mg nDW pl<sup>-1</sup> pour le traitement (S1).

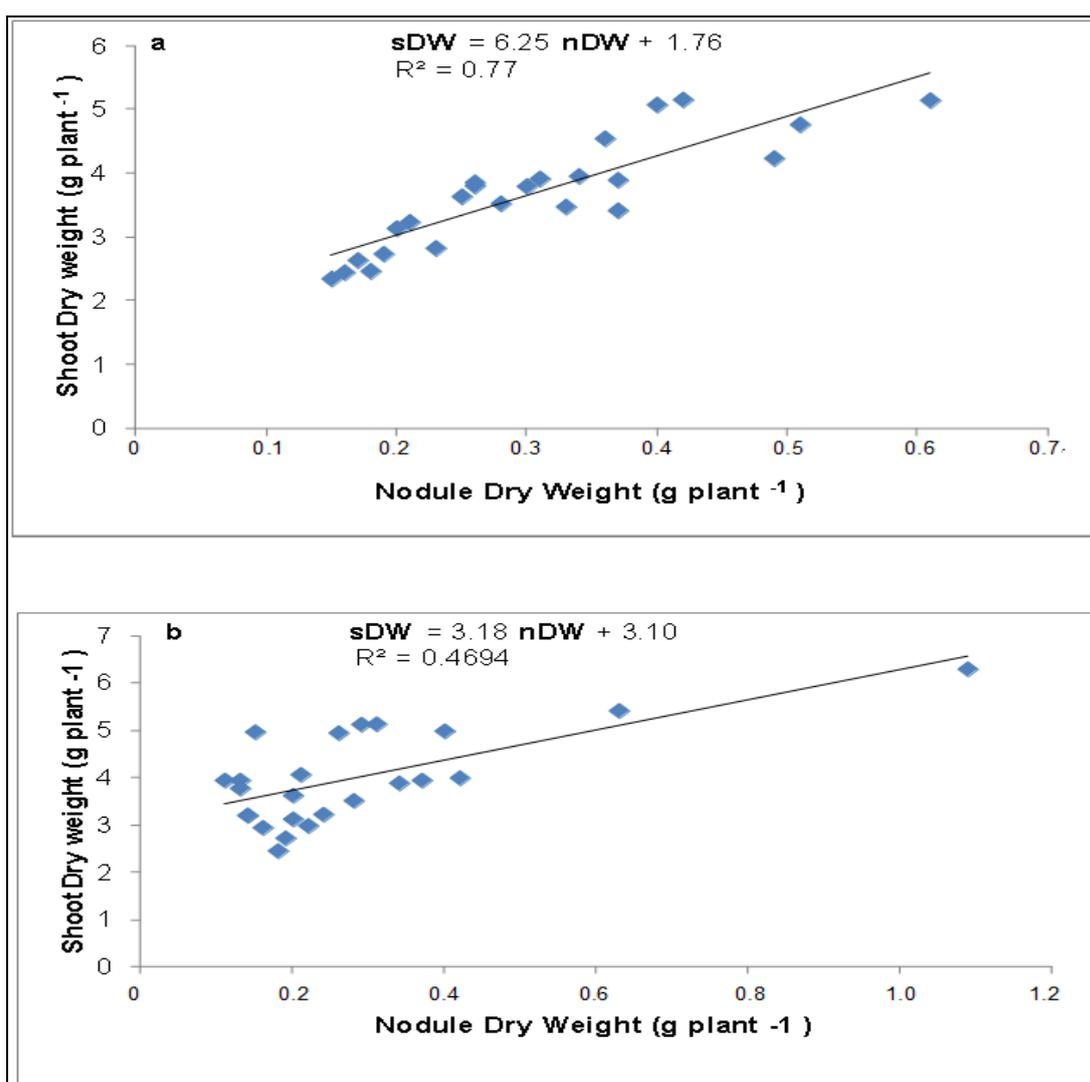
Le nombre de nodules (**Fig. 7b**), est également influencé significativement par le traitement P et le génotype du niébé. Les accessions NE10, NE11 et NKT7 montrent un nDW élevé pour l'inoculation (S1). Alors que NE4, NKB7 et NKT5 présentent un poids sec de nodules élevé pour la co-inoculation (S1-S2).



**Figure 7.** Effet de la nutrition en P sur le poids sec des nodules (g plante<sup>-1</sup>) (a) et le nombre de nodules (b) au stade floraison. Les valeurs sont les moyennes de 4 répétitions. Les barres indiquent l'erreur standard. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

### II.3.4 Efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne pour la croissance des plantes

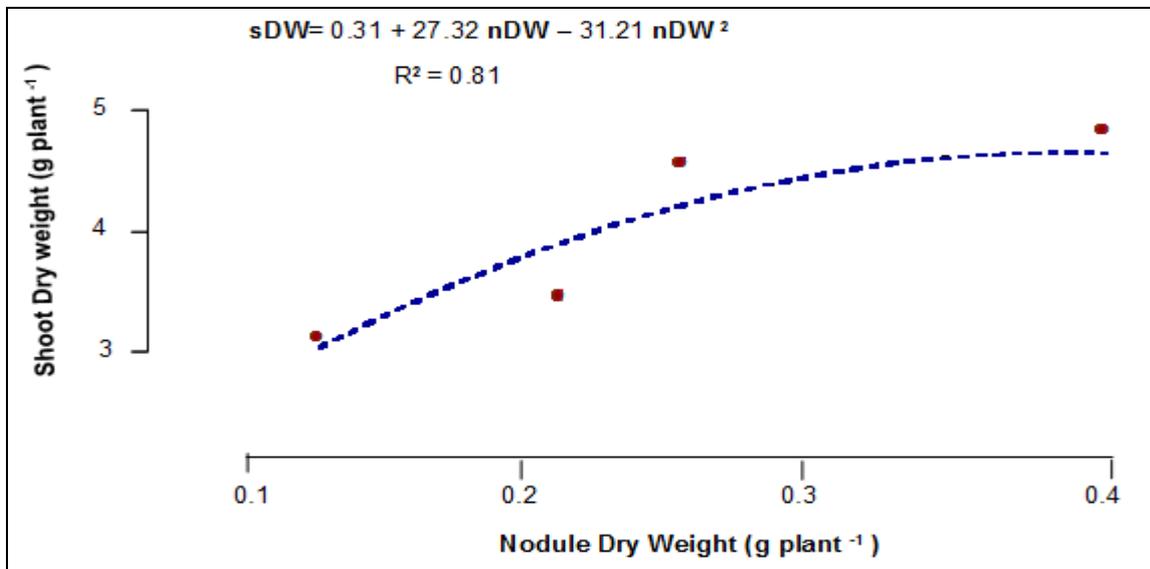
Afin d'évaluer l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EURS), les valeurs du poids sec des parties aériennes ont été corrélées par rapport à la biomasse nodulaire correspondante. Une estimation de l'EURS est d'abord réalisée pour toutes les accessions du Nord qui ont nodulées sous PP, avec la souche (S1) (**Fig. 8a**), ensuite pour la co-inoculation (S1-S2) (**Fig. 8b**), puis individuellement pour chaque accession (**Figure 9**).



**Figure 8.** Effet des régimes de P sur l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne chez les accessions du nord de niébé. Les données sont les moyennes de 24 répétitions au stade floraison à  $p < 0,05$ .

Pour toutes les accessions du nord, une corrélation positive est observée avec la souche (S1)  $R^2 = 0,77$  (**Fig. 8a**) et avec la co-inoculation (S1-S2)  $R^2 = 0,44$ .

Une corrélation positive  $R^2 = 0,81$  est observée entre les deux paramètres seulement pour NE10 sous inoculation S1 (**Fig. 9**).



**Figure 9.** Effet des régimes de P sur l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne pour chaque accession de niébé. Une régression significative n'a été observée que pour NE10 sous inoculation S1. Les données sont les moyennes de 4 répétitions au stade floraison à  $p < 0,05$ .

#### II.4. Discussion

Le but de cette recherche est d'étudier l'aptitude de dix accessions différentes de niébé à établir une symbiose avec les rhizobia et d'examiner leur tolérance vis-à-vis de la déficience en P.

La nodulation n'a pas eu lieu pour toutes les accessions, le processus est observé uniquement pour les accessions du nord sous régime PP et les inoculations incluant la souche S1 (**Fig. 7**). Ainsi, *Mesorhizobium sp.* (S1) est plus infective que *Bradyrhizobium sp.* (S2). Le manque d'infectivité de la souche S2 peut s'expliquer par le fait que les nodules racinaires des légumineuses peuvent contenir une série de bactéries incapables de noduler leurs hôtes (**Sprent, 2009**).

**Depret et Laguerre (2008)**, rapportent que différents rhizobia peuvent mieux infecter les racines des légumineuses et produire des nodules efficaces à différents stades du développement de l'hôte.

Cependant, la FSN avec la co-inoculation (S1-S2) sous PP montre une légère diminution par rapport à l'inoculation S1, ce qui peut s'expliquer par une compétition établie entre les deux souches de rhizobia. **Wielbo et al. (2007)**, ont démontré que la compétitivité est affectée par les facteurs édaphiques et les nutriments du sol (la disponibilité du phosphore).

L'absence de nodulation avec *Mesorhizobium sp.* (S1) sous TCP et P0 peut s'expliquer par le fait que les souches à croissance rapide semblent moins tolérantes aux faibles concentrations de P par rapport aux souches à croissance lente qui dépendent de P (**Raman et al., 2006**).

Les accessions provenant du Sud ne nodulent pas avec les deux souches de rhizobia utilisées montrant ainsi une capacité de FSN faible. Cela pourrait être attribué à leur domestication initiale favorisant un haut niveau de spécificité entre le génotype du niébé et souche rhizobienne. En effet, (S1) et (S2) sont des souches isolées des accessions adaptées du Nord.

La FSN chez les différentes accessions de niébé est influencée par la déficience en P. Ainsi, une carence en P affecte particulièrement la symbiose rhizobienne (**Attar, 2014**). En effet, le P semble être essentiel à la fois pour la nodulation et pour la fixation de l'azote (**Rai, 2006**).

L'augmentation de la croissance de la plante sous régime PP (**Fig. 5**) est probablement attribuée à l'amélioration de la nutrition en P (**Fig. 6**). En plus de la fixation d'azote, l'établissement des symbioses rhizobia-légumineuses se manifestent souvent par une augmentation de la teneur en phosphore de la plante (**Vessey, 2003**).

Le meilleur comportement des accessions NE4, NE11 et NE10 sous tous les régimes de P par rapport aux autres accessions peut être lié à l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation du phosphore.

En effet, l'une des stratégies employée par les plantes en réponse à la déficience en phosphore consiste à optimiser l'efficacité de l'utilisation du phosphore (EUP), qui est réalisée

en produisant une biomasse globale plus élevée par unité de P consommée, en fixant plus de N<sub>2</sub> par unité de P pour une légumineuse dépendante de la FSN (**Vadez et Drevon, 2001**).

Les résultats présentés dans la figure 8 révèlent une corrélation positive pour l'inoculation (S1) et la co-inoculation (S1-S2) sous régime PP entre le poids sec des nodules et le poids sec des parties aériennes. Cette corrélation peut indiquer que la fixation d'azote symbiotique est efficace dans des conditions de suffisance en P. L'augmentation de l'EURS suggère une forte régulation entre l'EURS et les besoins en P de la plante, probablement par rapport aux besoins énergétiques élevés du processus FSN (**Lazali et al., 2013**). Ces résultats corroborent les données précédemment publiées par **Attar (2014)**.

## **II.5. Conclusion**

Cette étude est axée sur l'impact de l'inoculation et des régimes de phosphore sur la fixation symbiotique de l'azote et l'efficacité de l'utilisation du phosphore chez les accessions de niébé en Algérie. Il en ressort que:

L'apport en P soluble (PP) favorise la croissance des plantes, leur teneur totale en P et leur nodulation.

- La souche *Mesorhizobium sp.* (S1) est meilleure en termes d'infectivité et d'effectivité que la souche *Bradyrhizobium sp.* (S2).

- Seules les accessions du nord présentent une nodulation avec le régime P soluble et les inoculations avec la souche *Mesorhizobium sp.* (S1).

- Les accessions NE4, NE11 et NE10 présentent une performance supérieure sous tous les régimes P avec l'inoculation S1. Par conséquent, elles peuvent être utilisées comme source de diversité génétique pour augmenter la productivité du niébé. Elles peuvent servir aussi pour améliorer l'EUP pour la FSN sous déficience en P. Ce travail montre également que l'origine géographique des accessions affecte considérablement la FSN et l'EUP de cette espèce.

## II.6. Références bibliographiques

- AFNOR 1984. Qualité des sols méthodes d'analyses. AFNOR, Paris, 131p.
- Alkama N., Ounane G. et Drevon J.J. 2012. Is genotypic variation of H<sup>+</sup> efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N<sub>2</sub>-Fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.)?. Journal of plant physiology 169, 1084–1089.
- Attar H.A. 2014. Phosphorus Availability and Proton Efflux of Nodulated-root Varies among Common-bean Genotypes (*Phaseolus vulgaris*) in Rhizobox. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology 7, 391–401.
- Beattie G.A. 2007. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In Plant-associated bacteria. Springer, Netherlands, pp.1–56.
- Betencourt E., Duputel M., Colomb B., Desclaux D. et Hinsinger P. 2012. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. Soil biology and Biochemistry 46, 181-190.
- Depret G. et Laguerre G. 2008. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* accessions nodulating pea. New Phytologist 179, 224–235.
- Deubel A. et Merbach W. 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Springer, Berlin, Heidelberg, pp.177–191.
- Drevon J.J. et Hartwig U.A. 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. Planta 201, 463–469.
- Fox J. 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. Journal of Statistical Software 14(9): 1–42.
- Ghalmi N., Malice M., Jacquemin J.M., Ounane S.M., Mekliche L. et Baudoin, J.P. 2010. Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. Genetic resources and crop evolution 57, 371–386.
- Goenaga R., Gillaspie V. et Quiles A. 2008. Assessing yield potential of cowpea genotypes grown under virus pressure. Hort Sci. 43, 673–676.

Graham P.H. 2008. Ecology of the root–nodule bacteria of legumes. In: Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I. et Newton W.E. (eds) Leguminous nitrogen–fixing symbiosis. Springer, Netherlands, pp.23–58

Gentili F. et Huss–Danell K. 2003. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. J. Exp. Bot. 54, 2757–2767.

Goenaga R., Quiles A. et Gillaspie A.G. 2008. Assessing yield potential of cowpea genotypes grown under virus pressure. HortScience 43, 673–676.

Husson F., Josse J. et Le S. 2014. RcmdrPlugin.FactoMineR: Graphical User Interface for FactoMineR. R package version 1.5-0. <http://CRAN.R-project.org/package=RcmdrPlugin.FactoMineR>. Leidi E.O. et Rodriguez–Navarro D.N. 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. New Phytol. 147, 337–346.

Kanda Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software {EZR} for medical statistics. Bone Marrow Transplantation 2013; 48:452–458, advance online publication, December 3, 2012.

Kouas S., Labidi N., Debez A. et Abdelly C. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. Agron. Sustain. 25, 389–393

Murillo–Amador B., Troyo–Diéguez E., García–Hernández J.L., López–Aguilar R., Ávila–Serrano A.G., Zamora–Salgado S., Rueda–puente E.O. et Kaya C. 2006. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. Hort Sci. 108, 423–431.

Rai M. 2006. Handbook of microbial biofertilizers. CRC, New York, USA, 385p.

Raman N., Selvaraj T. et Rai M. 2006. Tripartite relationship of Rhizobium, AMF, and host in growth promotion. In: M. Rai (Eds). Handbook of Microbial Biofertilizers, New York, USA, pp.51–88.

R Core team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Richardson A.E., Hocking P.J., Simpson R.J. et George T.S. 2009. Plant mechanisms to optimize access to soil phosphorus. Crop Pasture Sci. 60, 124–143

Sprent J. 2009. Legume nodulation. John Wiley & Sons, United Kingdom, pp.36–45.

Triad S. et Kengo N. 2013. RcmdrPlugin.KMggplot2: An Rcmdr Plug-In for Kaplan-Meier Plots and Other Plots by Using the ggplot2 Package. R package version 0.2-0. <http://CRAN.R-project.org/package=RcmdrPlugin.KMggplot2>.

Vadez V. et Drevon J.J. 2001. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21, 691–699.

Valizadeh G.R., Rengel Z. et Rate A.W. 2003. Response of wheat genotypes efficient in P utilization and genotypes responsive to P fertilisation to different P banding depths and watering regimes. *Australian Journal of Agricultural Research* 54, 59–65.

Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* 255, 571–586.

Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *International Biological Programme Handbook n°. 15*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73-97.

Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Kubik-Komar A. et Skorupska A. 2007. Increased metabolic potential of *Rhizobium spp.* is associated with bacterial competitiveness. *Canadian journal of microbiology* 53, 957–967.

## CHAPITRE III

**Caractérisation et diversité génétique des souches de rhizobia nodulant le niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) en Algérie.****III.1. Introduction**

Le niébé est considéré comme étant l'une des principales légumineuses d'importance économique et alimentaire dans le monde destinée à combler les déficits protéiques enregistrés en Afrique et dans les pays en voie de développement (Cobbinah et al., 2011 ; Brice et al., 2016).

Le niébé, comme toutes les légumineuses, est capable de fixer l'azote atmosphérique en réduisant l'azote atmosphérique en ammoniac par la nitrogénase des bactéries symbiotiques nodulaires (Schilizzi et Pannell, 2001).

L'étude de la diversité des ces bactéries a été largement documentée en se concentrant sur le gène 16SADNr pour l'ARN ribosomique à partir de phylotypes connus pour fixer l' $N_2$  (Simonet et al., 1991), ou sur des gènes d'azote tel que le gène *nifH* (Poly et al., 2001). Ainsi, la base de données pour le gène *nifH* est devenue l'une des plus grandes de gènes fonctionnels après celle du 16S (Philippot and Germon, 2005). En plus des techniques moléculaires, la caractérisation des rhizobiums peut être réalisée par plusieurs outils ; biochimiques en utilisant les galeries api 20 NE (Shetta et al., 2001) et physiologiques tel que la résistance à la salinité et à la température (Zahran, 1991).

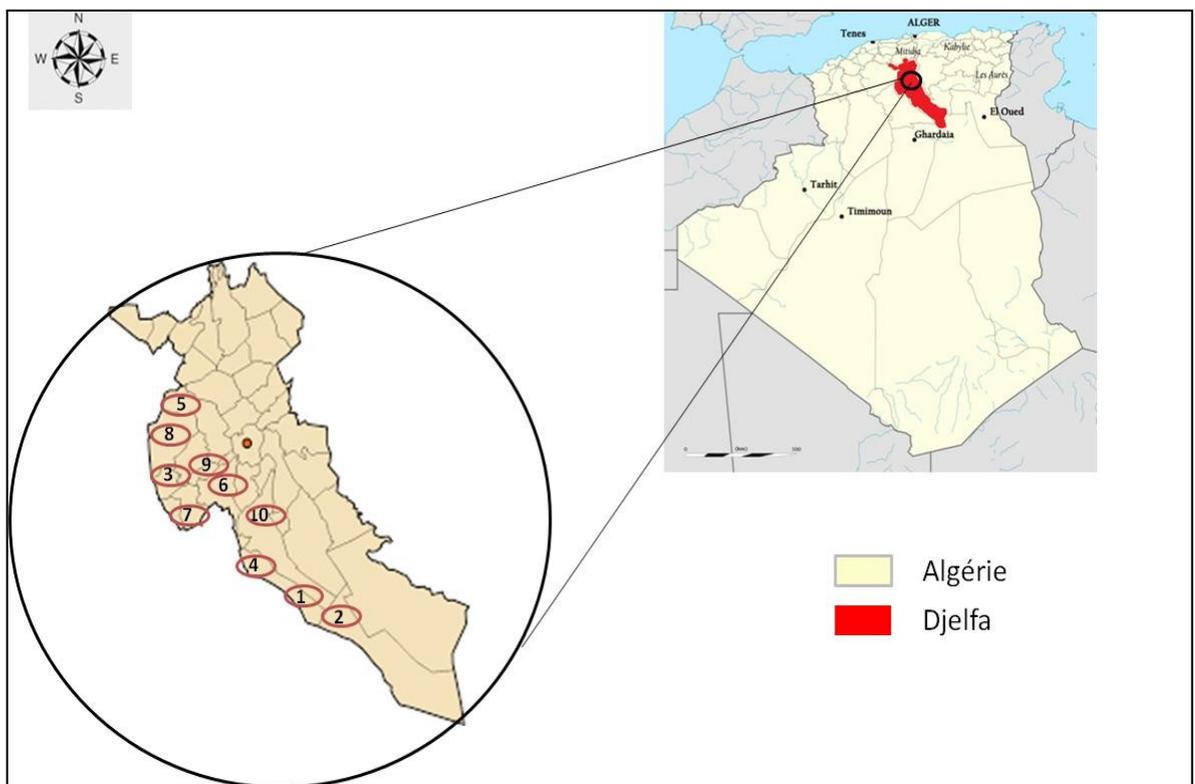
Les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote ont le potentiel de réduire notre dépendance globale vis-à-vis des engrais azotés. Leur utilisation représente un enjeu économique considérable en tant que biofertilisants (Zahran, 2001).

Dans ce contexte, une collection de souches isolées à partir de nodules du niébé est constituée à partir de sols collectés dans la région de Djelfa. L'étude de leur diversité est réalisée par (i) une caractérisation biochimique avec des galeries Api 20NE (ii) un test de tolérance à diverses contraintes abiotiques (température, pH et salinité) et (iii) une caractérisation moléculaire avec les gènes 16S et *nifH*.

### III.2. Matériel et méthodes

#### III.2.1. La collecte des échantillons de sol et piégeage

Dans le but d'avoir une collection comportant un maximum de diversité de souches rhizobienne nodulant le niébé, un piégeage est réalisé au niveau de la région de Djelfa (**Fig. 10**). Les différents sites d'échantillonnages ainsi que le précédent cultural correspondant à chaque site sont représentés dans le tableau 3.



**Figure 10.** Zone d'étude et localisation des sites d'échantillonnage

Le sol est prélevé à une profondeur de 20 cm à l'aide d'une tarière. Ce sol fait l'objet d'une série d'analyses physico-chimiques par la suite (granulométrie, pH, conductivité électrique (CE), teneur en CaCO<sub>3</sub>, N-Total, P-Total et P-Olsen).

La Wilaya de Djelfa se situe dans les hauts plateaux de l'Algérie, c'est une région à vocation pastorale, caractérisée par un climat semi-aride où les précipitations sont comprises entre 300 et 400 mm, l'hiver est froid et rigoureux et l'été est chaud et sec. Les vents sont intenses et fréquents (siroccos). Le printemps est caractérisé par les gelées tardives.

**Tableau 3.** Sites des prélèvements du sol et leurs précédents culturaux correspondants

Sites	Commune	Précédent cultural
Site1	Sedrehal	Luzerne
Site2	Guettara	Luzerne
Site3	El Idrissia	Haricot
Site4	Deldoul	Luzerne
Site5	Zaafran	Luzerne
Site6	Tadmit	Fève
Site7	Douis	Fève
Site8	El Guedid	Luzerne
Site9	Charef	Luzerne
Site10	Messaad	Haricot+Lentille

### **III.2.2. Matériel végétal et conditions de culture**

La population NKB7 est utilisée pour cet essai dont les caractéristiques sont évoquées dans le chapitre précédent. L'essai a été mené dans des pots contenant 3,5 Kg de sol préalablement tamisé. Le semis est effectué à raison de trois graines par pot. L'irrigation est assurée manuellement d'une manière régulière.

Le dispositif expérimental adopté est une randomisation totale avec trois répétitions comportant un seul facteur (site du prélèvement du sol).

### **III.2.3. Prélèvement et stérilisation des nodules**

Les plantes sont déterrées en pleine floraison, les nodules sont détachés des racines, rincés à l'eau distillée puis sont conservés au frais dans des tubes contenant du CaCl<sub>2</sub> duquel ils sont séparés par du coton cardé.

Les nodosités racinaires récoltées sont immergées en premier lieu dans de l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 min puis dans de l'éthanol pur à 96° durant 5 min suivi de dix rinçages successifs à l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

#### **III.2.4. Isolement des souches**

Les nodules ainsi traités sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile sur des boîtes de Petri contenant du milieu Yeast Extract Mannitol (YEM) gélosé (Vincent, 1970). A partir du jus nodulaire, des stries d'épuisement sont effectuées sur le milieu gélosé. Toutes les boîtes sont mises à incuber à 28°C, la durée de l'incubation varie selon le type de croissance des isolats.

#### **III.2.5. Vérification de la pureté des souches**

Afin de purifier les isolats, des repiquages successifs sur milieu YEM sont réalisés. Des colonies isolées sont ensemencées et incubées à 28°C pendant 48 à 120 h. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de cultures pures.

Afin de confirmer le gram des souches isolées, le test au KOH Lanta Shushan *et al.* (1981) est pratiqué, c'est une technique qui consiste à mettre une colonie isolée en contact avec une goutte d'une solution de KOH 3 %. Une minute après, le mélange est soulevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile; s'il y a formation d'un filament entraîné par la pipette, alors la colonie isolée est une bactérie à gram négatif, dans le cas contraire c'est une bactérie à gram positif.

#### **III.2.6. Test de la tolérance au pH, à la salinité et à la température**

Après purification et multiplication des souches, on prépare deux séries de tubes à essai contenant 10 mL de milieu de culture YEM liquide non gélosé ;

- La première série pour vérifier la tolérance des souches au pH (2 ; 4 ; 7 ; 10 et 12) ;
- La seconde série pour vérifier la tolérance des souches à la salinité contenant des concentrations croissantes de NaCl (1% ; 4% ; 8% ; 11% et 15%).

Chaque tube est inoculé avec 1mL d'une pré-culture fraîche de  $10^8$  bactéries mL<sup>-1</sup>, puis incubées à 28°C avec agitation rotative 100 tours/min avec trois répétitions pour chaque tube et ce pour les deux séries. Après 120 h d'incubation, la croissance des souches est estimée en mesurant la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 620 nm.

Afin de vérifier la tolérance de ces souches à différentes températures, chaque bactérie est ensemencée sur des boîtes de Petri contenant du milieu YEM gélosé et incubée à différentes températures (4°C ; 10°C ; 18°C ; 28°C et 38°C) durant une semaine avec 3 répétitions pour chaque température.

### III.2.7. Caractérisation biochimique

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. En tout, le système comprend 21 tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. Le mode opératoire est détaillé en **Annexe 3**.

### III. 2.8. Caractérisation moléculaire

#### a. Extraction de l'ADN

Afin de vérifier la présence de certains gènes fonctionnels chez les souches isolées, l'extraction d'ADN est requise pour réaliser les PCR (Polymerase Chain Reaction). Pour chaque souche, l'ADN est extrait à partir du culot bactérien obtenu par centrifugation. La méthode d'extraction est effectuée en utilisant le Kit MP Biomedicals Soils dont le protocole est optimisé pour les cultures bactériennes, le protocole détaillé se trouve au niveau de l'Annexe 3. L'ADN est ensuite dosé au pico-green. Pour une PCR d'un volume final de 20  $\mu$ L, 10 à 50 ng d'ADN matrice sont utilisés.

#### b. Amplification du Gène ADNr 16S

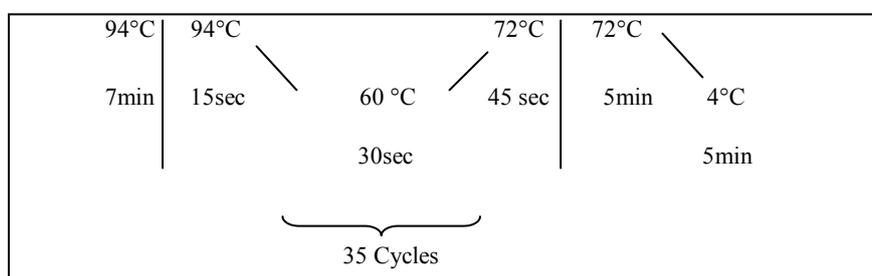
La séquence partielle de l'ADNr 16S comprenant les régions V1-V8, est vérifiée pour l'ADN de chaque bactérie individuellement en utilisant les amorces universelles BAC 27f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') et BAC 1492r (5' CGG TTA CCT TGT TAG ATT 3'). Le programme PCR est effectué comme recommandé par **Rahman et al. (2011)**. La taille de l'amplifiat attendue est 1446 pb.

#### c. Amplification du gène *nifH*

Le gène *nifH* est amplifié en utilisant les amorces PoIF (5' GCT CAT GCA CGT GCC ACT CTA C 3') et PoIR (5' GCT TAT ATT AGT GAC CGG AGG 3') (**Poly et al., 2001**). La composition du Mix PCR (**Tableau 4**) ainsi que le programme PCR sont optimisés de manière à avoir un seul amplicon par puits et donc par bactérie (**Fig. 11**). L'eau ultra pure stérile a été utilisée comme témoin négatif. La taille d'amplicon attendue est 359 pb.

Tableau 4. Mix PCR par tube pour un volume de 20µl final.

Constituants	Volume
<b>5X green Buffer</b>	4 µL
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	1,2 µL
<b>dNTP</b>	0,4 µL
<b>PolF (10 µM)</b>	1 µL
<b>PolR (10 µM)</b>	1 µL
<b>ADN (10 à 50 ng)</b>	2 µL
<b>GoTaq</b>	0,1 µL
<b>Water</b>	10,3 µL

Figure 11. Programme PCR optimisé du gène *nifH*

#### d. Révélation

Après la PCR, pour chaque échantillon, 3 µL du tampon de charge à 6X sont rajoutés à 5 µL de produits de PCR et puis déposés sur un gel d'agarose à 1,5% dans une cuve contenant du TAE (Tris-Acétate, EDTA) à 1X. Après migration pendant 30 min à 120 V, le gel est trempé dans un bain de Bromure d'Ethidium pendant 15 min et visualisé par la suite sous UV et la photo est capturée avec le programme BioCapt. La taille du fragment d'intérêt est décelée grâce à un marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA Ladder, Promega).

#### e. Séquençage et analyses des données

Les amplicons de l'ADNr 16S et du gène *nifH* sont purifiés et séquencés au laboratoire Beckman, Genewiz (Angleterre). Les séquences obtenues sont nettoyées en utilisant le logiciel "MEGA v5.2". La haute qualité résultante des séquences est analysée en

utilisant BLASTn pour vérifier leur homologie avec les séquences de la banque des gènes de NCBI (**National Center for Biotechnology Information**). Le programme BLAST permet d'aligner nos séquences ADNr 16S avec les séquences ADNr 16S qui lui sont homologues. En fin d'alignement, BLAST propose un ensemble de séquences ADNr qui ont un taux d'identité (% de ressemblance) total ou presque. Un nom systématique est attribué alors à chaque isolat en fonction du taux le plus élevé proposé par la banque des gènes.

Les séquences d'ADN des deux gènes sont assemblées et alignées en utilisant l'algorithme CLUSTAL W dans le logiciel MEGA v5.2. Les relations phylogénétiques sont construites en utilisant la méthode de Neighbour-joining (**Willems, 2006**) et de maximum de vraisemblance (**Kaneko et al., 2000**). Les arbres phylogénétiques sont construits en utilisant le modèle à 2 paramètres de Kimura (**Moulin et al., 2004**) présent dans le logiciel MEGA v5.2.

**III.3. Résultats et discussion**

**III.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols**

Les principales caractéristiques des sols sont représentées dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Analyses physico-chimiques et granulométriques des sols

Paramètres d'analyse	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6	Site 7	Site 8	Site 9	Site10	
<b>Argiles (%)</b>	21,23	38,79	21,58	48,58	5,5	7,9	36,25	47,69	46,58	19,57	
<b>Limons fins (%)</b>	39,2	7,5	8,5	7,9	17,5	28,6	17,5	8,5	7,5	9,5	
<b>Limons grossiers (%)</b>	12,98	4,35	44,6	24,5	37,95	37,47	16,47	6,25	11,25	57,27	
<b>Sables fins (%)</b>	4,98	34,5	10,58	11,25	28,37	13,25	21,58	27,56	27,85	7,5	
<b>Sables grossiers (%)</b>	21,61	14,86	14,74	9,77	10,68	12,78	8,2	10	6,82	6,16	
<b>Calcaire total (%)</b>	12,51	9,42	12,35	23,12	14,10	8,15	4,50	17,25	16,09	5,70	
<b>Calcaire actif</b>	3,24	1,91	3,68	6,27	3,88	1,34	/	4,74	4,56	0,04	
<b>pH-eau</b>	6,1	8,2	8,3	6,5	8,8	4,6	8,1	5,2	6,8	7,9	
<b>pH</b>	<b>pH-KCl</b>	5,65	7,35	7,95	5,93	7,98	3,95	7,59	4,75	6,2	7,65
	<b>pH-eau-pH-KCl</b>	0,45	0,85	0,35	0,57	0,82	0,65	0,51	0,45	0,6	0,25
<b>Conductivité électrique</b>											
<b>CE<sub>1/5</sub> (mS/cm)</b>	0,17	0,13	0,18	0,24	0,21	0,12	0,11	0,19	0,16	0,1	
<b>Azote total (%)</b>	2,1	3,07	3,27	1,97	2,7	1,01	0,72	1,47	1,57	1,17	
<b>Phosphore assimilable (ppm)</b>	61,22	91,78	59,45	23,57	45,25	94,078	125,2	37,45	40,95	119,78	
<b>Carbone organique (%)</b>	1,3	2,62	1,41	1,52	1,71	1,8	1,51	2,3	1,90	1,67	
<b>Matière organique (%)</b>	2,236	4,506	2,425	2,597	2,941	3,096	2,597	3,956	3,268	2,872	

D'après les résultats d'analyse des sols des différents sites et en se référant aux normes d'interprétations internationales **AFNOR (1984)** ; les sites 1, 3, 4 et 7 présentent une texture limono-argilo-sableuse, les sites 2, 8 et 9 présentent une texture argilo-sableuse, tandis que les sites 5, 6 et 10 présentent une texture limono-argileuse.

Tous les sites sont calcaires à l'exception du site 7. Les sites 1, 4, 6 et 8 ont un pH acide, les sites 2, 3, 5, 7 et 10 présentent un pH alcalin, alors que le site 9 présente un sol à pH neutre. La teneur en matière organique est faible pour tous les sites. Par ailleurs, la teneur en phosphore assimilable est très élevée pour les sites 2, 6, 7 et 10 et modérée pour le reste des sites. La teneur en azote totale est élevée pour tous les sites.

### **III.3.2. Evaluation du pouvoir nodulant des sols**

Afin que les performances symbiotiques des plantes puissent être comparables, toutes les plantes sont déterrées en pleine floraison en vue d'évaluer le pouvoir nodulant des différents sols. Tous les sols sont aptes à noduler le niébé ce qui nous renseigne sur la large plasticité de nodulation de cette légumineuse.

Les nodosités sont sphériques de type déterminé, leur taille présente une large variabilité ; petites tailles (< à 0,5 cm), moyennes (entre 0,5 cm et 3 cm) ou grandes (>3cm).

### **III.3.3. Caractérisation phénotypique des souches**

Au total 18 souches sont isolées des nodules du niébé (*V. unguiculata*). La nomenclature des isolats ainsi que le site de prélèvement correspondant sont représentés dans le tableau 6, pour les sites 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 10, deux souches différentes peuvent être distinguées.

**Tableau 6.** Nomenclature des souches et leurs sites de piégeage correspondants

Sites	Souches	
Site1	S2	F2
Site2	S10	
Site3	S19	F6
Site4	A1	F1
Site5	S8	F4
Site6	S21	S5
Site7	A2	F3
Site8	S4	F5
Site9	S7	
Site10	A3	S3

Les colonies obtenues après purification des différents isolats doivent présenter les mêmes caractéristiques phénotypiques à l'échelle macroscopique et ce pour un même isolat (**Tableau 7**). Elles sont homogènes et circulaires à contour régulier le long des stries, de couleur blanchâtre et opaque à forme lisse pour la majorité ou beige translucide sèche pour les souches F2, S8, S4 et A3. La vitesse de croissance des souches est très variable : croissance rapide pour les souches S2, S19, A1, S8, S12, F3, S4 et S10 ; lente (F2, A3, F5, A2, S5, F4, F1, F6) et intermédiaire (S7 et S3).

Le test KOH qui nous renseigne sur le gram de la bactérie est positif pour toutes les souches, elles sont donc toutes à gram négatif (**Singh et al., 2008**). L'ensemble de ces résultats corrobore avec ceux des rhizobia décrits par de **Zakhia et De Lajudie (2006)**. La viscosité des souches varie également ; moyennement visqueuse (F2, F1, S8, S5, A2, F5, S7, S3 et S10) ; très visqueuse (S2, S19, F6, A1, F4, F2, S4 et A3) et extrêmement visqueuse (S21). Selon **Zahran et al. (1994)**, cette viscosité s'explique par une production importante d'exopolysaccharides.

Tableau 7. Principales caractéristiques des souches

Souches	Forme et contour	Couleur	Surface	Test KOH	Viscosité	Vitesse de croissance
S2	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	++	Rapide
F2	Circulaire, régulier	Beige, translucide	Sèche	+	+	Lente
S19	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	++	Rapide
F6	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	++	Lente
A1	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	++	Rapide
F1	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+	Lente
S8	Circulaire, régulier	Beige, translucide	Sèche	+	+	Rapide
F4	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	++	Lente
S21	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+++	Rapide
S5	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+	Lente
A2	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+	Lente
F3	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	++	Rapide
S4	Circulaire, régulier	Beige, translucide	Sèche	+	++	Rapide
F5	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+	Lente
S7	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+	Intermédiaire
A3	Circulaire, régulier	Beige, translucide	Sèche	+	++	Lente
S3	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+	Intermédiaire
S10	Circulaire, régulier	Blanchâtre, opaque	Lisse	+	+	Rapide

### III.3.4. Caractérisation biochimique des souches

Les caractères biochimiques des souches sont présentés dans le tableau 8

Tableau 8. Caractères biochimiques des différentes souches

Tests	Substrats	Réaction	Souches																	
			S2	F2	S10	A3	S19	F6	A1	F1	S8	S21	S5	A2	F3	S4	F5	S7	F4	S3
<b>OPNG</b>	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
<b>ADH</b>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<b>LDC</b>	L-lysine	DéCarboxylase Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ODC</b>	L-ornithine	DéCarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CIT</b>	trisodium citrate	utilisation du CITrate	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<b>H2S</b>	sodium thiosulfate	production d'H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>URE</b>	Urée	UREase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TDA</b>	L-tryptophane	DésAminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IND</b>	Tryptophane	production d'INDole	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>VP</b>	sodium pyruvate	production d'acétoïne	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GEL</b>	Gélatine	Protéase	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<b>GLU</b>	D-glucose	fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MAN</b>	D-mannitol	fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>INO</b>	Inositol	fermentation	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<b>SOR</b>	D-sorbitol	fermentation	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<b>RHA</b>	L-rhamnose	fermentation	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<b>SAC</b>	D-saccharose	fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MEL</b>	D-melibiose	fermentation	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<b>AMY</b>	Amygdaline	fermentation	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<b>ARA</b>	L-arabinose	fermentation	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<b>OX</b>		cytochrome-Oxydase	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+

(+) virage de couleur et dégradation du substrat par la bactérie ; (-) absence de virage de couleur donc pas de dégradation du substrat.

La réponse des souches varie considérablement en fonction des différents tests biochimiques, ainsi le test TDA est négatif pour toutes les souches, la majorité des souches produisent l'indole à l'exception des souches A3, S19, S7, F5, F4 et S3. La  $\beta$ -galactosidase est enregistrée pour les souches S2, A3, S19, A1, S21, F5, F4 et S3. L'arginine est hydrolysée uniquement par les souches A1, A2, F1, S7 et F5.

Le citrate est utilisé par la majorité des souches à l'exception de S2, F2, A3, S19, F6, F1, S7 et F4. La production d'oxydase est enregistrée pour les souches S2, F2, S10, S19, F6, S21, S5, F5 et S3.

Seule, la souche S21 a utilisé les substrats L-lysine et L-ornithine et a produit l' $H_2S$ , l'uréase et l'acétoïne.

Toutes les souches sont capables de réduire les nitrates en nitrites (test GLU) et donc sont capables de réduire l' $N_2$ . L'utilisation des substrats carbonés (MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY et ARA) varie également, seules les souches F2, A3, S9, A1, S21, S5, S7, S4, F4 sont positives pour tous ces substrats.

Les tests d'utilisation des glucides indiquent que les souches sont capables d'utiliser différentes sources de glucides, il est donc supposé qu'elles peuvent produire des enzymes importantes comme l'amylase et la cellulase. Les souches de rhizobia ont pu consommer le glucose, le mannitol et le saccharose plus efficacement comparés aux autres glucides, ces résultats rejoignent ceux de **Küçük et Kivanc (2008)** et **Singh et al. (2008)**.

L'utilisation de la protéase, une caractéristique qui peut distinguer les souches du genre *Rhizobium* et *Sinorhizobium*, est observée chez la majorité des souches à l'exception de A1, F1, A2, F5 et S7 (**Pongsilp et Leelahawong, 2010**). Les genres *Bradyrhizobium* et *Mesorhizobium* peuvent être distingués aussi sur la base de l'hydrolyse de L-arginine comme seule source d'azote (**Pongsilp et Boonkerd, 2007**).

Les résultats de notre étude suggèrent que les souches isolées pourraient appartenir aux genres : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Ainsi, l'outil moléculaire est indispensable pour trancher et identifier les souches.

### **III.3.5. Tolérance des souches aux stress abiotiques**

Les tests de tolérance des souches aux variations de température, de salinité et de pH sont présentés dans le tableau 9.

Toutes les souches tolèrent des températures comprises entre 18 et 28°C, avec une croissance optimale à 28°C. Cependant, certaines d'entre elles (S2, F2, A1, F1, S21, S5, S4 et F5) peuvent se développer à 10 et à 38°C. Les résultats de ce test sont en cohérence avec des études menées par **Hashem et al. (1998)** et **Marsudi et al. (1999)**, qui attestent que les rhizobia sont des bactéries mésophiles, et peuvent se développer à des températures comprises entre 10 et 37°C avec une température optimale de croissance à 28°C.

Le pH optimal de croissance pour toutes les souches est de 7 ; les souches S2, F2, A1, F1, S21, S5, S4 et F5 qui ont en commun d'être isolées des sols à pH acide, peuvent supporter des pH allant de 2 à 4. Celles isolées des sols à pH alcalin peuvent tolérer des pH allant de 10 à 12. En effet, les rhizobia sont capables de tolérer des valeurs de pH allant de 3,5 à 10 (**Rasul et al., 2012**). Les souches tolérantes au pH acide de leur habitat sont tolérantes à de faibles valeurs de pH *in situ* (**Bernal et Graham, 2001**).

Toutes les souches présentent une bonne tolérance à la salinité entre 1 et 4% d'NaCl, ces résultats rejoignent ceux de **Huang et al. (2005)**. Cependant, seules les souches S19 et S21 peuvent croître à 11% de NaCl, au-delà de cette valeur, aucune souche ne s'est développée.

**Tableau 9.** Tests de tolérance des souches à la température, la salinité et au pH

Souches	T°C					pH					NaCl (%)				
	4	10	18	28	38	2	4	7	10	12	1	4	8	11	15
S2	-	+	++	+++	+	+	++	+++	-	-	++	+	-	-	-
F2	-	+	++	+++	+	+	++	+++	-	-	++	+	+	-	-
S10	-	-	+	+++	-	-	-	+++	++	+	++	+	-	-	-
A3	-	-	+	+++	-	-	-	+++	++	+	++	+	-	-	-
S19	-	-	+	+++	-	-	-	+++	++	++	+++	++	++	+	-
F6	-	-	+	+++	-	-	-	+++	++	+	++	++	+	-	-
A1	-	+	++	+++	+	+	++	+++	-	-	++	+	-	-	-
F1	-	+	++	+++	+	+	++	+++	-	-	++	+	-	-	-
S8	-	-	+	+++	-	-	-	+++	+	+	++	+	-	-	-
S21	-	+	++	+++	++	++	++	+++	-	-	+++	++	++	+	-
S5	-	+	++	+++	-	-	+	+++	-	-	++	+	-	-	-
A2	-	-	+	+++	-	-	-	+++	++	+	++	++	+	-	-
F3	-	-	+	+++	-	-	-	+++	+	+	++	+	-	-	-
S4	-	+	++	+++	+	+	++	+++	-	-	++	+	-	-	-
F5	-	+	++	+++	+	-	+	+++	-	-	++	+	-	-	-
S7	-	-	+	+++	-	-	-	+++	-	-	++	++	+	-	-
F4	-	-	+	+++	-	-	-	+++	++	+	++	+	-	-	-
S3	-	-	+	+++	-	-	-	+++	-	-	++	+	+	-	-

(-) pas tolérante ; (+) moyennement tolérante ; (++) tolérante ; (+++) ; très tolérante.

### III.3.6. Caractérisation moléculaire

#### a. Extraction de l'ADN

Toutes les extractions présentent une bonne migration à environ 12000 pb (taille moyenne de l'ADNg), les bandes sont marquées par une forte intensité, proportionnelle à la quantité extraite. Ainsi, les valeurs de quantification au pico-green des extractions varient de 256,8 ng à 1002 ng.

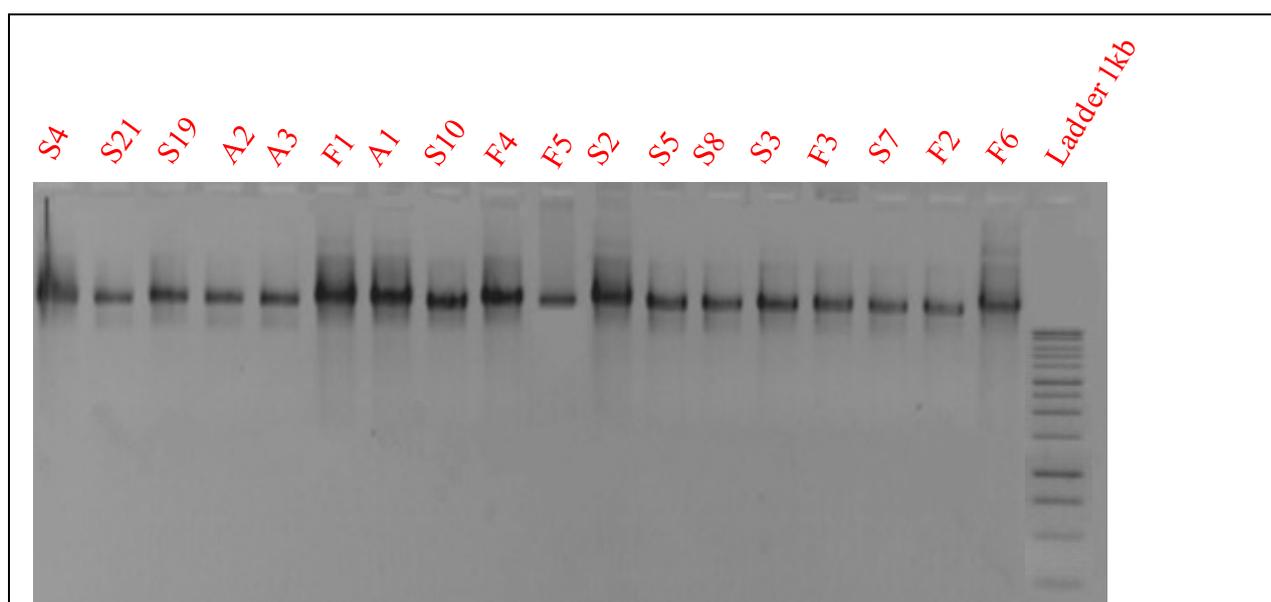
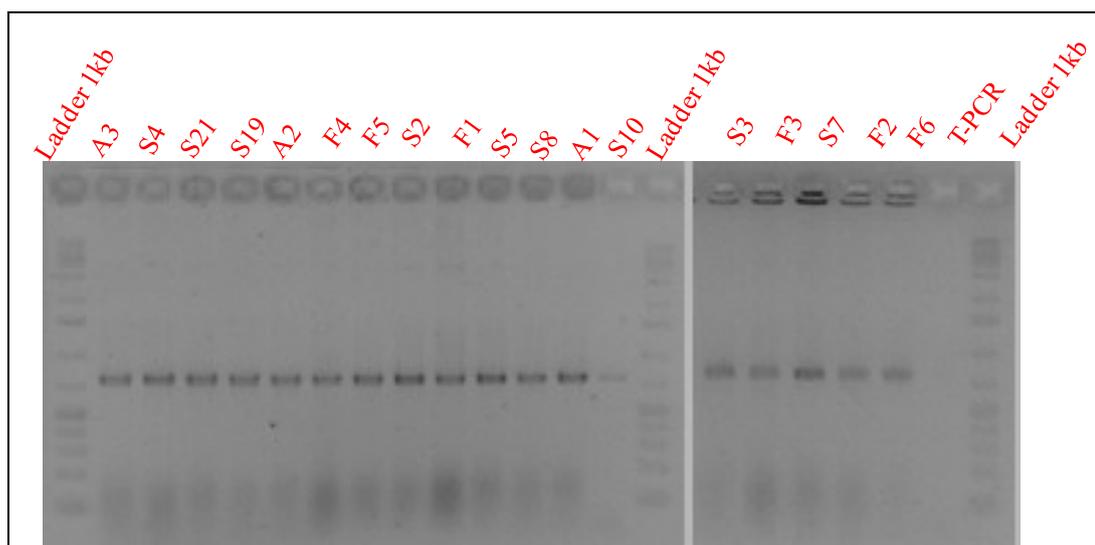


Figure 12. Profil d'extraction d'ADN sur gel d'agarose 1%.

#### b. Amplification du gène ADNr 16S

Le gène ADNr 16S ou gène universel bactérien, essentiellement utilisé en raison de sa structure, très conservée dans toutes les bactéries, permet de mesurer les distances phylogénétiques entre les différentes espèces bactériennes (Renvoisé et al., 2012). L'amplification de ce gène permet la détection et l'identification des bactéries (Renvoisé et al., 2012). La figure 13 montre que toutes les souches présentent une amplification entre 1400 et 1500 pb spécifique du gène ADNr 16S (la taille attendue du gène étant de 1446 pb). Par ailleurs, aucune bande n'est observée chez le témoin négatif.



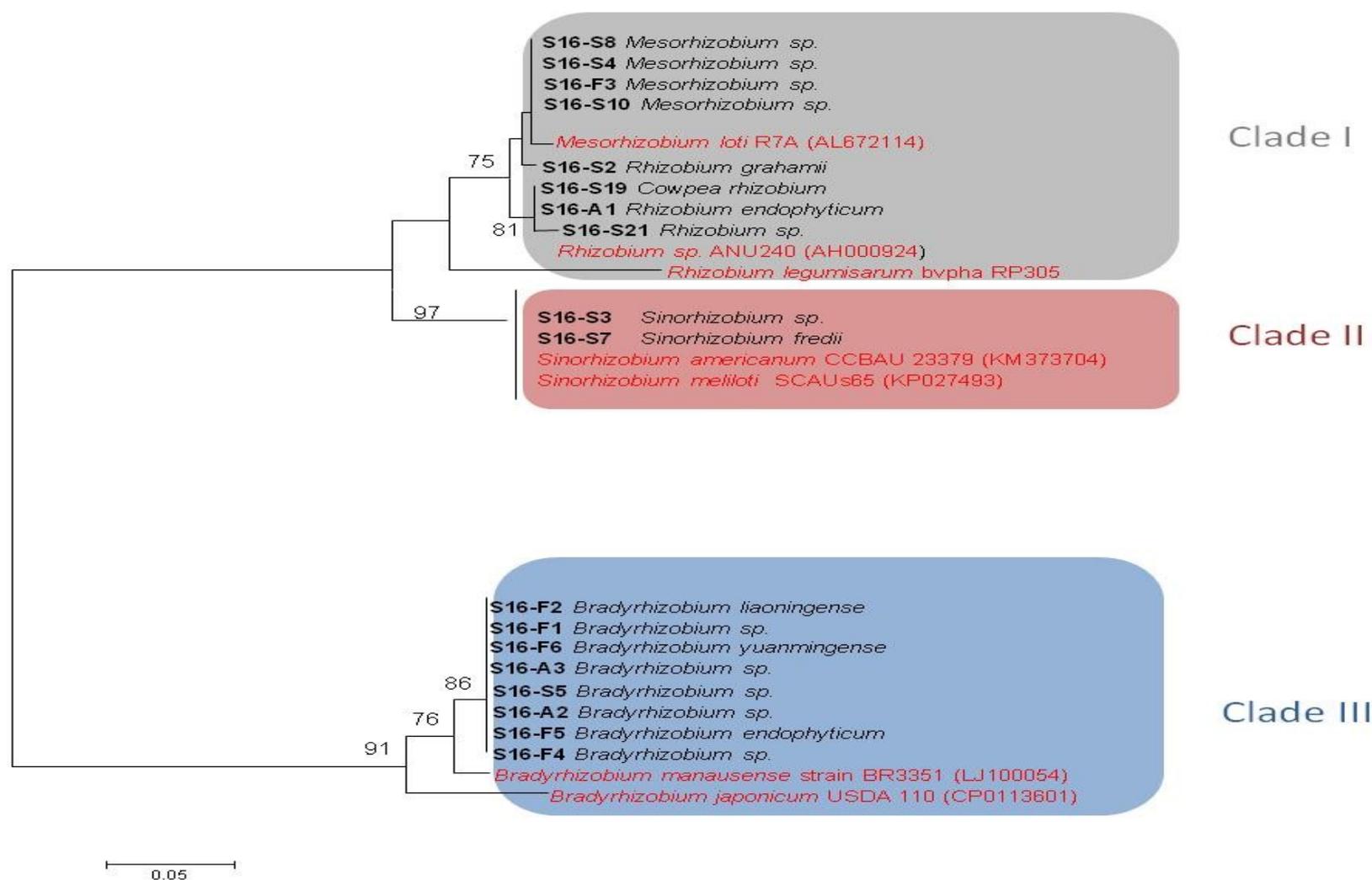
**Figure 13.** Gel d'agarose de contrôle des amplifications de la PCR du gène ADNr 16S.

Les relations phylogéniques entre les espèces sont déterminées en comparant leurs séquences nucléotidiques (**Clarridge, 2004**). Les séquences ADNr 16S jouent un rôle prédominant dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne (**Janda et Abbott, 2007**). Après séquençage et comparaison des séquences obtenues avec celles disponibles dans la banque génomique NCBI, les pourcentages de similarité entre les séquences de nos souches avec celles compatibles de NCBI varient de 97 % à 99 %.

D'après ces résultats, nos bactéries appartiennent aux genres *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, ces résultats confirment donc ceux de l'identification biochimique.

Après séquençage et alignement des séquences obtenues, la figure 14 représente les relations phylogénétiques génétiques entre les différentes souches.

**16S (1395pb)**  
NJ-Km2



**Figure 14.** Arbre phylogénique des différentes séquences du gène ADNr 16S. La signification de chaque branche est indiquée par une valeur ( $\geq 60\%$ ) calculée pour 1000 répétitions, l'échelle indique le nombre de substitutions par site.

La taxonomie des bactéries nodulant les légumineuses a suscité l'intérêt des chercheurs au cours des dix dernières années. Les souches étudiées sont classées en cinq genres de rhizobia à savoir: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* et qui renferment actuellement plus de 100 espèces bactériennes (Pérez-Yépez et al., 2014).

L'arbre phylogénique construit à partir des séquences de l'ADNr 16S (1395 pb) regroupe les souches en différents clades :

**Clade I** regroupe les souches *Mesorhizobium* sp. S8, *Mesorhizobium* sp. S4, *Mesorhizobium* sp. F3, *Mesorhizobium* sp. S10, *Rhizobium grahamii* S2, *Cowpea rhizobium* S19, *Rhizobium endophyticum* A1 et *Rhizobium* sp. S21 qui sont caractérisées par une croissance rapide.

**Clade II** renferme les souches *Sinorhizobium* sp. S3 et *Sinorhizobium fredii* S7 qui sont des bactéries à croissance intermédiaire.

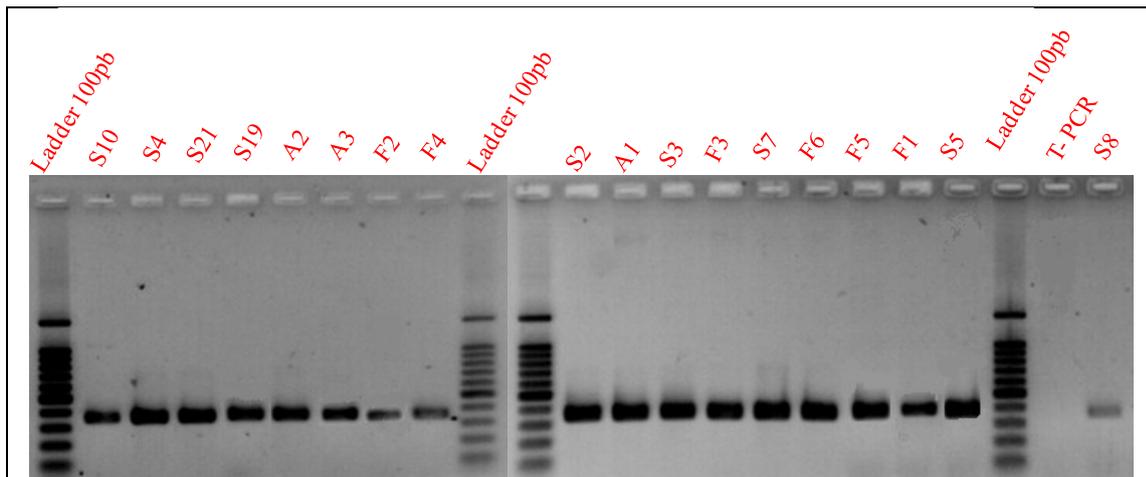
**Clade III** regroupe les souches *Bradyrhizobium* sp. F1, *Bradyrhizobium* sp. A3, *Bradyrhizobium* sp. S5, *Bradyrhizobium* sp. A2, *Bradyrhizobium* sp. F4, *Bradyrhizobium liaoningense* F2, *Bradyrhizobium yuanmingense* F6, *Bradyrhizobium endophyticum* F5 qui sont caractérisées par une croissance lente.

#### c. Amplification du gène *nifH*

Le gène de fixation *nifH* est un gène codant pour la dinitrogénase réductase, sub-unité du complexe nitrogénase, responsable de la réduction du N<sub>2</sub> en formes facilement utilisables NH<sub>4</sub> (Laguerre et al., 2001).

Le gène *nifH* est présent chez les bactéries diazotrophes de la rhizosphère parmi lesquelles se trouvent les rhizobia symbiotiques capables de s'associer aux légumineuses (León-Barrios et al., 2009). Son expression est induite sous déficience en azote (Laranjo et al., 2008).

La figure 15 montre que toutes les souches présentent un amplicon entre 300 et 400 pb spécifique du gène *nifH* dont la taille attendue est 359 pb. Par ailleurs, aucune bande n'est observée chez le témoin négatif.



**Figure 15.** Gel d'agarose de contrôle des amplifications de la PCR du gène *nifH*.

Après séquençage et alignement des séquences obtenues, les relations phylogénétiques entre les différentes souches sont représentées dans la figure 16.

L'arbre phylogénique construit à partir des séquences *nifH* (232 pb) regroupe les souches également en trois clades différents:

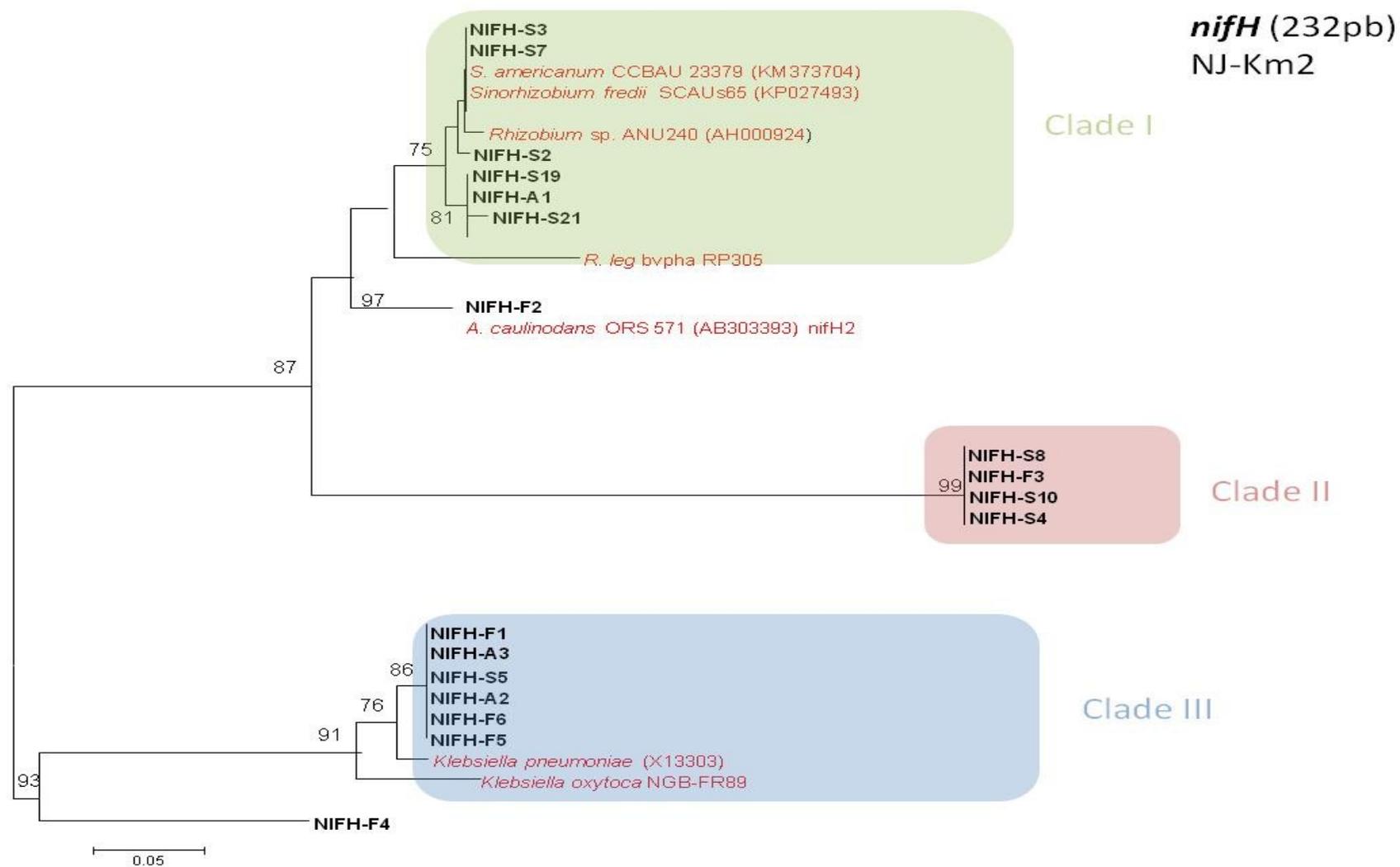
**Clade I** qui regroupe les souches S3 et S7 qui partagent 75% de similitude de séquences avec *Sinorhizobium americanum* et *Sinorhizobium fredii* et les souches S2, S19, A1 et S21 qui partagent 81 % de similitude avec *Rhizobium leguminosarum*.

**Clade II** bien séparé dans l'arbre phylogénique et qui regroupe les souches S8, F3, S10 et S4 qui sont homogènes à 99 %, dont les séquences ne figurent pas dans la banque des gènes NCBI et donc sont considérées comme des séquences nouvelles.

**Clade III** regroupe les souches F1, A3, S5, A2, F6 et F5 qui partagent 76% de similitude avec la séquence de *Klebsiella pneumonia*.

La souche F4 fait office du groupe externe (Out Group) du fait de sa position de racine et ne forme aucun clade. Ceci est due au fait que la taille de la séquence alignée (110 pb) est inférieure à l'ensemble des séquences.

La souche F2 ne forme aucun clade mais présente une similitude de séquences à 97% avec *Azorhizonium caulinodans*.



**Figure 16.** Arbre phylogénique des différentes séquences du gène *nifH*. La signification de chaque branche est indiquée par une valeur ( $\geq 60\%$ ) calculée pour 1000 répétitions, l'échelle indique le nombre de substitutions par site.

Selon **Cobo-Díaz et al. (2014)**, la phylogénie du gène *nifH* est étroitement compatible avec celle du gène ADNr 16S. En revanche, nos résultats démontrent que l'arbre phylogénique du gène *nifH* n'est pas compatible avec celui du gène ADNr 16S, rejoignant ainsi ceux de **Laranjo et al. (2008)** et de **Diouf et al. (2010)**, qui ont déjà souligné que les phylogénies des gènes *nodC* et *nifH* n'étaient pas cohérentes avec celle du gène ADNr 16S chez les souches de *Mesorhizobium spp.*, indiquant qu'un transfert de gènes est à l'origine des différences entre les séquences.

Il est bien connu que le transfert de gènes pourrait se produire par voie horizontale ou verticale entre les micro-organismes. Le transfert horizontal de gènes symbiotiques entre les différentes espèces bactériennes des sols est l'explication la plus raisonnable pour justifier les incohérences observées dans les phylogénies (**Wernegreen et Riley, 1999 ; Lan et Reeves, 2000**).

Les résultats de nombreuses études sur la distribution des phylotypes *nifH* indiquent qu'il existe des profils distincts de diazotrophes dans les milieux, ce qui suggère que leur distribution peut être fondée sur les caractéristiques de l'habitat (**Zehr et al., 2003**).

### III.4. Conclusion

Ce travail a pour but d'identifier les bactéries symbiotiques nodulant le niébé par une approche phénotypique, biochimique supportée par un séquençage du gène ADNr 16S.

D'après les résultats du gène ADNr 16S, le niébé présente une forte promiscuité et peut être nodulé par plusieurs espèces rhizobiennes appartenant à trois classes différentes. Chaque classe représente un groupe particulier qui peut être distingué par ses séquences symbiotiques et ses phénotypes symbiotiques à savoir **Classe I** : bactéries à croissance rapide dont les séquences sont proches aux genres *Rhizobium* et *Mesorhizobium* ;

**Classe II** : bactéries à croissance intermédiaire dont les séquences sont proches au genre *Sinorhizobium* ; **Classe III** : bactéries à croissance lente dont les séquences sont proches au genre bactérien *Bradyrhizobium*.

La phylogénie *nifH* n'est pas en cohérence avec celle de la phylogénie 16S du fait d'un transfert de gènes horizontal entre espèces bactériennes. De nouvelles séquences, inconnues de la base de données NCBI, sont mises en évidence formant une classe à part.

Les souches S2, F2, A1, F1, S21, S4 et F5 présentent une tolérance à la température et au pH acide, les souches S10, A3, S19, F6, S8, A2, F3 et F4 présentent une tolérance au pH alcalin et les souches S19, S21, F6, F2, A2, S7 et S3 présentent une tolérance à la salinité. Ces facteurs inhibent la fixation symbiotique de l'azote en limitant la survie et la subsistance des rhizobia dans le sol, et donc, réduisent la nodulation. Il sera judicieux donc d'utiliser les souches tolérantes en particulier en Méditerranée et ce dans le cadre d'une agriculture durable.

L'infectivité des souches et leur efficacité à fixer l'azote atmosphérique sont abordées dans le chapitre V.

### III.5. Références bibliographiques

- AFNOR 1984. Qualité des sols méthodes d'analyses. AFNOR, Paris, 131p.
- Bernal G. et Graham P.H. 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian journal of microbiology*, 47(6), 526-534.
- Brice K., Adjou-Euloge S., Edwige D. A., Konfo T. R., Christian, A.B.C. et Dominique S. 2016. Problématique de la conservation du niébé (*Vigna unguiculata* (L), Walp) en Afrique de l'Ouest: étude d'impact et approche de solution. *Journal of Animal & Plant Sciences* 31(1), 4831-4842.
- Clarridge J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
- Cobbinah F.A., Addo-Quaye A.A. et Asante I. K. 2011. Characterization, evaluation and selection of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Accessions with desirable traits from eight Regions of Ghana. *ARPN J Agric Biol Sci*, 6(7), 21-32.
- Cobo-Díaz J.F., Martínez-Hidalgo P., Fernández-González A. J., Martínez-Molina E., Toro N., Velázquez E. et Fernández-López M. 2014. The endemic *Genista versicolor* from Sierra Nevada National Park in Spain is nodulated by putative new *Bradyrhizobium* species and a novel symbiovar (*sierranevadense*). *Systematic and applied microbiology*, 37(3), 177-185.
- Diouf D., Fall D., Chaintreuil C., Ba A.T., Dreyfus B., Neyra M. et Moulin L. 2010. Phylogenetic analyses of symbiotic genes and characterization of functional traits of *Mesorhizobium spp.* strains associated with the promiscuous species *Acacia seyal* Del. *Journal of applied microbiology*, 108(3), 818-830.
- Ghalmi N., Malice M., Jacquemin J.M., Ounane S.M., Mekliche L. et Baudoin J.P. 2010. Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. *Genetic resources and crop evolution* 57, 371–386.

Hashem F.M., Swelim D.M., Kuykendall L.D., Mohamed A.I., Abdel-Wahab S.M. et Hegazi N.I. 1998. Identification and characterization of salt-and thermo-tolerant Leucaena-nodulating Rhizobium strains. *Biology and fertility of soils*, 27(4), 335-341.

Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P. et Young C.C. 2005. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia*, 49(6), 577-584.

Janda J.M. et Abbott S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E et Kato T. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 331-338.

Küçük Ç. et Kivanc M. 2008. Preliminary characterization of Rhizobium strains isolated from chickpea nodules. *African Journal of Biotechnology*, 7(6).

Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P. et Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147(4), 981-993.

Lan R. et Reeves P.R. 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends in microbiology*, 8(9), 396-401.

Laranjo M., Alexandre A., Rivas R., Velázquez E., Young J.P.W. et Oliveira S. 2008. Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS microbiology ecology*, 66(2), 391-400.

León-Barrios M., Lorite M.J., Donate-Correa J. et Sanjuán J. 2009. *Ensifer meliloti* by. *lancerottense* establishes nitrogen-fixing symbiosis with Lotus endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Systematic and applied microbiology*, 32(6), 413-420.

MADR 2012. Statistique agricole : superficies et productions, série B.

Marsudi N.D., Glenn A.R. et Dilworth M.J. 1999. Identification and characterization of fast-and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(9), 1229-1238.

Moulin L., Béna G., Boivin-Masson C. et Stepkowski T. 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 30, 720-32.

Philippot L. et Germon J.C. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. *Microorganismis in soils: roles in genesis and functions*, 159-176.

Poly F., Monrozier L.J. et Bally R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1), 95-103.

Pongsilp N. et Boonkerd N. 2007. Research techniques for estimating phenotypic and genotypic diversity of root-and stem-nodule bacteria. *Suranaree J. Sci. Technol*, 14, 297-398.

Pongsilp N. et Leelahawong C. 2010. Root-nodule symbionts of *Derris elliptica* Benth. are members of three distinct genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium*. *International Journal of Integrative Biology*, 9(1), 37-42.

Rahman M.T., Crombie A., Chen Y., Stralis-Pavese N., Bodrossy L., Meir P. et Murrell J.C. 2011. Environmental distribution and abundance of the facultative methanotroph *Methylocella*. *The ISME journal*, 5(6), 1061-1066.

Rasul A., Amalraj E.L.D., Praveen Kumar G., Grover M. et Venkateswarlu B. 2012. Characterization of rhizobial isolates nodulating *Millettia pinnata* in India. *FEMS microbiology letters*, 336(2), 148-158.

Renvoisé A., Rolain J.M., Socolovschi C. et Raoult D. 2012. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 64(1), 126-129.

Schilizzi S. et Pannell D. 2001. The economics of nitrogen fixation. *Agronomie*, 21(6-7), 527-537.

Shetta N.D., Al-Shaharani T.S. et Abdel-Aal M. 2011. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 10(3), 410-418.

Shushan H., Betty H., Sydney M.F. et Rial D.R. 1981. *Rapid method that aid in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. Journal of Clinical Microbiology*, 13, 444-448.

Simonet P., Grosjean M.C., Misra A.K., Nazaret S., Cournoyer B. et Normand P. 1991. Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3278-3286.

Singh B., Kaur R. et Singh K. 2008. Characterization of Rhizobium strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). *African Journal of Biotechnology*, 7(20).

Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *International Biological Programme Handbook n° 15*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73-97.

Wernegreen J.J. et Riley M.A. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 98-113.

Willems A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil*, 287, 3–14

Zahran H.H. 1991. Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 73-80.

Zahran H.H., Räsänen L. A., Karsisto M. et Lindström K. 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(1), 100-105.

Zahran H.H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of biotechnology*, 91(2), 143-153.

Zakhi F. et De Lajudie P. 2006. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques—application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Canadian journal of microbiology*, 52(3), 169-181.

Zehr J. P., Jenkins B.D., Short S.M. et Steward G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental microbiology*, 5(7), 539-554.

## CHAPITRE IV

**Criblage et caractérisation de souches de rhizobia solubilisatrices de phytate isolées à partir de nodules de niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp)).****IV.1. Introduction**

Le phosphore (P) est le cinquième élément qui compose la matière vivante, compte tenu de son rôle essentiel dans la nutrition végétale, sa faible disponibilité dans la rhizosphère est un facteur limitant dans de nombreux agro-écosystèmes (**Gerke, 2015**). C'est l'un des principaux macronutriments indispensables à toute croissance et développement biologique (**Turner, 2008**). Malgré, sa teneur importante dans les sols cultureux, sa disponibilité reste limitée pour les plantes. En effet une grande partie du P apporté aux cultures, est rapidement insolubilisé ou complexé en présence de calcaire ou à pH alcalin du sol (**Plassard et al., 2015**). Le P organique constitue l'essentiel du P dans le sol, représentant entre 50 à 80% du P total (**Turner et al., 2002**). Cette forme ne peut évidemment être utilisée par la plante que sous forme soluble. Il existe cependant des enzymes (phosphatases) capables de solubiliser ces formes telles que les phosphates tricalciques (**Plassard et al., 2015**).

Les phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase), sont des enzymes sécrétées par les plantes et plusieurs microorganismes, capables de minéraliser en myo-inositol et autres composés phosphatés, le phytate (myo-Inositol hexakisphosphate) qui est la forme insoluble la plus répandue des Inositol-Phosphates IP (IP<sub>x</sub>, où x est 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) (**Turner et al., 2002**). Dans les écosystèmes terrestres, le phytate est synthétisé par les plantes et représente une quantité très importante (60 à 80 %) du phosphore organique dans le sol (**Huang et al., 2009**).

Il existe de nombreuses classifications de phytases, la plus simplifiée caractérise quatre classes: l'Histidine Acide Phosphatase (HAP), la Cystéine Phytase (C phy), la Purple Acide Phytase (PAP) et la Beta-Propeller Phytase (BPP) (**Mullaney et Ullah, 2003 ; Lei et al., 2007**). Les phytases sont largement distribuées dans la nature et jouent un rôle majeur dans la biodisponibilité du P et son acquisition par les plantes (**Greiner et al., 2007**). Cependant, leur étude est quasi limitée aux communautés fongiques symbiotiques mycorhiziennes (**Zhang et al., 2014**).

Tout service de régulation biologique pouvant contribuer à la libération de Pi dans le sol et constituer ainsi une alternative à l'utilisation de fertilisants minéraux (souvent onéreux et polluants) mérite une attention particulière (**Jeffries et al., 2003 ; Barea et al., 2005**). À ce titre, la communauté bactérienne impliquée dans ce processus de minéralisation du phosphore organique présente un intérêt certain pour la nutrition phosphatée des plantes.

L'objectif de ce travail est d'identifier et de caractériser les rhizobia qui sécrètent les phytases alcalines (BPP) et acides (HAP) nodulant le niébé.

## IV.2. Matériel et méthodes

Dans le but d'évaluer l'efficacité des souches rhizobiennes isolées (**Chapitre III**) à libérer du Pi en minéralisant *in vitro* le phytate, deux milieux de criblage (screening), contenant le phytate comme seule source de phosphore, sont utilisés.

### IV.2.1. Criblage des souches produisant la phytase BPP

La capacité des rhizobia à produire la phytase alcaline BPP est testée sur milieu solide dont la composition est présentée dans le tableau 10.

**Tableau 10.** Composition du milieu pour détection de la phytase alcaline

Réactif	Par litre de milieu	Concentration finale	Mode de stérilisation
<b>KNO<sub>3</sub></b>	0,1 g	1 mM	Autoclave
<b>Glucose</b>	10 g	55 mM	Autoclave
<b>CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	0,69g	4 mM	Autoclave
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	0,49g	2 mM	Autoclave
<b>Thiamine-HCL</b>	0,5mL	50 µg/L	Autoclave
<b>Fe-citrate 1%</b>	0,5 mL	0,5 mL/L	Autoclave
<b>Micro-éléments</b>	0,2 mL	0,2 mL/L	Autoclave
<b>Agar-agar</b>	15 g	48 mM	Autoclave
<b>CaCl<sub>2</sub> (3%)</b>	100 mL	100 mL/L	Filtration
<b>Phytate de Na 150 mM</b> <b>(Sigma, P0109)</b>	20 mL	3 mM	Filtration
<b>Vitamines</b>	1 mL	1 mL/L	Filtration
<b>MOPS</b>	50 mL	50mM	Filtration

Le phytate a été préparé dans de l'eau ultra-pure par dissolution de Na-phytate (Sigma, référence P0109) pour obtenir une concentration finale de 3 mM. Le pH de cette solution est

ajusté à 7 avec du HCl à 37 %. Le milieu est autoclavé à 120 °C, pendant 20 min, et refroidi à environ 50 °C avant l'addition par filtration à 0,2 µm du phytate, des vitamines, du CaCl<sub>2</sub> et du MOPS. Le CaCl<sub>2</sub> est rajouté uniquement en milieu solide pour permettre la visualisation du halo.

Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Petri, une fois refroidi, toutes les souches sont repiquées à l'aide d'un peigne de culture. Les boîtes sont mises à incuber à 28 °C durant 7 jours.

Les souches présentant un vrai halo clair autour des colonies sont vérifiées en milieu liquide (sans ajout d'agar) à fin d'éliminer les faux positifs (formation du halo suite à une acidification du milieu).

Une pré-culture est préparée pour chaque souche à partir d'une colonie isolée sur milieu solide avec laquelle on ensemence 10ml de milieu YEM liquide en erlenmeyer de 100ml. On incube à 28°C, sous agitation de 120 RPM, jusqu'à la phase stationnaire. 200µl de ces cultures sont réparties dans des erlenmeyer de 50ml contenant 20ml du milieu phytate et sont incubés par la suite à 28°C, sous agitation de 120 RPM. Avec trois répétitions pour chaque souche.

Pendant la culture pour mesurer la cinétique, dans des tubes eppendorf 500µl de culture sont prélevés quotidiennement (de T0 à T7) pour chaque souche, auxquels on rajoute 500µl de HCL 1N. La croissance bactérienne est mesurée à une DO de 600 nm.

Pour mesurer le Pi libéré, 1ml de suspension bactérienne est prélevé en parallèle, puis centrifugé à 12 000 RPM pendant 10 min, les échantillons sont conservés à -20°C pour dosage ultérieur du Pi libéré dans le surnageant en utilisant la méthode au vert de malachite (**Ohno et Zibilske, 1991**).

Un erlenmeyer contenant le milieu phytate sans culture est utilisé comme contrôle.

### IV.2.2 Screening des souches produisant la phytase HAP

L'aptitude des rhizobia à produire la phytase acide HAP est testée sur milieu solide dont la composition est présentée dans le tableau 11.

**Tableau 11.** Composition du milieu pour détection de la phytase acide HAP

Réactif	Par litre de milieu	Concentration finale	Mode de stérilisation
<b>KNO<sub>3</sub></b>	0,1g	1mM	Autoclave
<b>Glucose</b>	10g	55mM	Autoclave
<b>CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	0,69g	4mM	Autoclave
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	0,49g	2mM	Autoclave
<b>Thiamine-HCL</b>	0,5ml	50µg/L	Autoclave
<b>Fe-citrate 1%</b>	0,5ml	0,5ml/L	Autoclave
<b>Micro-éléments</b>	0,2ml	0,2ml/L	Autoclave
<b>Agar-agar</b>	15g	48mM	Autoclave
<b>Lysosyme</b>	5g	0,6mM	Filtration
<b>Phytate de Na 150mM (Sigma, P0109)</b>	20ml	3mM	Filtration
<b>Vitamines</b>	1ml	1ml/L	Filtration
<b>MES 1M</b>	50ml	50mM	Filtration

Le phytate a été préparé dans de l'eau ultra-pure par dissolution de Na-phytate (Sigma, référence P0109) pour obtenir une concentration finale de 3 mM. Le pH de cette solution est ajusté à 6 avec du HCl à 37% et qui est stérilisé ensuite par filtration à 0,2 µm. Le milieu est autoclavé à 120°C, pendant 20 min, et refroidi à environ 50° C avant l'addition du phytate, du lysozyme, des vitamines et du MES.

Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Pétri, une fois refroidi, toutes les souches sont repiquées à l'aide d'un peigne de culture. Les boîtes sont mises à incuber à 28°C durant une semaine.

Le lysozyme est rajouté uniquement en milieu solide pour sa turbidité afin de permettre de visualiser l'halo.

Les souches présentant un vrai halo clair autour des colonies sont également vérifiées en milieu liquide (sans ajout d'agar) à fin d'éliminer les faux positifs (formation du halo suite à une acidification du milieu).

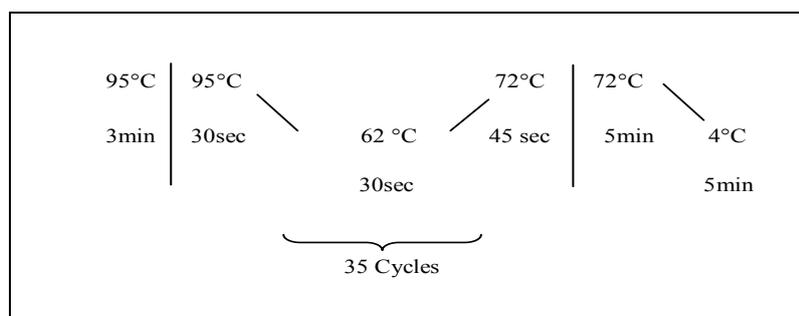
### **IV.2.3 Expression du gène de la phytase alcaline BPP**

Le gène BPP est amplifié en utilisant les amorces **L\_BPP phy5'\_684** (5' GAT GCA GCT GAT GAT CCT GCG 3') et **R\_BPP phy3'\_684** (5' ATT TTC TCC GTC CTG TGC GAC 3') (**Farhat et al., 2008**).

La composition du Mix PCR (**Tableau 12**) ainsi que le programme PCR sont optimisés de manière à avoir une seule amplification par puits et par échantillon (**Fig. 17**). La taille attendue est de 864 pb.

**Tableau 12.** Mix PCR par tube pour un volume final de 25µL (gène BPP).

<b>Constituant</b>	<b>Volume</b>
<b>Buffer 10X</b>	2,5µL
<b>MgCl<sub>2</sub> 25mM</b>	0,75µL
<b>dNTP</b>	0,5µL
<b>L_BPPphy5'_684 (10 µM)</b>	0,5µL
<b>R_BPPphy3'_684 (20 µM)</b>	0,5µL
<b>ADN (10 à50ng)</b>	1µL
<b>GoTaq Invitrogen</b>	0,1µL
<b>Water</b>	19,15µL



**Figure 17.** Programme PCR optimisé du gène BPP

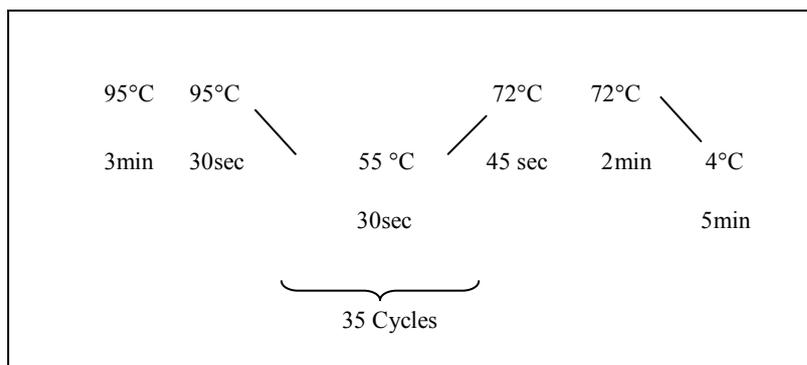
#### IV.2.4. Expression du gène de la phytase acide HAP

Le gène HAP est amplifié en utilisant les amorces **F\_413** (5' CAG TTC ACG CCA AAG ATG CC 3') et **R\_413** (5' CGC GTA TGG TCC ATC CTG AA 3').

. La composition du Mix PCR (**Tableau 13**) ainsi que le programme PCR sont optimisés de manière à avoir une seule amplification par puits et par échantillon (**Fig. 18**). La taille de l'amplicon attendue est 409 pb.

**Tableau 13.** Mix PCR par tube pour un volume final de 25 µL (gène HAP).

Constituant	Volume
<b>Buffer 10X</b>	2,5 µL
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	0,75 µL
<b>dNTP</b>	0,5 µL
<b>F_413 (10 µM)</b>	0,5 µL
<b>R_413 (20 µM)</b>	0,5 µL
<b>ADN (10 à 50ng)</b>	1 µL
<b>GoTaq Invitrogen</b>	0,1 µL
<b>Water</b>	19,15 µL



**Figure 18.** Programme PCR optimisé du gène HAP.

Après PCR, pour chaque échantillon, 3  $\mu$ L du tampon de charge à 6X sont rajoutés à 5  $\mu$ L de produits de PCR et puis déposés sur un gel d'agarose à 1,5% dans une cuve contenant du TAE (Tris-Acétate, EDTA) à 1X. Après migration pendant 30 min à 120V, le gel est trempé dans un bain de bromure d'ethidium pendant 15 min et visualisé par la suite sous UV et la photo est capturée avec le programme BioCapt. La taille du fragment d'intérêt est décelée grâce à un marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA Ladder, Promega).

#### IV.2.5. Séquençage et analyses des données

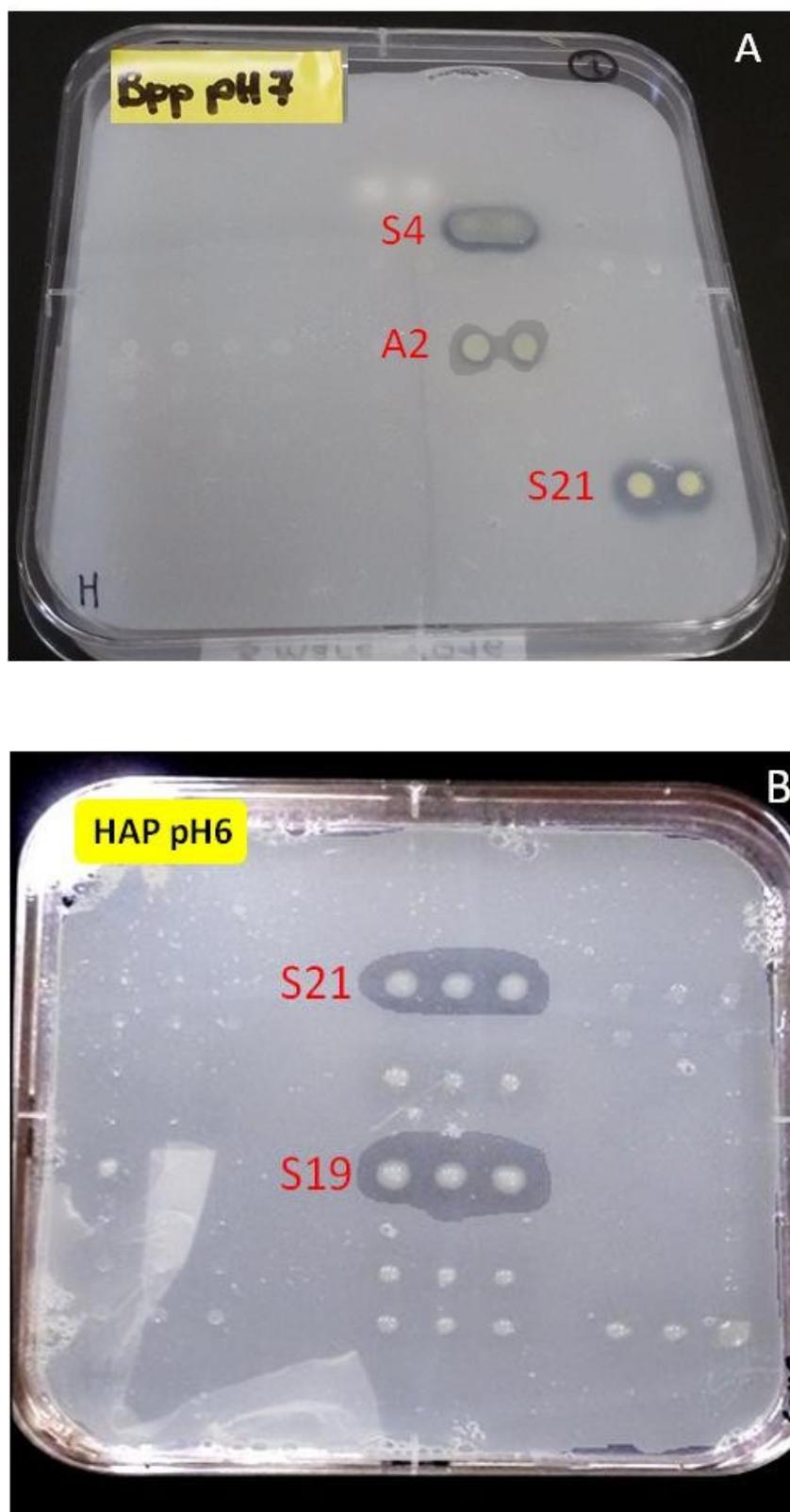
Les amplicons des gènes BPP et HAP sont purifiés et séquencés au laboratoire Beckman, Genewiz (Angleterre). Les extrémités des séquences obtenues sont nettoyées pour améliorer la qualité des séquences en utilisant le logiciel "MEGA v5.2". Les séquences résultantes sont analysées en utilisant BLASTn de NCBI pour vérifier leur homologie avec les séquences de cette banque de gènes.

### IV.3. Résultats et discussion

#### IV.3.1. Screening des souches minéralisant le phytate

Afin d'évaluer l'aptitude des rhizobia nodulant le niébé à minéraliser le phytate, nous avons procédé d'abord à un criblage sur deux milieux solides pour mettre en évidence l'activité solubilisatrice des souches (**Fig.19**). Cette approche est préconisée par plusieurs auteurs (**Jorquera et al., 2008 ; Maougal et al., 2014**).

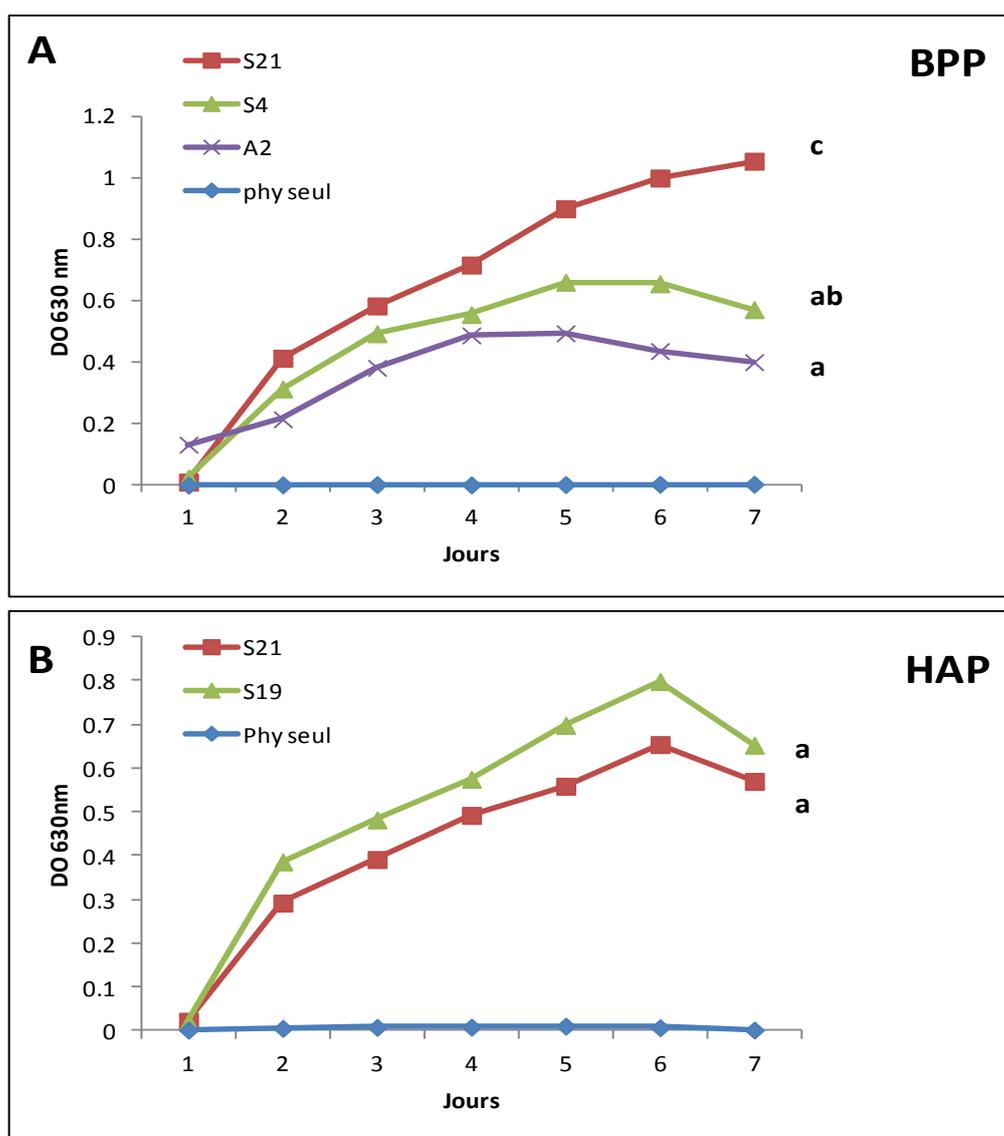
Sur les 18 souches testées, seules 3 (S21, S4 et A2) produisent un vrai halo autour des colonies sur milieu phytase BPP (**Fig. 19A**). Deux souches (S21 et S19) présentent de vraies auréoles de lyse autour des colonies (**Fig. 19B**). Ce qui suggère une minéralisation bactérienne du phytate.



**Figure 19.** Mise en évidence de la dégradation du phytate sur milieux solides (A) phytase BPP, (B) phytase HAP.

Afin de confirmer l'activité solubilisatrice, les souches présentant des auréoles de lyse sont testées en culture libre (milieu liquide). Selon **Maougal et al. (2014)**, seulement 26 isolats sur 57 ont pu se développer en milieu liquide comprenant le phytate comme seul source de phosphore.

Les cinétiques de croissances bactériennes en milieux phytase BPP et phytase HAP sont représentées respectivement dans les figures 20A et 20B.



**Figure 20.** Cinétique de croissance des bactéries en culture libre (A) phytase BPP, (B) phytase HAP. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Les trois souches (S21, A2 et S4) se développent bien en milieu phytase BPP (**Fig. 20A**), la souche S21 présente le meilleur taux de croissance en T6 correspondant au 7<sup>ème</sup> jour. Tandis que le maximum de croissance pour les souches A2 et S4 est atteint respectivement le 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour. Par contre la souche A2 présente le plus faible taux de croissance. Les souches S19 et S21 se développent bien également en milieu phytase HAP (**Fig. 20B**), le maximum de croissance est enregistré pour les deux souches le 6<sup>ème</sup> jour mais avec une meilleure croissance pour la souche S19.

Les mesures du Pi libéré dans les milieux phytase BPP et phytase HAP sont représentées respectivement dans les figures 21A et 21B.

En milieu phytase BPP, l'accumulation du Pi est significative en culture libre ainsi, le Pi libéré par la souche S21 est estimé à 192 µg/mL suivi par la souche S4 et A2 avec des valeurs respectives de 109 et 90 µg/mL.

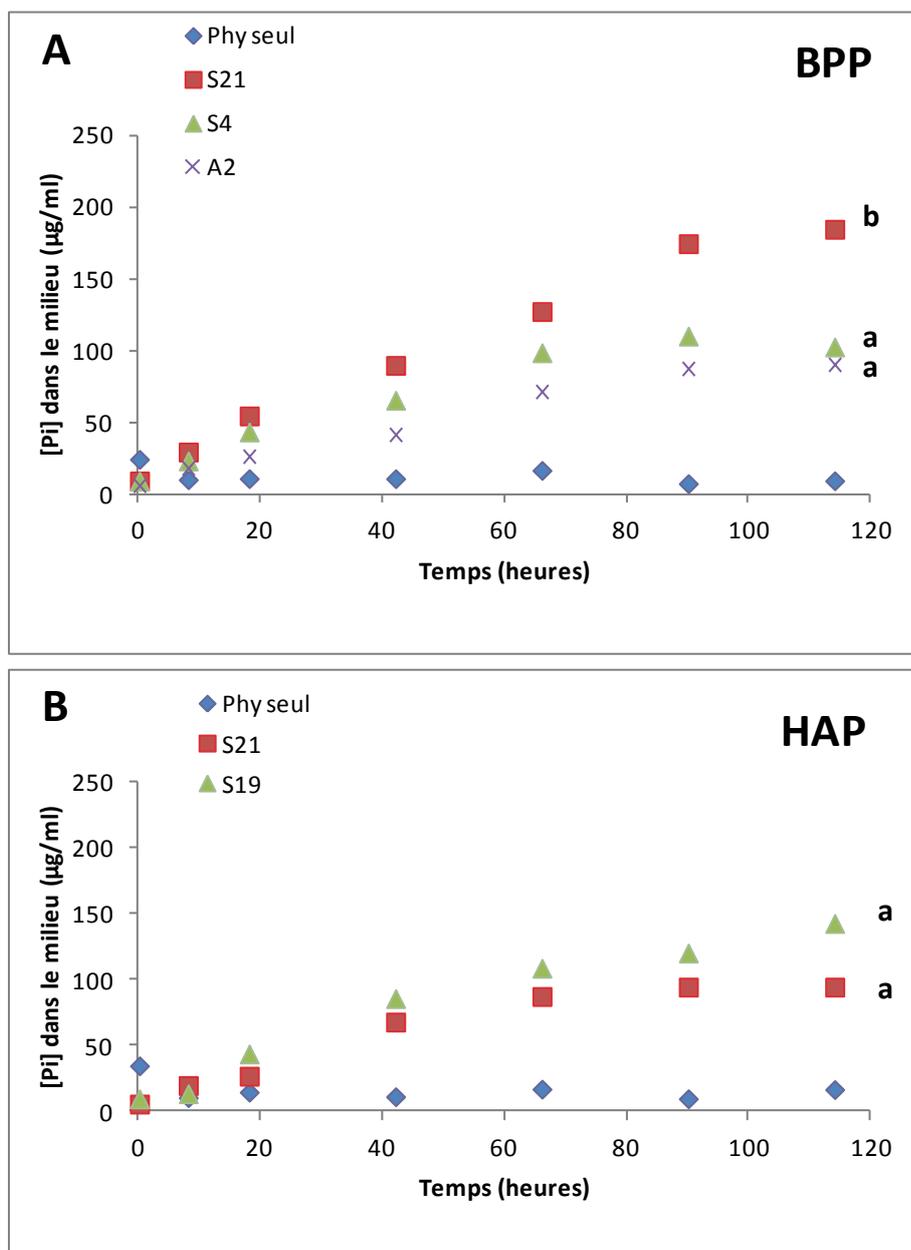
En milieu phytase HAP, le Pi libéré par la souche S19 est de l'ordre 145 µg/mL et de 98 µg/mL pour la souche S21 (**Fig. 21B**).

La libération du Pi par les souches dans le surnageant est proportionnelle à leurs croissances et ce dans les deux milieux liquides HAP et BPP.

Les mesures réalisées sur le contrôle phytate seul ne présentent pas de variations durant les essais, ce qui nous renseigne sur la stabilité du phytate dans les milieux liquides.

Des travaux réalisés par **Singh et al. (2014)**, montrent que le Pi libéré par la bactérie *Cellulosimicrobium sp.* PB-09 à 120 h et à pH 5,5 est de 189,53 µg / mL. Une corrélation positive entre l'activité de minéralisation du phytate dans les milieux solides et liquides est observée, avec une meilleure activité phytase en milieu liquide par rapport au milieu solide.

La littérature comprend plusieurs études traitant la production de phytases alcalines dérivées de *Bacillus*. Chez *B. subtilis*. Par exemple, la bactérie *B. amyloliquefaciens* DS11 sécrète une phytase alcaline en libérant 200 ppm de Pi dans le milieu (**Kim et al., 1999**).

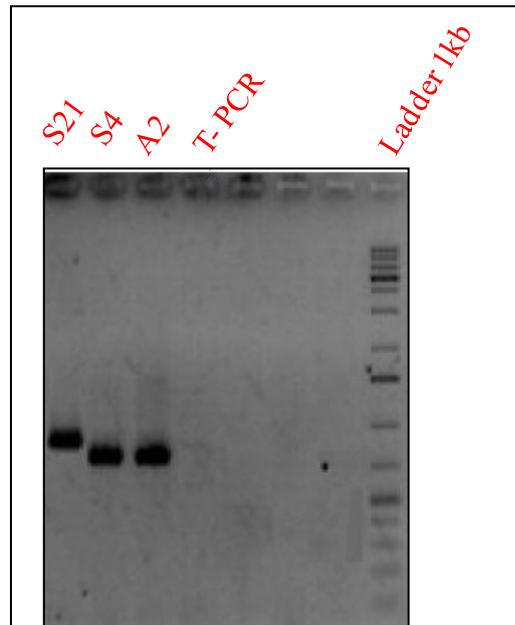


**Figure 21.** Mesures du Pi libéré dans le milieu liquide (A) activité phytase BPP, (B) activité phytase HAP. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

### IV.3.2. Amplification de la phytase BPP

Afin de vérifier l'expression du gène BPP des souches présentant un halo de lyse, une PCR sur les aliquotes d'ADN des souches concernées est réalisée. La figure 22 montre que les trois souches S21, S4 et A2 présentent une amplification entre 700 et 1000 pb spécifique du

gène BPP dont la taille attendue est 864 pb. Cependant, le témoin négatif PCR (T-PCR) ne présente aucune amplification.

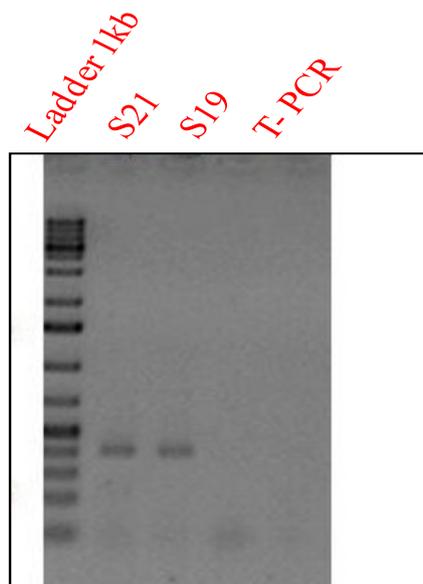


**Figure 22.** Gel d'agarose de contrôle des amplifications de la PCR du gène BPP.

Dans le but de déterminer les séquences nucléotidiques des amplifications obtenues, un séquençage est réalisé. Ainsi la séquence de la souche S21 présente 99 % d'homologie à celle du gène ABC transporteur hydrolase de *Sinorhizobium medicae* (CP000738) (Reeve et al., 2010). La séquence de la souche S4 présente 97 % d'homologie à celle de la phytase BPP de *Bacillus sp.* HJB17 (HM003049.1) (Li et al., 2011) alors que la séquence de la souche A2 présente 99 % d'homologie avec celle de la phytase alcaline de *Bacillus licheniformis* PB13 (JX187608.1) (Kumar et al., 2014).

### IV.3.3. Amplification de la phytase HAP

Dans le but de vérifier la présence du gène HAP des souches présentant une auréole de lyse, une amplification PCR est réalisée (Fig. 23).



**Figure 23.** Gel d'agarose de contrôle des amplifications du gène HAP.

Les deux souches S21 et S19 présentent une amplification entre 400 et 500 pb spécifique du gène HAP. Par ailleurs, aucune amplification n'est enregistrée chez le témoin négatif PCR (T-PCR).

Le séquençage des produits des amplifications obtenues révèle que la séquence de la souche S19 présente 97 % d'homologie à celle du gène de phytase de *Paenibacillus sp.* SPT-03 (HM151889.1) (Acuña et al., 2011). La séquence de la souche S21 présente 99% d'homologie à celle de la phytase acide de *Achromobacter sp.* PB-01 (JN616417.1) (Kumar et al., 2012).

Selon Greiner et al. (2006), les bactéries de la rhizosphère du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* sont parmi les bactéries les plus efficaces dans la minéralisation du phytate. Shedova et al. (2008), quant à eux, rapportent que la production de phytase par les rhizobactéries dont le genre appartient à *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Staphylococcus*. Les BPP sont des phytases bactériennes dont la présence a été démontrée uniquement chez les Bacilles (Gram+) et *Shewanella oneidensis* (Gram-). Ces enzymes ont une spécificité vis à vis du calcium élément indispensable pendant l'activité catalytique à pH optimal entre 7 et 8 (Plassard et al., 2015).

Le phytate de sodium en présence de calcium est hydrolysé à différents degrés en présence d'une large gamme d'acides organiques produits par les microorganismes (**Lim et al., 2007**).

Les études récentes ont démontré que la sécrétion de phytases par les microorganismes est nettement supérieure à celle des plantes, jouant ainsi un rôle déterminant dans la biodisponibilité du P et son acquisition par les plantes (**Jorquera et al., 2010**).

#### **IV.4. Conclusion**

Cette approche a principalement pour but l'identification et la caractérisation des souches de rhizobia ayant une activité phytase minéralisant ainsi le phytate.

L'étude a permis de distinguer trois souches (S21, S4 et A2) à activité phytase BPP et deux souches (S21 et S19) à activité phytase HAP dont une (S21) possédant les deux activités phytases.

Ces bactéries productrices de phytases pourraient être impliquées dans l'adaptation du niébé à la déficience en P dans le sol et pourraient donc pour la même occasion être utilisées comme bio-fertilisant pour cette légumineuse afin de rendre le phosphore bio-disponible dans la rhizosphère en améliorant ainsi l'absorption du phosphore par les plantes. Leur potentiel pour cette activité PGPR sera abordé dans le chapitre V.

#### IV.5. Références bibliographiques

Acuña J.J., Jorquera M.A., Martínez O.A., Menezes-Blackburn D., Fernández M.T., Marschner P. et Mora M.L. 2011. Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of soil science and plant nutrition*, 11(3), 1-12.

Barea J.M., Pozo M.J., Azcon R. et Azcon-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1761-1778.

Farhat A., Chouayekh H., Farhat M.B., Bouchaala K. et Bejar S. 2008. Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Molecular biotechnology*, 40(2), 127.

Fasimoye F.O., Olajuyigbe, F.M. et Sanni M.D. 2014. Purification and characterization of a thermostable extracellular phytase from *Bacillus licheniformis* PFBL-03. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(2), 193-205.

Gerke J. 2015. Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. A review. *Plants*, 4(2), 253-266.

Greiner R., Konietzny U., et Jany K.D., 2006. Phytate-an undesirable constituent of plant-based foods?. *Journal für Ernährungsmedizin*, 8(3), 18-28.

Greiner R., Turner B., Richardson A. et Mullaney E. 2007. Phytate-degrading enzymes: regulation of synthesis in microorganisms and plants. *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*, 78-96.

Huang H., Shi P., Wang Y., Luo H., Shao N., Wang G. et Yao B. 2009. Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1508-1516.

Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K. et Barea, J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and fertility of soils*, 37(1), 1-16.

Jorquera M.A., Hernández M.T., Rengel Z., Marschner P. et De La Luz Mora M. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of soils*, 44(8), 1025.

Jorquera M. A., Crowley D. E., Marschner P., Greiner R., Fernández M. T., Romero D. et De La Luz Mora M. 2010. Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS microbiology ecology*, 75(1), 163-172.

Jossi M. 2008. *Rhizosphere bacterial communities associated with Lolium perenne* (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel).

Kim D.H., Oh B.C., Choi W.C., Lee J.K. et Oh T.K. 1999. Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. *Biotechnology Letters*, 21(11), 925-927.

Kumar P., Chamoli S. et Agrawal S. 2012. Enhanced phytase production from *Achromobacter* sp. PB-01 using wheat bran as substrate: Prospective application for animal feed. *Biotechnology progress*, 28(6), 1432-1442.

Kumar V., Sangwan P., Verma A.K. et Agrawal S. 2014. Molecular and biochemical characteristics of recombinant  $\beta$ -propeller Phytase from *Bacillus licheniformis* strain PB-13 with potential application in aquafeed. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(2), 646-659.

Lei X.G., Porres J.M., Mullaney E.J. et Brinch-Pedersen H. 2007. Phytase: source, structure and application. In *Industrial enzymes*, Springer Netherlands, p.p. 505-529.

Li Z., Huang H., Yang P., Yuan T., Shi P., Zhao J. et Yao, B. 2011. The tandemly repeated domains of a  $\beta$ -propeller phytase act synergistically to increase catalytic efficiency. *The FEBS journal*, 278(17), 3032-3040.

Lim B.L., Yeung P., Cheng C. et Hill J.E. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME journal*, 1(4), 321.

Maougal R.T., Brauman A., Plassard C., Abadie J., Djekoun A. et Drevon, J.J. 2014. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *European journal of soil biology*, 62, 8-14.

Mullaney E.J. et Ullah A.H. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and biophysical research communications*, 312(1), 179-184.

Ohno T. et Zibilske L.M. 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Science Society of America Journal*, 55(3), 892-895.

Plassard C., Robin A., Le Cadre E., Marsden C., Trap J., Herrmann L. et Hinsinger P. 2015. Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol?. *Innovations Agronomiques*, 43, 115-138.

Reeve W., Chain P., O'Hara G., Ardley J., Nandesena K., Bräu L. et Copeland A. 2010. Complete genome sequence of the *Medicago microsymbiont Ensifer (Sinorhizobium) medicae* strain WSM419. *Standards in genomic sciences*, 2(1), 77.

Shedova E., Lipasova V., Velikodvorskaya G., Ovadis M., Chernin L. et Khmel I. 2008. Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of *Serratia plymuthica*. *Folia microbiologica*, 53(2), 110.

Singh P., Kumar V. et Agrawal S. 2014. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International journal of microbiology*, 2014.

Turner B.L., Papházy M.J., Haygarth P.M. et McKelvie I.D. 2002. Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1420), 449-469.

Turner B.L. 2008. Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. *Journal of Ecology*, 96(4), 698-702.

Zhang L., Fan J., Ding X., He X., Zhang F. et Feng, G. 2014. Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 74, 177-183.

## CHAPITRE V

**Effet de la déficience en phosphore sur l'activité phytase bactérienne de la symbiose rhizobia-niébé****V.1. Introduction**

La famille des légumineuses est la plus importante famille des dicotylédones et contient le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme (alimentaires, industrielles ou médicinales) (**Timko et Singh, 2008**). Parmi ces espèces le niébé occupe une place particulière compte tenu de son taux élevé de protéine et de son importance dans le régime alimentaire. Sa culture est considérée comme un élément clé de la sécurité alimentaire dans plusieurs régions d'Afrique (**Allogni et al., 2004**).

Les légumineuses sont capables d'entrer en symbiose avec des bactéries du sol, principalement du genre *Rhizobium*. Ainsi, dans la symbiose rhizobia-légumineuse, le premier partenaire fournit des substrats azotés, sous forme d'ammoniac à la plante hôte. En retour, cette dernière fournit des substrats carbonés issus de sa photosynthèse (**Waligora et Tetu, 2008**).

Dans la symbiose rhizobia-légumineuse, deux critères essentiels sont à prendre en considération, l'infectivité (l'aptitude à noduler), et l'effectivité (l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique). Ces deux critères peuvent être appréciés à l'échelle de la plante hôte et sous l'influence des conditions environnementales (Duhoux et Nicole, 2004).

La déficience en P est un facteur limitant de la fixation de l'azote, pour y remédier les chercheurs proposent l'utilisation de la co-inoculation entre une souche de rhizobia et une autre PGPR productrice de phytase hydrolysant les phosphates minéraux. Cette association microbienne joue un rôle majeur dans la nutrition minérale des plantes (**Akhtar et Siddiqui, 2009 ; Khan et al., 2014**).

L'effet de la déficience en phosphore sur les phytases notamment les phosphatases végétales, a été largement étudié chez certaines légumineuses comme *Phaseolus vulgaris* (**Lazali et al., 2013**).

Dans cette optique, les objectifs de ce chapitre sont les suivants :

Vérifier l'infectivité et l'effectivité des rhizobia isolés (**Chapitre III**) en conditions contrôlées et évaluer l'impact de la déficience en phosphore sur l'activité phytase bactérienne de la symbiose rhizobia-niébé.

## V.2. Matériel et méthodes

### V.2.1. Matériel biologique et conditions de culture

L'étude est menée sous serre en conditions contrôlées (température 28/20° C pendant un cycle jour / nuit 16/8 h à 70% d'humidité relative pendant la journée) au laboratoire Eco&Sol INRA de Montpellier, en utilisant la lignée IT 90 K 372-1-2 de niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp)). Les graines sont stérilisées avec une solution d'hypochlorite de calcium à 7%. Une semaine après germination (radicule à 4 cm de long) elles sont transférées en bouteilles contenant 1L de solution nutritive.

Pour évaluer l'efficacité (l'infectivité et l'effectivité) des 18 souches autochtones, la souche de référence CB756 (*Bradyrhizobium sp.*) est utilisée comme contrôle.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de rhizobia conservée dans des tubes à 4°C, puis transféré dans 100 ml de milieu liquide YEM stérile et incubé à 28°C en agitation 120 tours/min jusqu'à une densité cellulaire approximative de  $10^9$  ml<sup>-1</sup> (Vincent, 1970), pendant 48 h pour les bactéries à croissance rapide, 72 h pour les bactéries à croissance intermédiaire et 120 h pour les bactéries à croissance lente. L'inoculation est réalisée au moment du transfert avec 1ml de l'inoculum et ce pour chaque souche.

L'apport du P se fait sous forme de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15 ou 75 µmol par plante et par semaine respectivement pour le traitement P déficient et P suffisant) en présence de ; CaCl<sub>2</sub> (1,65 mM); MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (1,0 mM); K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,7 mM); Fe EDDHA (8,5 µM Fe sequestrene); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (3,4 µM); MnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (6mM); ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (1 mM); CuSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (1 mM); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (0,1 mM). Un apport de 2mM d'urée est rajouté par plante dans la solution initiale puis réduit à 1 mM par plante au premier changement de solution après deux semaines, afin d'optimiser le processus de nodulation (Hernandez et Drevon, 1991). Le témoin urée reçoit 5 mM d'urée à chaque changement de solution. En ajoutant 0,2 g de CaCO<sub>3</sub>/ L chaque semaine à la solution nutritive afin d'ajuster le pH à environ 7. Les plantes sont aérées intensément par le flux d'air comprimé à 400 ml/min/plante.

Le dispositif expérimental adopté est un split plot avec 3 répétitions (Fig. 24).



**Figure 24.** Vue générale de l'essai expérimental en serre

### V.2.2. Mesures réalisées

Les plantes sont récoltées au stade floraison (81 jours après transfert en bouteilles), les parties aériennes sont séparées des parties racinaires au niveau du collet et les nodules sont détachés des racines. La matière sèche est déterminée après séchage à l'étuve pendant 3 jours à 70°C.

Par la suite, les échantillons secs sont broyés en poudre fine dans un broyeur à bille pour doser l'azote et le phosphore des différentes parties.

Pour l'analyse du P, la prise d'essai des échantillons (parties aériennes, racinaires et nodules) est de  $50 \pm 0,5$  mg, les échantillons sont digérés par  $\text{HNO}_3$  dans un four à micro-ondes en téflon (petit réacteur) à 180°C pendant 15 min, le dosage colorimétrique du P est réalisé ultérieurement avec le vanado-molybdate à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm.

Pour la détermination de l'azote, la prise d'essai des échantillons est de  $3 \pm 0,5$  mg analysée au CHN par spectrométrie de masse.

### V.2.3. Analyses des données

L'analyse de la variance est réalisée à l'aide du logiciel R [R Core team, 2013], une ANOVA à deux facteurs est effectuée dont le premier facteur porte sur l'effet du traitement de P apporté le deuxième facteur porte sur l'effet des souches. Le test de Tukey est utilisé afin de déterminer la différence entre les moyennes à un seuil de probabilité de 0,05.

## V.3. Résultats et discussion

### V.3.1. Authentification des souches et nodulation

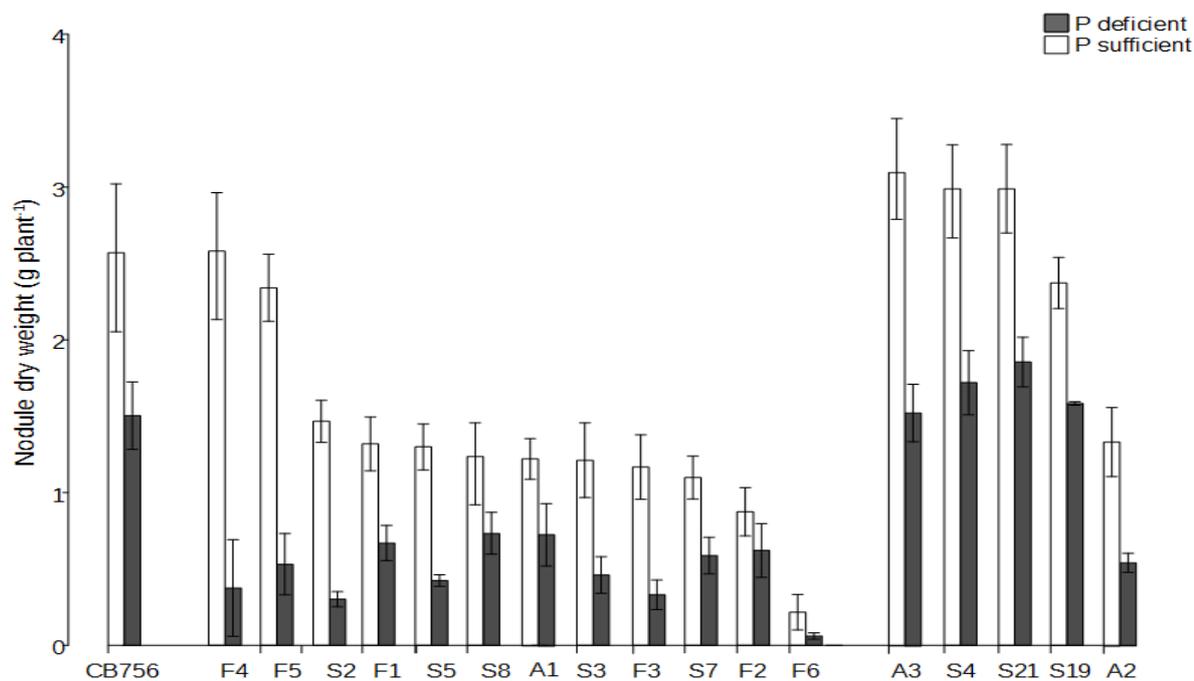
Le test d'authentification consiste à vérifier l'aptitude des souches à noduler lorsqu'elles sont inoculées à la plante hôte (**Vincent, 1970**). Dans cette étude, la lignée IT90K 372-1-2 de niébé est utilisée pour évaluer l'aptitude à noduler des 18 souches isolées (Chapitre III) Toutes les souches ont nodulé sauf la S10 qui va servir comme témoin négatif strict (sans apport d'urée).

Le poids sec des nodules, considéré comme étant le meilleur paramètre de diagnostic nodulaire, est représenté dans la figure 25. Les résultats de l'ANOVA du poids sec des nodules sont présentés dans le tableau 1 (**Annexe 4**). Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 2 (**Annexe 4**).

L'ANOVA du poids sec des nodules, montre que le traitement de P et l'inoculation ont un effet très hautement significatif sur le poids sec des nodules et l'interaction entre ces deux facteurs affecte significativement ce paramètre.

En conditions de suffisance en P, la souche A3 présente le poids sec nodulaire le plus important (3,09g) dépassant la souche de référence CB756, le poids sec nodulaire le plus faible est enregistré pour la souche F6 (0,12g). En conditions de déficience en P, la valeur la plus élevée du poids sec nodulaire est constatée chez la souche S21 (0,30g) alors que la plus faible est notée toujours chez la souche F6 (0,09g).

Toutes les souches présentent une biomasse nodulaire supérieure sous conditions suffisantes en P que sous déficience en P ; la plus importante amélioration est notée chez les souches S4, S19 et S21 (souches à activité phytase) d'environ 10% par rapport à la souche CB756, la plus faible est enregistrée chez les souches F6, S2, S5 et F3.



**Figure 25.** Effet de la nutrition en P sur le poids sec des nodules formés par les différentes souches. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard.

Le nombre et le poids sec des nodules de type déterminé sont régulés par les rhizobia en synthétisant l'acide gibbérellique, la production de ce dernier varie d'une souche à une autre (**Tatsukami et Ueda, 2016**).

La diminution du poids sec des nodules sous déficience en P est soulignée par plusieurs auteurs et ce chez plusieurs espèces de légumineuses ; *Pisum sativum* (**Geneva et al., 2006**) et *Phaseolus vulgaris* L. (**Alkama et al., 2009**).

En effet, la déficience en P limite le développement des nodules en réduisant leur approvisionnement en métabolites provoquant ainsi la diminution du poids sec nodulaire (**Tang et al., 2001**). Ainsi, la taille et le nombre de nodules sont fortement corrélés à la disponibilité en P (**Mandri et al., 2012**).

L'augmentation du poids sec nodulaire chez les souches S21, S19 et S4 en conditions de déficience en P suggère une amélioration due à l'activité phytase bactérienne.

### V.3.2. Poids sec des parties aériennes et racinaires

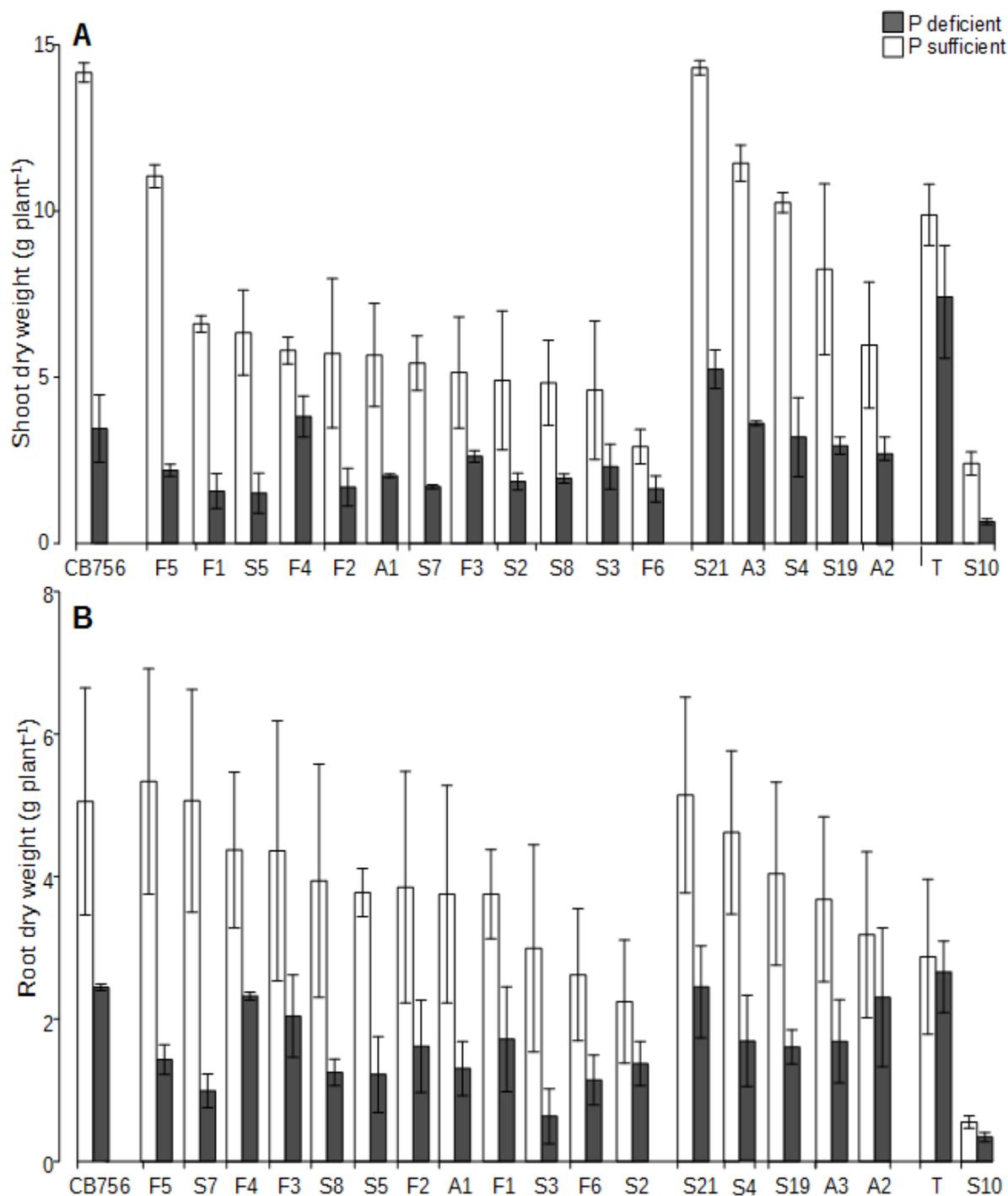
Afin de vérifier l'impact de la déficience en P sur la croissance des plantes, les poids secs des parties aériennes et racinaires sont mesurés (**Fig. 26**)

Les résultats de l'ANOVA du poids sec des parties aériennes (**Tableau 3**) (**Annexe 4**), montre que le traitement de P, le facteur souches et l'interaction entre les deux ont un effet très hautement significatif sur le poids sec des parties aériennes. Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 4 (**Annexe 4**).

Selon la figure 26A, en conditions de suffisance en P, la souche S21 présente le poids sec de la partie aérienne le plus important (14,59g) dépassant la souche de référence CB756 et le témoin urée, le poids sec le plus faible est enregistré pour la souche S10 n'ayant pas nodulé et considéré comme un témoin négatif strict (3,02g). En conditions de déficience en P, la plus grande biomasse aérienne est constatée chez la souche S21 (5,6g) alors que la plus faible est notée toujours chez la souche S10 (0,8g).

Toutes les souches présentent une biomasse de la partie aérienne supérieure sous conditions suffisantes en P que sous déficience en P ; la plus importante amélioration est notée chez les souches A3, F4 et S21, la plus faible est enregistrée chez les souches S5, F1 et S7.

Le poids sec des parties aériennes est un paramètre important pour l'évaluation de la tolérance des légumineuses à la déficience en P (**Zhou et al., 2009**). La déficience en P affecte significativement le poids sec des parties aériennes pour l'ensemble des couples symbiotiques, ces résultats rejoignent ceux en culture hydroaéroponique d'**Araújo et al. (2008)** et **Zhou et al. (2009)**. La croissance aérienne et la fixation de N<sub>2</sub> sont déterminées principalement par la disponibilité du P et l'efficacité de l'absorption de cet élément (**Rodino et al., 2009**).



**Figure 26.** Effet de la déficience en P sur le poids sec des parties aériennes (A) et des parties racinaires (B). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard.

Les résultats de l'ANOVA du poids sec des parties racinaires (**Tableau 5**) (**Annexe 4**), montre que le traitement de P a un effet très hautement significatif sur le poids sec des parties racinaires alors que le facteur souches affecte significativement ce paramètre et aucun effet de l'interaction des deux facteurs . Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 6 (**Annexe 4**).

Selon la figure 26B, en conditions de suffisance en P, la souche F5 présente le poids sec de la partie racinaire le plus élevé (5,51g) dépassant la souche de référence CB756 et le témoin urée, le poids sec le plus faible est enregistré pour la souche S10 n'ayant pas nodulé et considéré comme un témoin négatif strict (1,09g). En conditions de déficience en P, la valeur la plus élevée de la biomasse de la partie racinaire est enregistrée chez le témoin urée (2,23 g) suivi par la S21 (2,19g) alors que la plus faible est notée pour la souche S10 (0,7g).

Toutes les souches présentent une biomasse de la partie racinaire supérieure sous conditions suffisantes en P que sous déficience en P ; la plus importante amélioration est notée chez les souches A2, S21 et F4, la plus faible est enregistrée chez les souches S3, S7 et S8.

Nos résultats rejoignent ceux de **Kouas et al. (2009)** et **Geneva et al. (2006)**. Ces auteurs rapportent que le traitement de P et le facteur souches affectent significativement le poids sec des racines, tandis que l'interaction entre les deux facteurs n'a aucun effet sur ce paramètre.

L'amélioration du poids sec des parties racinaires des couples symbiotiques comparés au témoin urée en conditions de suffisances en P serait due à la propriété PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) des rhizobia, qui produisent activement l'acide indole acétique (AIA) à partir du L-Tryptophan excrété par les racines des plantes (**Ahmed et al., 2008**). L'AIA a pour rôle d'accélérer la croissance des racines, modifier l'architecture racinaire et d'augmenter la biomasse racinaire, permettant ainsi aux plantes d'avoir une meilleure possibilité d'absorption des éléments minéraux notamment le P (**Swain et al., 2007**; **Hariprasad et Niranjana, 2009**). Par contre, **Bernal et al., (2005)**, rapportent que la déficience en P affecte les paramètres de croissance chez les légumineuses et inhibe même la croissance racinaire.

### V.3.3. Teneurs en P des nodules, des parties aériennes et racinaires

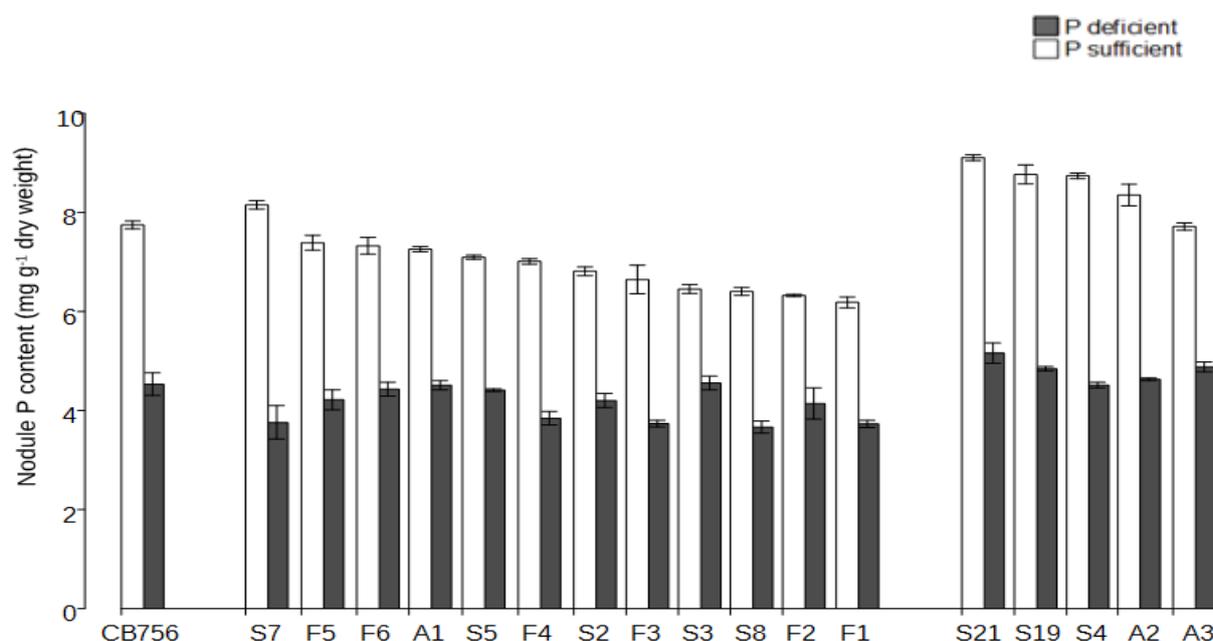
L'effet de la déficience en P sur la teneur en P des nodules (**Fig. 27**), des parties aériennes et racinaires (**Fig. 28**) est évalué au stade floraison.

Les résultats de l'ANOVA de la teneur en P des nodules (**Tableau 7**) (**Annexe 4**), montre que le traitement de P, le facteur souches et l'interaction entre les deux affectent significativement la teneur en P des nodules. Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 8 (**Annexe 4**).

En condition de suffisance en P, la teneur en P nodulaire la plus élevée est enregistrée chez la souche S21 (9,14 mg.g<sup>-1</sup> MS) dépassant la CB756, la plus faible valeur est notée pour la F1 (6,21 mg.g<sup>-1</sup> MS). Sous les conditions de limitation en P, c'est encore la souche (S21) qui enregistre la plus forte teneur en P des nodules (5,12 mg.g<sup>-1</sup> plante), la plus faible valeur est enregistrée pour F3 (3,63 mg.g<sup>-1</sup> MS) (**Fig. 27**).

La déficience en P induit une diminution remarquable de la teneur en P nodulaire chez l'ensemble des couples symbiotiques. Les meilleures améliorations sous déficience en P sont enregistrées pour les souches A2, A3, S19 et S21.

En effet le poids sec nodulaire est fortement corrélé à la disponibilité du P chez les légumineuses (**Drevon et Hartwig, 1997 ; Hellsten et Huss-danell, 2000 et Kouas et al., 2005**).



**Figure 27.** Effet de la déficience en P sur la teneur en P des nodules. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard.

Les résultats de l'ANOVA de la teneur en P des parties aériennes (**Tableau 9**) (**Annexe 4**), montre que le traitement de P, le facteur souches et l'interaction entre les deux ont un effet très hautement significatif sur la teneur en P des parties aériennes. Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 10 (**Annexe 4**).

D'après la figure 28A, en condition de suffisance en P, une forte concentration du P est enregistrée chez la souche A3 (8,04 mg g<sup>-1</sup> MS). Sous limitation de P c'est la souche S21 qui enregistre la plus forte teneur en P dans la partie aérienne (7,2 mg g<sup>-1</sup> MS) dépassant même le témoin urée.

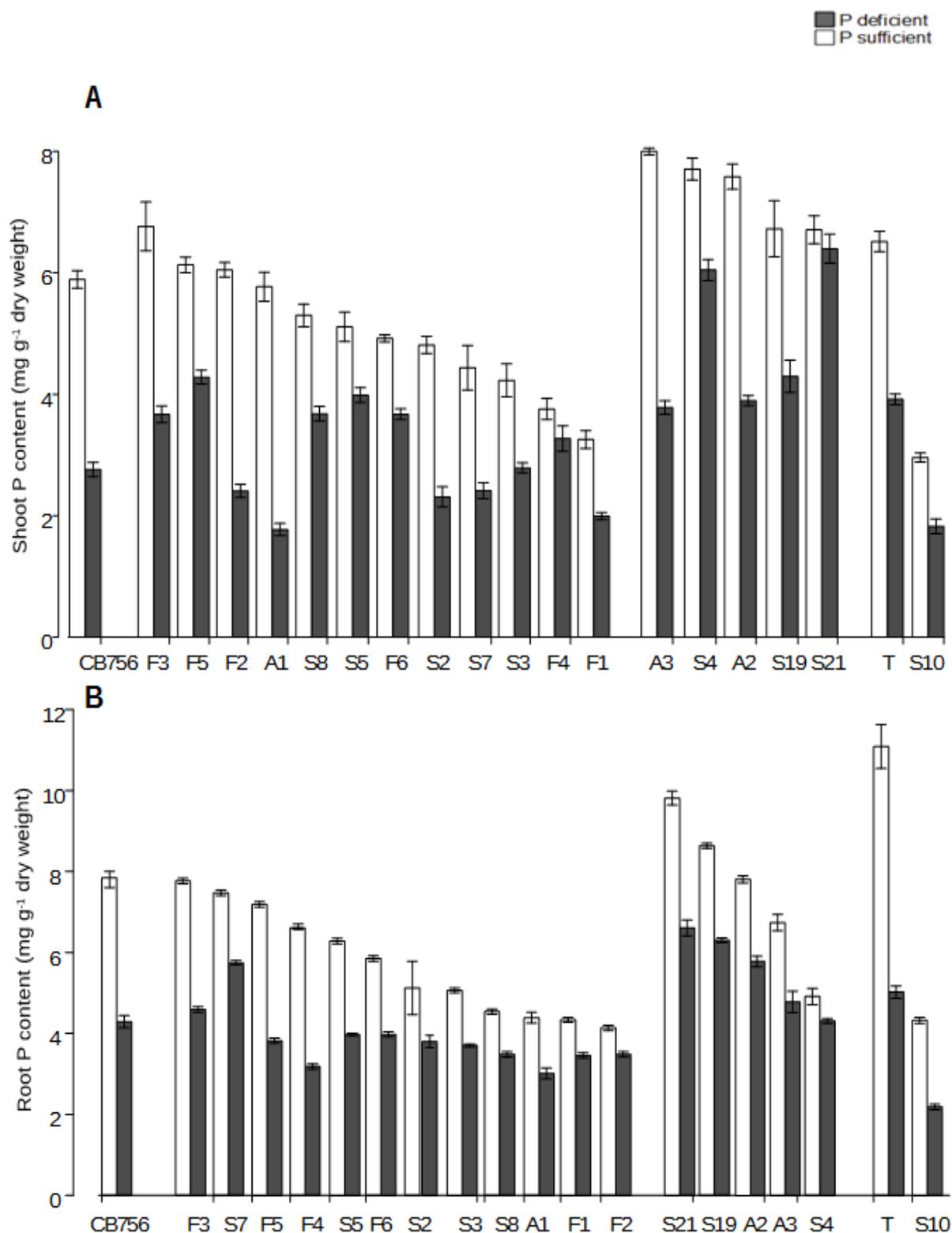
La déficience en P a provoqué une diminution significative de la teneur en P de la partie aérienne chez l'ensemble des couples symbiotiques. Les meilleures améliorations de la teneur en P des parties aériennes en conditions de déficience en P sont enregistrées chez les souches S4, S19 et S21.

L'ANOVA de la teneur en P des parties racinaires (**Tableau 11**) (**Annexe 4**), montre que le traitement de P, le facteur souches et l'interaction entre les deux ont un effet très hautement significatif sur la teneur en P des parties racinaires. Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 12 (**Annexe 4**).

D'après la figure 28B, en condition de suffisance en P, la forte concentration du P est enregistrée chez la souche S21 (9,76 mg g<sup>-1</sup> plante). Sous les conditions de déficience en P c'est la souche (S21) qui a enregistré la plus forte concentration du P dans la partie racinaire (6,9 mg g<sup>-1</sup> plante) dépassant même le témoin urée.

La déficience en P a provoqué une diminution significative de la teneur en P de la partie aérienne chez l'ensemble des couples symbiotiques. Les meilleures améliorations de la teneur en P des parties racinaires en P déficient sont enregistrées pour les souches S4, S19, F5 et S21.

Plusieurs auteurs observent une diminution significative de la teneur en P des parties aériennes et racinaires sous déficience en P chez *Pisum sativum* (**Geneva et al., 2006**) et *Phaseolus vulgaris* (**Kouas et al., 2009**).



**Figure 28.** Effet de la déficience en P sur la concentration en P des parties aériennes (A) et des parties racinaires (B). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard.

De nombreuses études abordent l'effet des co-inoculations des bactéries solubilisatrices du P organique et les rhizobia sur différentes légumineuses. En co-inoculation, *Pseudomonas aeruginosa* avec *Mesorhizobium sp.* sur pois chiche, on observe une augmentation de la biomasse sèche de la partie aérienne et racinaire, de la nodulation de la teneur en P et en N de la plante, et du rendement en grain (Verma et al., 2013). En association, *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 avec *Sinorhizobium medicae* WSM 419 sur *Medicago truncatula*, on obtient une augmentation de la nodulation et de la fixation symbiotique de l'azote (Fox et al., 2011). En co-inoculation *Azospirillum sp.* avec *Rhizobium sp.* sur haricot, on remarque une augmentation de la biomasse et la teneur en P de la partie aérienne (Remans et al., 2008). Toutes ces études soulignent l'amélioration de la disponibilité en P favorisant ainsi la croissance des plantes.

Cependant, une seule étude aborde l'utilisation de rhizobia transgénique à activité phytase, montrant une amélioration de la croissance du maïs lorsqu'il est inoculé avec une souche de *Mesorhizobium meliloti* transgénique intégrant dans son plasmide le gène codant pour l'activité phytase de *Escherichia coli* K12 (Sharma et al., 2016).

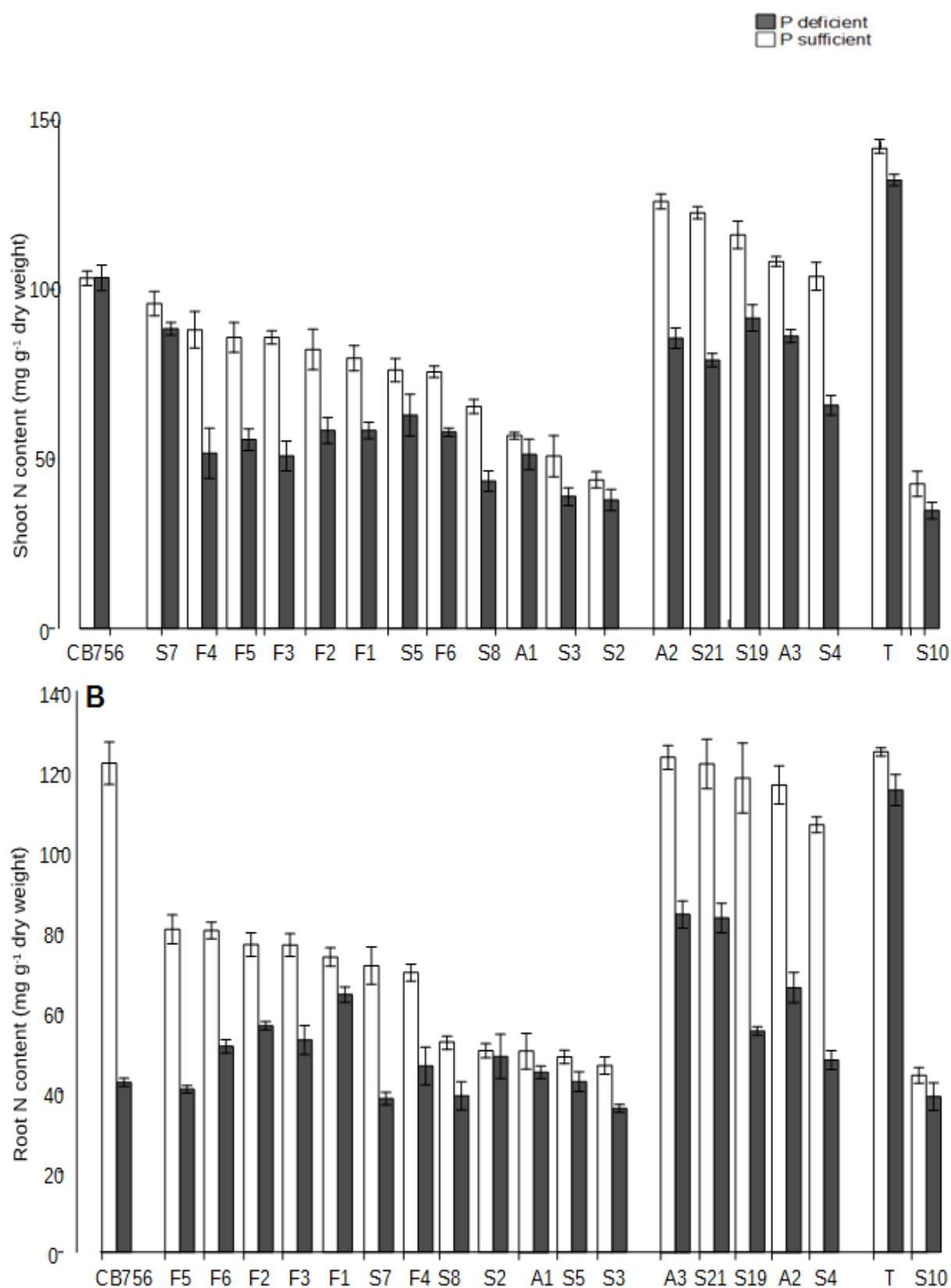
#### V.3.4. Teneurs en N des parties aériennes et racinaires

Afin d'évaluer l'effectivité des souches sous déficience en P, les teneurs en N des parties aériennes (Fig. 29A) et des parties racinaires (Fig. 29B) sont déterminées au stade floraison.

L'ANOVA de la teneur en N des parties aériennes (Tableau 13) (Annexe 4), montre que le traitement de P, le facteur souches et l'interaction entre les deux ont un effet très hautement significatif sur la teneur en N des parties aériennes. Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 14 (Annexe 4).

D'après la figure 29A, en condition de suffisance en P, la forte concentration en N est enregistrée chez la souche A2 (122,6 mg g<sup>-1</sup> MS) après le témoin urée. Sous les conditions de déficience en P c'est la souche S19 juste après la CB756 et le témoin urée qui enregistre la plus forte concentration en N de la partie aérienne (96,05 mg g<sup>-1</sup> MS).

La déficience en P provoque une diminution significative de la teneur en N de la partie aérienne chez l'ensemble des couples symbiotiques sauf chez la CB756. Les meilleures améliorations de la teneur en N des parties aériennes en P déficient sont enregistrées pour les souches A3, S21, S7 et S19.



**Figure 29.** Effet de la déficience en P sur la concentration en N des parties aériennes (A) et des parties racinaires (B). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison. Les barres indiquent l'erreur standard.

L'ANOVA de la teneur en N des parties racinaires (**Tableau 15**) (**Annexe 4**), montre que le traitement de P, le facteur souches et l'interaction entre les deux ont un effet très hautement significatif sur la teneur en N des parties racinaires. Les résultats du test de Tukey sont représentés dans le tableau 16 (**Annexe 4**).

D'après la figure 29B, en condition de suffisance en P, la forte concentration du N est enregistrée chez la souche A3 (121,02 mg g<sup>-1</sup> MS) après le témoin urée (126,32 mg g<sup>-1</sup> MS). Sous les conditions de déficience en P c'est encore la souche A3 qui enregistre la plus forte concentration en N dans la partie racinaire (87,2 mg g<sup>-1</sup> MS) après le témoin urée (109,62 mg g<sup>-1</sup> MS).

La déficience en P a provoqué une diminution significative de la teneur en N de la partie racinaire chez l'ensemble des couples symbiotiques sauf chez la souche A3. Les meilleures améliorations de la teneur en N des parties racinaires en P déficient sont enregistrées pour les souches A2, S21 et A3.

L'effectivité des rhizobia est appréciée en comparant la concentration d'azote contenue dans une légumineuse en symbiose et celle du témoin urée (**Sprent, 2009**). Les souches effectives améliorent le contenu en azote des plantes en symbiose pouvant même dépasser celui des plantes cultivées sous fertilisation azotée (**Kiers et al., 2007**). Les rhizobia grâce à leur capacité de fixation de l'azote favorisent la croissance et le rendement des plantes en augmentant leurs teneurs en N (**Dakora, 2003**).

Les nodules ne fixant pas d'azote sont considérés comme parasites vis-à-vis de la plante hôte (**Provorov et Tikhonovich, 2003**).

La non effectivité des nodules peut s'expliquer par la réduction du nombre de cellules infectées (**Terpolilli et al., 2008**) ou par leurs faibles teneurs en hémoglobine (**Sprent et James, 2008**). Dans certains cas la non effectivité est accompagnée par la formation de nodules de petites tailles (**Sprent, 2001**).

Les souches à activité phytase améliorent la disponibilité en P pour la plante et donc augmentent sa capacité à fixer l'azote. En effet, l'acquisition en P améliore le contenu en azote dans les plantes et les graines des légumineuses (**Kolawole et al., 2000**).

Les rhizobia à activité phytase contribuent d'une part à la nutrition phosphatée de la plante à travers la sécrétion d'enzymes hydrolysant les phosphates minérales et en

l'amélioration de l'acquisition de l'azote par la plante. Cette association entre les racines de la légumineuse et la solubilisation microbienne joue un rôle majeur dans la nutrition minérale végétale.

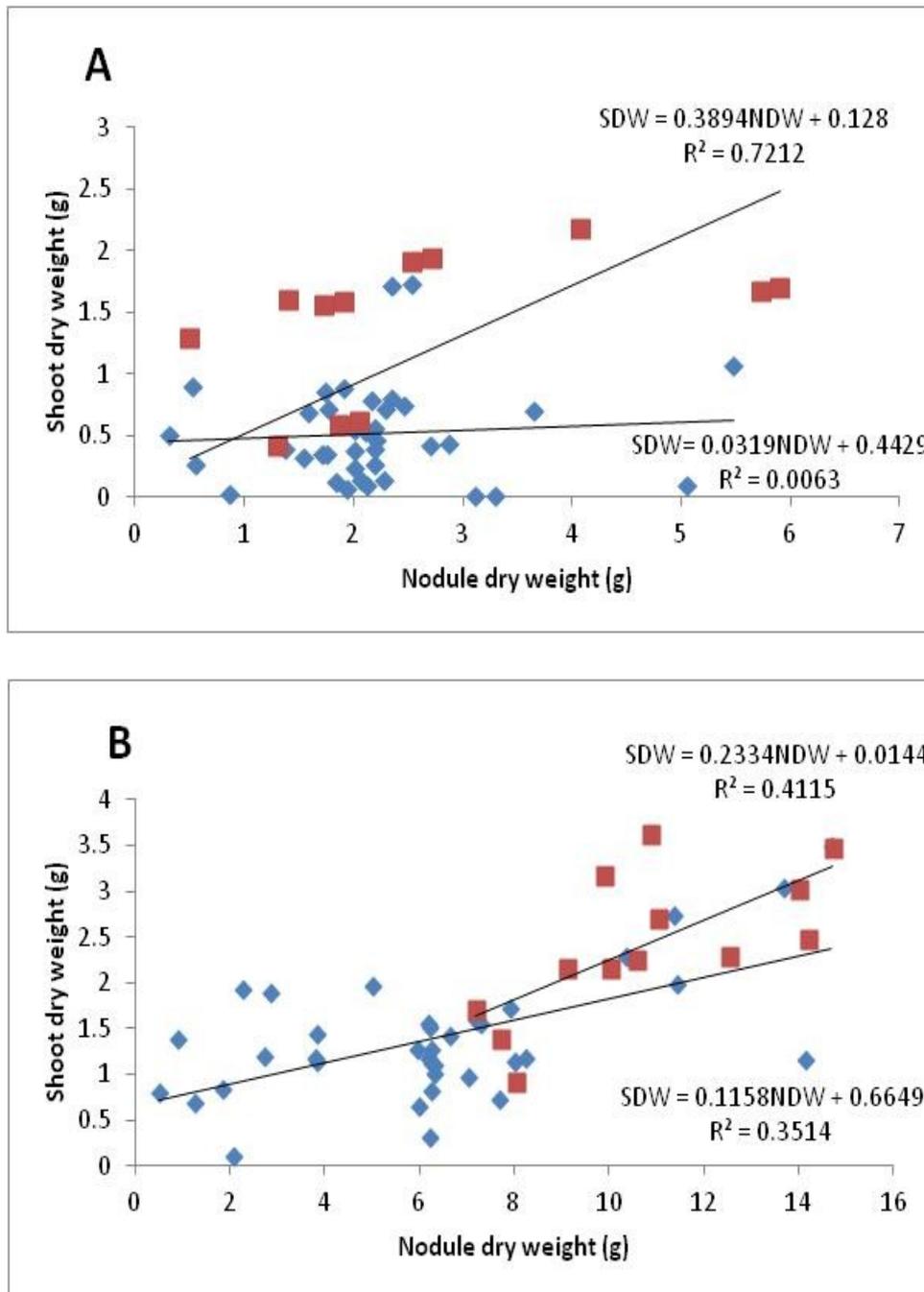
### **V.3.5. Efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne**

Afin de vérifier l'efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne chez les couples symbiotiques à activité phytase (phy +) versus ceux sans activité phytase (phy -), une régression est établie entre le poids sec des parties aériennes et le poids sec des nodules et ce pour les deux conditions de P (**Fig. 30**).

Sous déficience en P (**Fig. 30A**), une forte corrélation ( $R^2=0,72$ ) est enregistrée pour les couples symbiotiques (phy +) avec une augmentation du poids sec des parties aériennes en fonction du poids sec des nodules et une amélioration de l'EURS. Par contre, les couples symbiotiques (phy -) ne présentent pas de corrélation entre les deux paramètres.

En condition de suffisance en P (**Fig. 30B**), une corrélation positive ( $R^2= 0,35$ ) est enregistrée pour les couples symbiotiques (phy -) entre les deux paramètres alors que les couples symbiotiques (phy +) présentent une amélioration de l'EURS de 6%.

L'augmentation de l'EURS pour les couples symbiotiques (phy +) sous conditions de déficience en P suggère une forte régulation entre l'EURS et les exigences en P des nodules, probablement par rapport au besoin énergétique nécessaire au processus de fixation symbiotique de l'azote (**Rotaru et Sinclair, 2009**). Cela suppose que l'activité phytase bactérienne comblerait le besoin énergétique nécessaire à la fixation symbiotique de l'azote sous déficience en P.



**Figure 30.** Efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne des couples symbiotiques à activité phytase bactérienne (rouge) versus les couples symbiotiques sans activité phytase bactérienne, en conditions de déficience en P (**A**) et en conditions de suffisance en P (**B**). Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions au stade floraison.

#### **V.4. Conclusion**

Ce travail a pour but de vérifier l'infectivité des souches et leur efficacité à fixer l'azote atmosphérique en conditions de déficience en P.

Seule la souche S10 est incapable d'infecter la plante et donc n'est pas apte à fixer l'azote. Les souches restantes sont efficaces et capables de fixer l'azote atmosphérique.

L'adaptation des symbioses rhizobia-niébé à la déficience en P varie en fonction des souches. Cependant, ce sont les souches à activité phytase qui sont les plus efficaces aussi bien en conditions de suffisance en P qu'en déficience en P en particulier la S21 probablement suite à sa double activité phytase.

L'utilisation des rhizobia améliore la disponibilité des nutriments pour les plantes, réduit la dépendance vis-à-vis des fertilisants et prévient l'accumulation des nitrates et des phosphates dans les sols agricoles (**Taurian et al., 2012**). Les souches à activité phytase bactériennes peuvent constituer une stratégie pour améliorer la fixation d'azote sous déficience en phosphore, il serait donc judicieux de développer des bio-inoculants pour favoriser la fixation N<sub>2</sub> et améliorer la nutrition phosphatée notamment en zones céréalières où les sols sont riches en calcaire et déficients en P (**Sharma et al., 2016**).

### V.5. Références bibliographiques

Ahmad F., Ahmad I. et Khan M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.

Akhtar M. et Siddiqui, Z. 2009. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Rhizobium sp.* on the growth, nodulation, yield and root-rot disease complex of chickpea under field condition. *African Journal of Biotechnology*, 8(15).

Alkama N., Bolou E.B.B., Vailhe H., Roger L., Ounane S.M. et Drevon J.J. 2009. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1814-1823.

Allogni W.N., Coulibaly O.N. et Honlonkou A.N. 2004. Impact des nouvelles technologies du niébé sur la sécurité alimentaire des ménages agricoles au Bénin: Cas du département de l'Ouémé. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*, (44), 13-22.

Araújo A.P., Plassard C., et Drevon J.J., 2008. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant and soil*, 312(1-2), 129.

Bernal L., Coello P. et Martínez-Barajas E. 2005. Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings under phosphate deficiency. *Journal of plant physiology*, 162(9), 970-976.

Dakora F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytologist*, 158(1), 39-49.

Drevon J.J. et Hartwig U.A. 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta*, 201(4), 463-469.

Duhoux E. et Nicole M. 2004. Associations et interactions chez les plantes. *Éditions Dunod, Paris*. 152p.

Fox S.L., O'Hara G.W. et Bräu L. 2011. Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant and soil*, 348(1-2), 245.

Geneva M., Zehirov G., Djonova E., Kaloyanova N., Georgiev G. et Stancheva I. 2006. The effect of inoculation of pea plants with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* on nitrogen and phosphorus assimilation. *Plant Soil and Environment*, 52(10), 435.

Hariprasad P. et Niranjana S.R. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and soil*, 316(1-2), 13-24.

Hellsten A. et Huss-Danell K. 2000. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science*, 50(3), 135-142.

Hernandez G. et Drevon J.J. 1991. Influence of oxygen and acetylene during in situ open-flow assays of nitrogenase activity ( $C_2H_2$  reduction) in *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Journal of plant physiology*, 138(5), 587-590.

Khan M.S., Zaidi A. et Ahmad E. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate solubilizing microorganisms*. Springer International Publishing, pp. 31-62.

Kolawole G.O., Tian G. et Singh B.B. 2000. Differential response of cowpea lines to aluminum and phosphorus application. *Journal of plant nutrition*, 23(6), 731-740.

Kouas S., Labidi N., Debez A. et Abdelly C. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for sustainable development*, 25(3), 389-393.

Kouas S., Louche J., Debez A., Plassard C., Drevon J.J. et Abdelly C. 2009. Effect of phosphorus deficiency on acid phosphatase and phytase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under symbiotic nitrogen fixation. *Symbiosis*, 47(3), 141-149.

Lazali M., Zaman-Allah M., Amenc L., Ounane G., Abadie J. et Drevon J.J. 2013. A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta*, 238(2), 317-324.

Mandri B., Drevon J.J., Bargaz A., Oufdou K., Faghire M., Plassard C., et Ghoulam C. 2012. Interactions between common bean genotypes and rhizobia strains isolated from Moroccan soils for growth, phosphatase and phytase activities under phosphorus deficiency conditions. *Journal of plant nutrition*, 35(10), 1477-1490.

Provorov N.A. et Tikhonovich I.A. 2003. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(1), 89-99.

Remans R., Ramaekers L., Schelkens S., Hernandez G., Garcia A., Reyes J.L. et Vanderleyden J. 2008. Effect of *Rhizobium–Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and soil*, 312(1-2), 25-37.

Rodino A.P., Metral R., Guglielmi S. et Drevon J.J. 2009. Variation among common-bean accessions (*Phaseolus vulgaris* L.) from the Iberian Peninsula for N<sub>2</sub>-dependent growth and phosphorus requirement. *Symbiosis*, 47(3), 161-174.

Rotaru V. et Sinclair T.R. 2009. Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 94-99.

Sharma V., Kumar A., Archana G. et Kumar G.N. 2016. *Ensifer meliloti* overexpressing *Escherichia coli* phytase gene (appA) improves phosphorus (P) acquisition in maize plants. *The Science of Nature*, 103(9-10), 76.

Sprent J.I. 2001. *Nodulation in legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew.

Sprent J.I. et James E.K. 2008. Legume–rhizobial symbiosis: an anorexic model?. *New Phytologist*, 179(1), 3-5.

Sprent J. 2009. Legume nodulation. John Wiley & Sons, United Kingdom, pp.36–45.

Swain M.R., Naskar S.K., et Ray R.C., 2007. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Polish Journal of Microbiology*, 56(2), 103.

Tatsukami Y. et Ueda M. 2016. Rhizobial gibberellin negatively regulates host nodule number. *Scientific reports*, 6, 27998.

Taurian T., Ibáñez F., Angelini J., Tonelli M.L. et Fabra A. 2012. Endophytic bacteria and their role in legumes growth promotion. In : *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 141-168.

Terpolilli J.J., O'Hara G.W., Tiwari R.P., Dilworth M.J. et Howieson, J.G. 2008. The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N<sub>2</sub> fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytologist*, 179(1), 62-66.

Timko M.P. et Singh B.B. 2008. Cowpea, a multifunctional legume. In *Genomics of tropical crop plants*. Springer, New York, NY, pp. 227-258.

Verma J.P., Yadav J., Tiwari K.N. et Kumar A. 2013. Effect of indigenous *Mesorhizobium spp.* and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering*, 51, 282-286.

Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: International Biological Programme Handbook n° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73-97.

Waligora C. et Tetu T. 2008. Légumineuses, il est urgent de les réhabiliter. *Techniques Culturelles Simplifiées*, n(48).

Zhou L.L., Cao J., Zhang F.S. et Li L. 2009. Rhizosphere acidification of faba bean, soybean and maize. *Science of the Total Environment* 407 (2009), 4356–4362

## CHAPITRE VI

### Localisation par Rt PCR in situ du gène $\beta$ -propeller phytase dans les nodules de la symbiose rhizobia-niébé

#### VI.1. Introduction

Le phosphore est l'un des éléments essentiels pour la croissance et le développement des plantes mais sa disponibilité est restreinte dans les systèmes agricoles. Actuellement, de nombreux sols ont une teneur totale en P élevée en raison des apports répétés d'engrais phosphatés sur de longues périodes, souvent polluants et onéreux (**Rodriguez et al., 2006 ; Richardson et al., 2009**). Cependant, une grande partie de cet élément est sous forme minérale insoluble de phosphates d'aluminium et de fer dans les sols acides et de phosphates de calcium dans les sols alcalins, formes indisponibles pour la plante (**Balser et al., 2005 ; Goldstein et Krishnaraj, 2007**).

Le P organique représente environ 50 à 80% du P total majoritairement sous forme de phytate (**Turner et al., 2002**). L'accumulation de ce dernier est attribuée d'une part à la complexité de son hydrolyse par les phytases et les phosphatases et d'autre part à son adsorption à divers composants du sol en raison de sa forte charge négative (**Tang et al., 2006 ; Lung et Lim, 2006**).

Les formes organiques de P ne sont assimilables par les plantes qu'après leur hydrolyse par les phytases bactériennes, qui facilitent la disponibilité du P pour les plantes (**Shen et al., 2011**).

Parmi les quatre types de phytases identifiés, la phytase  $\beta$ -propeller (BPP) diffère des trois autres phytases (histidine acide phytase (HAP), cystéine phytase (C phy) et purple acide phosphatase (PAP)) par un pH optimal neutre au voisinage de 7 contrairement aux autres caractérisées par un pH optimal acide (**Li et al., 2011**). Des études antérieures ont montré que BPP est la principale classe d'enzymes dégradant le phytate dans la nature et la plus répandue dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (**Lim et al., 2007 ; Huang et al., 2009**).

Récemment, l'activité phytase végétale a été découverte dans les nodules de *Phaseolus vulgaris* L. et de *Vicia faba* dont l'expression génique a été localisée dans le cortex nodulaire (**Lazali et al., 2013 ; Makoudi et al., 2018**). Cependant, aucune étude jusqu'à présent n'a démontré la présence d'activité phytase bactérienne chez les rhizobia (**Jorquera et al., 2008 ; Plassard et al., 2015**). Cette étude a pour but d'une part de localiser l'expression du gène BPP dans les nodules de niébé formés par une souche de rhizobia possédant l'activité phytase BPP et d'autre part de mieux comprendre le rôle de cette enzyme dans la nutrition P de la plante et de son adaptation à la déficience en P.

## VI.2. Matériel et méthodes

### VI.2.1. Matériel biologique et conditions de culture

L'étude est menée sous serre en conditions contrôlées (température 28/20° C pendant un cycle jour / nuit 16/8 h à 70% d'humidité relative pendant la journée) au laboratoire Eco&Sol INRA de Montpellier, en utilisant la lignée **IT 90 K 372-1-2** de niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)). Les graines sont stérilisées avec une solution d'hypochlorite de calcium à 7%. Une semaine après germination (radicule à 4 cm de long) elles sont transférées en bouteilles contenant 1L de solution nutritive.

Afin de localiser in situ l'expression du gène BPP, deux souches sont utilisées : la souche S21 (*Rhizobium sp.*) dont l'activité phytase est identifiée en chapitre IV et la souche de référence CB756 (*Bradyrhizobium sp.*) qui ne possède pas d'activité phytase BPP ; elle est considérée comme contrôle.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de rhizobia conservée dans des tubes à 4°C, puis transféré dans 100 ml de milieu liquide YEM stérile et incubé à 28°C en agitation 120 tours/min.

L'agitation est arrêtée après obtention d'une densité cellulaire approximative de  $10^9$  germes  $\text{ml}^{-1}$  (Vincent, 1970), pendant 48 h pour la souche S21 et 120 h pour la CB756. L'inoculation est réalisée au moment du transfert des graines en bouteilles en ajoutant 1mL de l'inoculum par bouteille pour chaque souche.

L'apport du P se fait sous forme de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (15 ou 75  $\mu\text{M}$  par plante et par semaine respectivement pour le traitement P déficient et P suffisant) en plus des autres éléments (  $\text{CaCl}_2$  (1,65 mM);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0 mM);  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0,7 mM); Fe EDDHA (8,5  $\mu\text{M}$  Fe sequestrene);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (3,4  $\mu\text{M}$ );  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (6mM);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 mM);  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 mM);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1 mM)). Un apport de 2mM d'urée par plante est rajouté dans la solution initiale puis réduit à 1 mM par plante au premier changement de la solution nutritive après deux semaines, afin d'optimiser le processus de nodulation (Hernandez et Drevon, 1991). Le pH est ajusté à environ 7 en ajoutant 0,2 g de  $\text{CaCO}_3$ / L à la solution nutritive chaque semaine. Les plantes sont aérées intensément par un flux d'air comprimé à 400 ml/min/bouteille.

Le dispositif expérimental adopté est un split plot avec 3 répétitions.

### VI.2.2. Co-extraction d'ARN/ADN, rétrotranscription et clonage

La co-extraction d'ARN/ADN est réalisée en utilisant le kit Quiagen, le protocole est détaillé en Annexe 5.

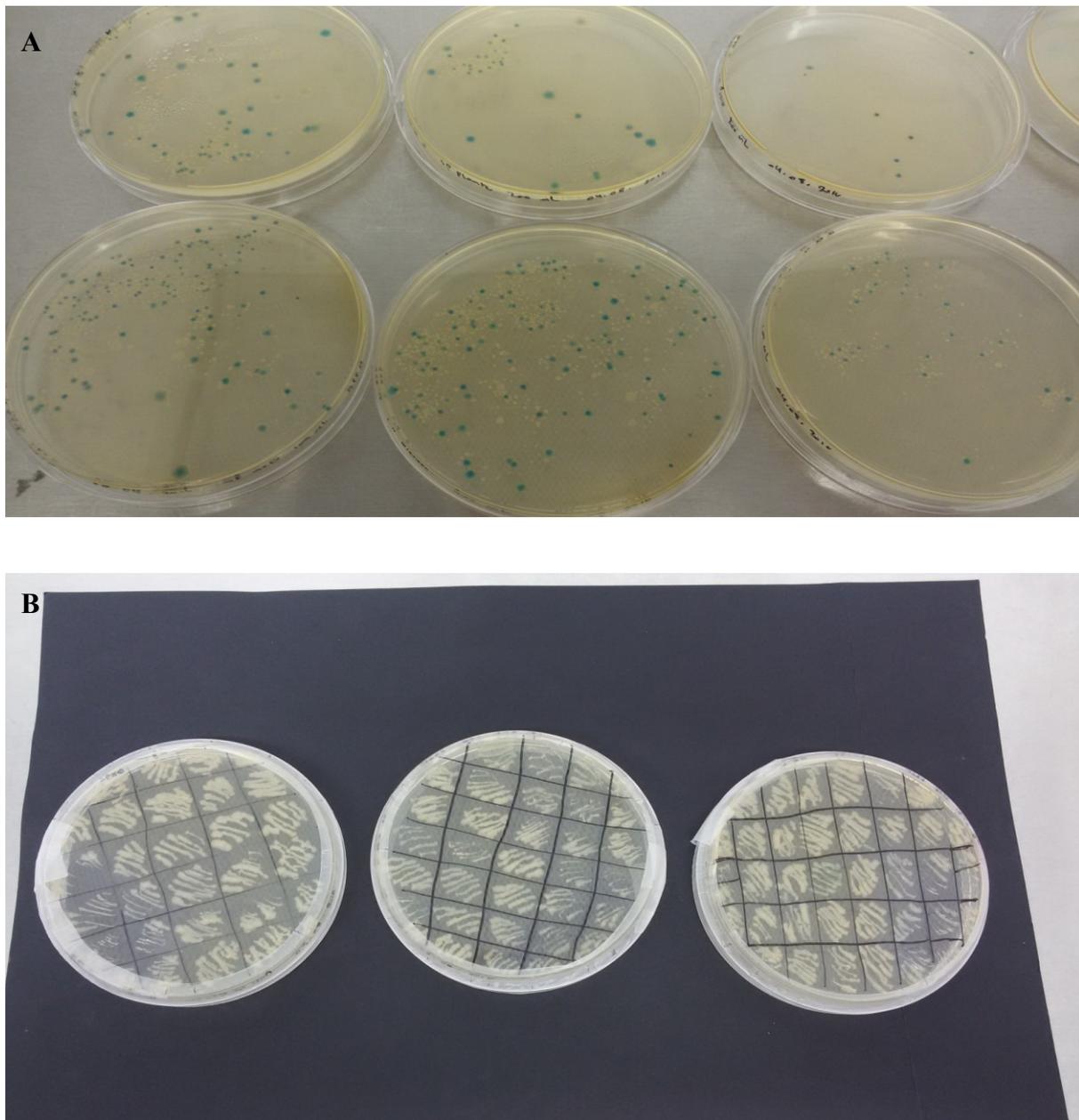
La retranscription de l'ARN bactérienne ADNc est réalisée dans un volume de 25 µL contenant 1µL d'ARN, 3µL de l'amorce reverse **BPPphy3'\_684** (5' ATT TTC TCC GTC CTG TGC GAC 3') à une concentration de 20 mM, 1µL de la reverse transcriptase Moloney enzyme (M-MLV) H- (Promega, Madison, WI, USA), 1,25µL de dNTP (10mM), 5µL de M-MLV5X Réaction buffer et 13,75µL d'H<sub>2</sub>O DEPC. L'incubation est accomplie à 42°C pendant 1h.

Une fois l'ADNc obtenu, une optimisation des conditions de la PCR est réalisée de façon à obtenir une amplification seulement de l'ADNc et non pas de l'ADNg.

Le couple d'amorce **L\_BPPphy5'\_684** (5' GAT GCA GCT GAT GAT CCT GCG 3') et **R\_BPPphy3'\_684** (5' ATT TTC TCC GTC CTG TGC GAC 3') est utilisé pour amplifier le gène BPP à travers 35 cycles de 95 °C pendant 15 s, 68,5°C pendant 30 s, et 72 °C pour 45 °C, avec une extension finale à 72 °C pendant 3 min, en utilisant l'ADNc et l'ADNg en tant que contrôles (**Farhat et al. 2008**).

Les bandes amplifiées sont ligaturées en utilisant l'ADN ligase du bactériophage T4, les plasmides recombinés sont transformés et clonés dans un pGEM-T Vecteur-easy (Promega, Madison, WI, USA) de la souche *E. coli* JM109 et sont cultivés par la suite sur milieu LB / ampicilline / IPTG / X-Gal à 37 °C pendant 24 heures.

Le clonage est apprécié en observant la couleur des colonies formées : les colonies blanches indiquent l'insertion du fragment d'intérêt dans le plasmide, si bleues, le plasmide n'a pas intégré le fragment d'intérêt (**Fig. 31A**). Afin d'éliminer les plasmides faux positifs, les colonies blanches sont repiquées dans des boites contenant le milieu LB / ampicilline / IPTG / X-Gal et incubées à 37 °C pendant 24h (**Fig. 31B**).



**Figure 31.** Colonies bleues/blanches (A) et vraies colonies blanches (B).

Une PCR du gène BPP est réalisée sur les vraies colonies blanches. Après la PCR, 3 $\mu$ L de tampon de charge à 6X sont rajoutés à 5  $\mu$ L de produits de PCR puis déposés sur un gel d'agarose à 1,5% dans une cuve contenant du TAE (Tris-Acétate, EDTA) à 1X. Après migration pendant 30 min à 120V, le gel est trempé dans un bain de BET (Bromure d'Ethidium) pendant 15min, visualisé par la suite sous UV et la photo est capturée avec le programme BioCapt. La taille du fragment d'intérêt est décelée grâce à un marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA Ladder, Promega).

Les produits de PCR sont séquencés (Beckman Genewiz, Angleterre) afin d'identifier les séquences des amplicons.

### **VI.2.3. RT-PCR in situ des transcrits du gène BPP**

Cette méthode implique l'amplification in situ de transcrits de gènes et se déroule en trois étapes : la rétrotranscription de l'ARNm (RT), l'amplification par PCR des séquences d'acides nucléiques spécifiques sur les coupes nodulaires et la détection par fluorescence de l'amplicon ainsi que la localisation de ce dernier par microscopie à épifluorescence (**Van Aarle et al., 2007**).

Les nodules de 3 mm de diamètre formés par chaque souche et pour chaque traitement de P sont soigneusement détachés des racines à 52 jours après transplantation (**Fig. 32A**), rincés à l'eau traitée DEPC (diéthylpyrocarbonate), puis fixés avec du paraformaldéhyde à 4%, l'éthanol pure à 45% et de l'acide acétique à 5%, conservés pendant 2 h sous vide, et stockés durant la nuit à 4 °C.

Les nodules fixés sont abondamment rincés sous agitation avec deux lavages à l'eau DEPC de 10 min d'intervalle suivi de deux lavages avec le tampon phosphate salin (PBS; 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; pH 7,5). Ils sont ensuite inclus dans des moules à paraffine et coupés à l'aide d'un microtome vibrant (Micro-cut H1200, Bio-Rad, France) (**Fig. 32B**) en sections de 12µM d'épaisseur. Les coupes sont étalées sur des lames ordinaires contenant de l'eau stérile (**Fig. 32C**), les lames sont mises à sécher sur plaque chauffante à 40 °C pendant 1h puis dans l'étuve à 37 °C durant la nuit. Elles sont ensuite conservées dans une boîte à lame à 4°C jusqu'au moment de l'expérience.

Afin de réaliser la rétrotranscription sur les coupes de nodules, les échantillons sont déparaffinés dans trois bains successifs de safesolv à 10 min d'intervalle suivi de cinq rinçages à l'éthanol à 5 min d'intervalle, puis réhydratés dans trois bains de PBS à 10 min d'intervalle.

La synthèse du brin d'ADNc des coupes est réalisée en utilisant un mix RT d'un volume final de 100 µL/lame contenant 7,5 µL de l'amorce reverse **BPPphy3'\_684** (5' ATT TTC TCC GTC CTG TGC GAC 3') à une concentration de 20 mM, 2,5µL de la reverse transcriptase Moloney enzyme (M-MLV) H- (Promega, Madison, WI, USA), 3,125µL de dNTP (10mM), 20 µL de M-MLV 5X Reaction buffer et 69,375µL d'H<sub>2</sub>O DEPC.

L'incubation est réalisée à 42°C pendant 1h. Les contrôles négatifs sont préparés sans ajout de l'enzyme.

Le mix RT est retiré et l'amplification de l'ADNc est provoquée en ajoutant 100µL/lame du mix PCR contenant 10µL de buffer 10 X, 3µL de MgCl<sub>2</sub> 50Mm, 2µL de dNTP 10mM, 1µL de la DIG-UTP (marquage à la digoxigénine), 2,5µL de l'amorce directe BPP phy5'\_684 (5' GAT GCA GCT GAT GAT CCT GCG 3') à 10 mM, 2,5 µL de l'amorce reverse BPP phy3'\_684 (5' ATT TTC TCC GTC CTG TGC GAC 3') à 20 mM, 0,5 µL de la Taq polymerase et 78,5 µL d'eau ultra pure. En utilisant un programme PCR de 35 cycles de 95 °C pendant 15 s, 68,5°C pendant 30 s, et 72 °C pour 45 °C, avec une extension finale à 72 °C pendant 3 min.

Le mix PCR est retiré après amplification, et les coupes sont rincées trois fois dans 200 µl de PBS sous agitation douce à 10 min d'intervalle, puis incubées dans l'obscurité à 37 °C en ajoutant 1 mL de solution de blocage BSA-Triton (Bovine sérum albumine additionné au triton) pendant 30 min sous agitation douce. Ensuite, la solution de blocage est enlevée et remplacée par 100 µL d'antidioxigénine (anti-corps) couplée à la phosphatase alcaline Fragment Fab (Roche Diagnostics) dilué 1/1000 dans 2% de BSA. Les coupes sont incubées à 37 °C pendant 90 min, puis rincées trois fois dans du PBS à 10 min d'intervalle pour éliminer l'excès d'anticorps.

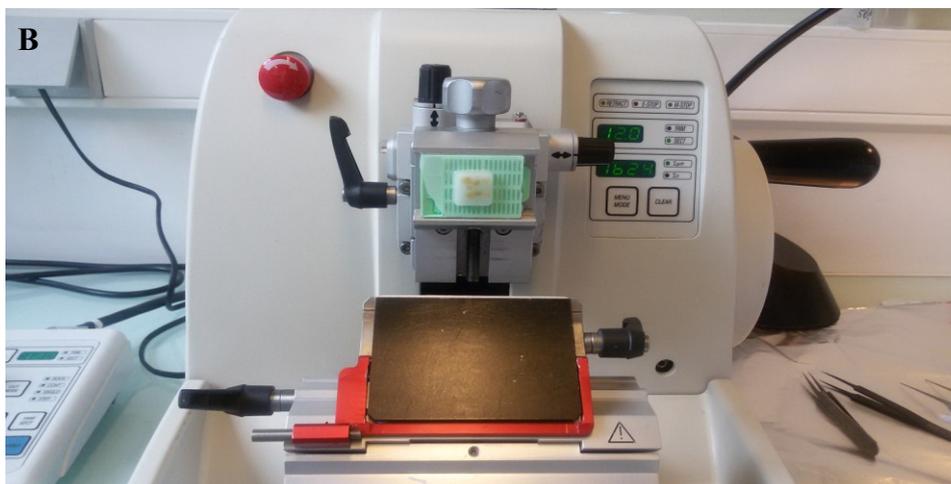
La détection de l'ADNc amplifié marqué à la digoxigénine au niveau des tissus cellulaires est réalisée à l'aide kit de détection des phosphatases endogènes ELF-97® (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas).

Le substrat ELF est dilué au 1/40 dans le tampon alcalin de détection (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas), la solution est vortexée et filtrée (0,22 µm filter ; Millex -GV, Millipore, Bedford, États-Unis).

Les coupes sont incubées dans 20 µL du substrat ELF additionné à la solution tampon pendant 20 min dans l'obscurité puis rincées trois fois avec le tampon de lavage (PBS avec 25 mM d'EDTA et 5 mM de lévamisole, pH 8,0) avant le montage des lames.

Les observations ont été faites en utilisant un microscope Olympus BX61 (Olympus, Hambourg, Allemagne) équipé d'un condenseur à épifluorescence, d'un ensemble de filtres

Hoechst / DAPI et d'une caméra View II (ORCA AG, Hamamastu). L'analyse de l'image est effectuée en utilisant le logiciel ImageJ comme programme d'analyse d'image.



**Figure 32.** Nodules au stade 52 jours après transfert en bouteilles (A), microtome (B) et coupes de nodules sur lames (C).

#### **VI.2.4. Mesures réalisées**

Les plantes sont récoltées au stade 52 jours après transfert en bouteilles, les parties aériennes sont séparées des parties racinaires au niveau du collet et les nodules sont détachés des racines. La matière sèche est déterminée après séchage à l'étuve pendant 3 jours à 70°C.

Par la suite, les échantillons secs sont broyés en poudre fine dans un broyeur à bille pour doser l'azote et le phosphore des différentes parties.

Pour l'analyse du P, la prise d'essai des échantillons (parties aériennes, racinaires et nodules) est de  $50 \pm 0,5$  mg, les échantillons sont digérés par  $\text{HNO}_3$  dans un four à micro-ondes en téflon (petit réacteur) à 180°C pendant 15 min, le dosage colorimétrique du P est réalisé ultérieurement avec le vanado-molybdate à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm.

Pour la détermination de l'azote, la prise d'essai des échantillons est de  $3 \pm 0,5$  mg analysée au CHN par spectrométrie de masse.

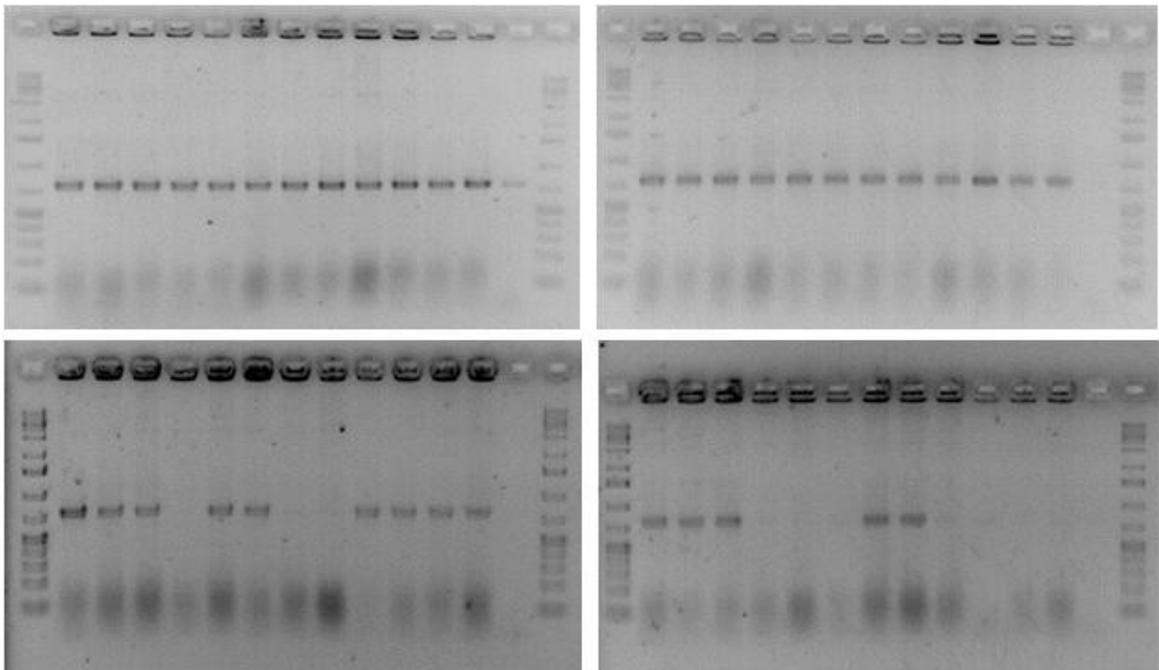
#### **VI.2.5. Analyses des données**

L'analyse de la variance est réalisée à l'aide du logiciel R[R Core team, 2013] ; une ANOVA à deux facteurs est effectuée dont le premier facteur porte sur l'effet du traitement de P apporté, le deuxième facteur porte sur l'effet des souches. Le test de Tukey est utilisé afin de déterminer la différence entre les moyennes à un seuil de probabilité de 0,05.

### VI.3. Résultats et discussion

#### VI.3.1 Clonage du gène BPP

La figure 33 montre que trente neuf plasmides présentent un amplicon entre 700 et 1000 pb spécifique du gène BPP dont la taille attendue est 864 pb. Par ailleurs, le séquençage des produits d'amplifications obtenus pour tous les plasmides présente 97% d'homologie avec la séquence du gène 3-phytase de *Paenibacillus polymyxa* strain Sb3-1 [CP 010268] (Rybakova *et al.*, 2015).



**Figure 33.** Gel d'agarose de contrôle du clonage du gène BPP

#### VI.3.2 Localisation et expression du gène BPP

Les données de la figure 34 montrent que la phytase alcaline BPP est exprimée uniquement chez le nodule formé par la souche S21 sous déficience en P (**Fig. 32C**). La fluorescence est fortement localisée au niveau de la zone infectée essentiellement dans les cellules infectées. Cependant un signal faible est détecté au niveau des traces vasculaires.

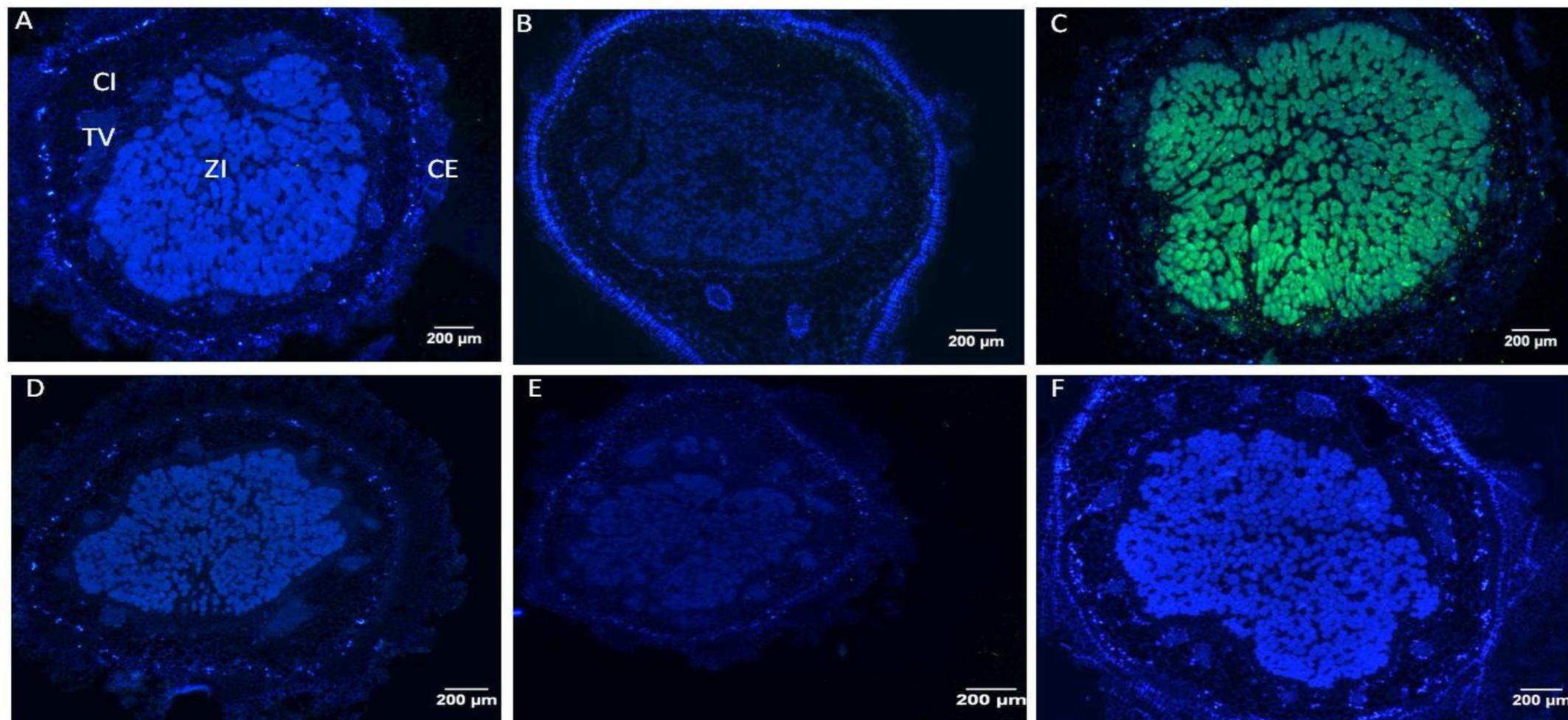
L'ADNc amplifié et séquencé correspond à une phytase bactérienne alcaline, cette activité phytase nodulaire est d'origine procaryote. En effet, La classe des BPP est exclusivement microbienne (**Lim et al., 2007**).

La détection *in situ* de la phytase bactérienne BPP dans les nodules de niébé est, à notre connaissance une nouvelle découverte. C'est la première fois que ce gène bactérien est observé dans les nodules des légumineuses.

Jusqu'à présent des études récentes ont démontré la localisation et l'expression des phytases et phosphatases, mais uniquement végétales, au niveau des cellules corticales des nodules de *Phaseolus vulgaris* et *Vicia faba* en réponse à une déficience en P (**Lazali et al., 2013 ; Makoudi et al., 2018**).

L'expression de la phytase sous déficience en P uniquement dans les nodules formés par la souche S21 (**Fig. 34C**) suggère que la phytase peut être impliquée dans la tolérance de la symbiose rhizobienne à une déficience en P et peut constituer un mécanisme adaptatif pour les légumineuses à la FSN sous déficience en P en assurant les besoins énergétique nécessaire pour la fixation symbiotique de l'azote (**Bozzo et al., 2002 ; Lazali et al., 2013**). En effet, la réduction du N<sub>2</sub> par les bactéroïdes contenus dans les cellules de la zone infectée dépend de la synthèse de l'ATP dans les nodules (**Sa et Israël 1991**). Ainsi, la déficience en P réduit l'activité de la nitrogénase des nodules (**Kouas et al., 2005; Qiao et al., 2007**).

Le signal élevé des transcrits du gène BPP dans les cellules infectées suggère un rôle fonctionnel dans l'amélioration de la disponibilité du Pi dans le nodule pour la plante et les bactéries. Ainsi, l'efficacité de la symbiose plante hôte-rhizobia dépend d'une efficacité d'utilisation du P disponible (**Israël, 1987**).



**Figure 34.** Localisation *in situ* de l'expression du gène de la phytase BPP (fluorescence en vert) dans les nodules de niébé formés par la souche S21 (A, B, C) et la CB756 (D, E, F) en conditions de suffisance en P (B, E) et de déficience en P (C, F). A et D contrôles négatifs (sans RT). *CE* cortex externe, *CI* cortex interne, *TV* trace vasculaire et *ZI* zone infectée.

### VI.3.3. Effet de la déficience en P sur la nodulation, la croissance et la fixation symbiotique de l'azote des plantes.

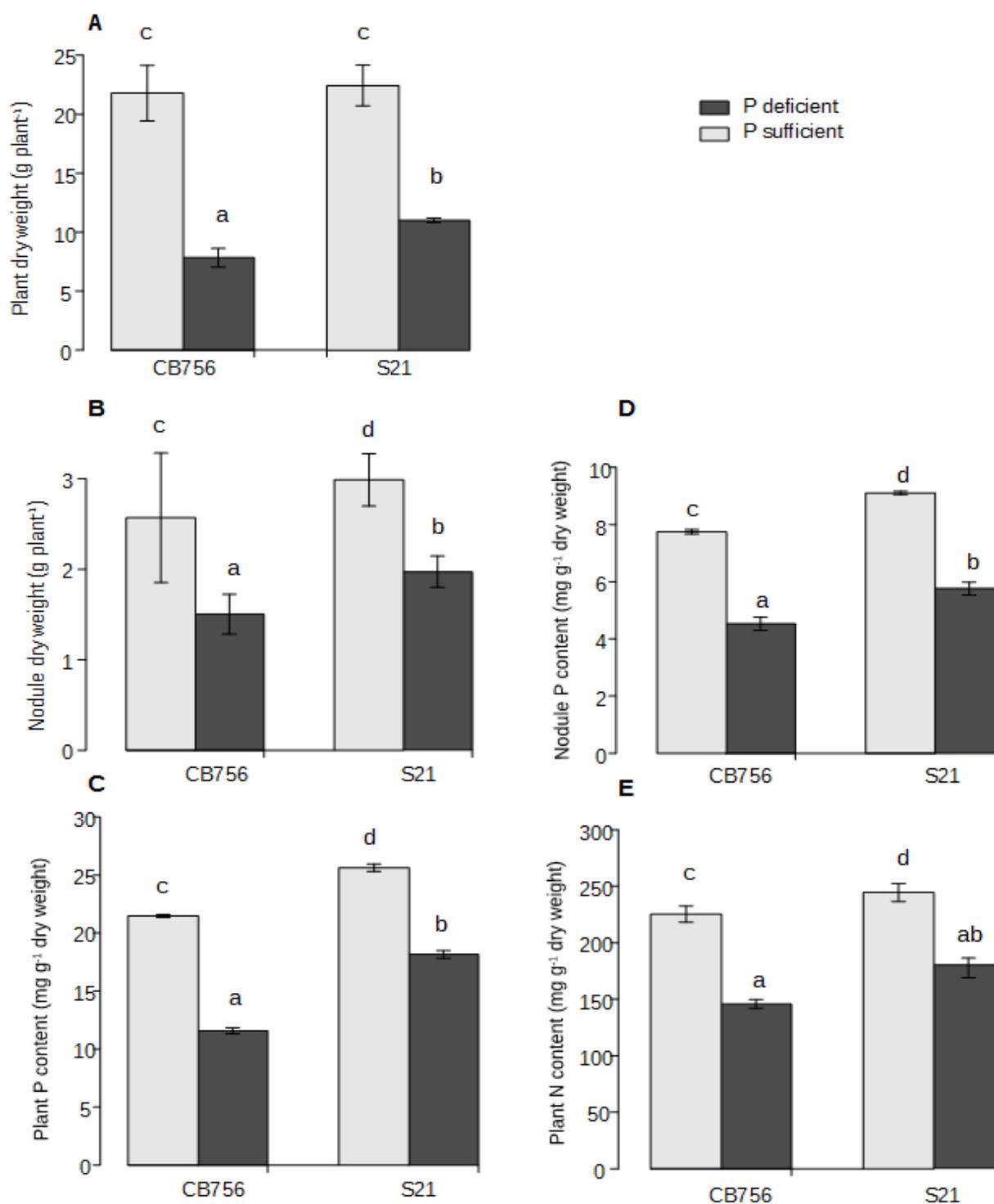
L'effet de la déficience en P sur le poids sec total de la plante, le poids sec des nodules, la teneur en P de la plante, la teneur en P des nodules et la teneur en N de la plante est présenté dans la figure 35.

La déficience en P diminue considérablement le poids sec total de la plante de 73% et 52% respectivement pour la CB756 et la souche S21 (**Fig. 35A**), le poids sec des nodules de 37% et de 28% respectivement pour la CB756 et la souche S21 (**Fig. 35B**), la teneur en P de la plante de 46% et de 30% respectivement pour la CB756 et la souche S21 (**Fig. 35C**), la teneur en P des nodules de 40% et de 37% respectivement pour la CB756 et la souche S21 (**Fig. 35D**) et la teneur en N de la plante de 33% et de 30% respectivement pour la CB756 et la souche S21 (**Fig. 35E**).

Dans l'ensemble la déficience en P affecte significativement tous les paramètres étudiés. Ces résultats rejoignent ceux de **Lazali et al. (2013)** et **Makoudi et al. (2018)**.

Cependant, l'effet est plus prononcé chez la CB756 qui ne possède pas d'activité phytase bactérienne. La souche S21, de par son activité phytase, est plus efficace dans l'utilisation de la symbiose rhizobienne pour la croissance de la plante et ce en produisant plus de biomasse par molécule de P consommée qui se traduit par une meilleure fixation de l' $N_2$  dans le nodule (**Vadez et Drevon 2001**). Ainsi l'optimum de l'interaction entre la légumineuse et la souche rhizobienne dépend du P disponible et de son utilisation (**Al-Niemi et al., 1997**).

La déficience en P est un facteur limitant de la croissance et du rendement des légumineuses chez lesquelles la nutrition azotée dépend étroitement de la symbiose rhizobienne (**Yang et Finnegan, 2010**). Le fonctionnement des nodules requière un besoin important en P du fait que la teneur en P est plus élevée dans les nodosités comparée aux autres organes de la plante, en particulier en conditions de déficience en P (**Tang et al., 2001**).



**Figure 35.** Poids sec de la plante (A), poids sec des nodules (B), teneur en P de la plante (C), teneur en P des nodules (D) et teneur en N de la plante (E) de la lignée IT 90 K 372-1-2 inoculée avec les souches CB756 et S21 en conditions de suffisance et déficience en P. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Les barres indiquent l'erreur standard. Les valeurs moyennes marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

#### **VI.4. Conclusion**

En conclusion, cette étude permet de localiser l'expression de la phytase bactérienne BPP au niveau des nodules de niébé. Le gène est détecté sous déficience en P dans les cellules infectées de la souche S21 qui possède l'activité phytase alcaline. Ces résultats confirment ceux du chapitre IV (libération du Pi par la souche S21 dans le milieu phytate BPP).

Cette activité phytase confère à la plante une meilleure adaptation de la fixation symbiotique de l'azote à la déficience en P en améliorant sa nutrition phosphatée.

En perspective, compte tenu de la double activité phytase (BPP-HAP) de la souche S21, il serait judicieux de localiser et quantifier l'expression du gène de la phytase HAP dans les nodules formés par cette souche.

**VI.5. Références bibliographiques**

Al-Niemi T.S., Kahn M.L. et McDermott T.R. 1997. P metabolism in the bean-Rhizobium tropici symbiosis. *Plant physiology*, 113(4), 1233-1242.

Balser T.C., Hillel D., Hatfield J., Powlson D. et Rosenzweig C. 2005. Encyclopedia of Soils in the Environment. Academic Press, Elsevier, Oxford, vol 3. pp 210-215.

Bozzo G.G., Raghothama K.G. et Plaxton W.C. 2002. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *The FEBS Journal*, 269(24), 6278-6286.

Farhat A., Chouayekh H., Farhat M.B., Bouchaala K. et Bejar S., 2008. Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Molecular biotechnology*, 40(2), 127.

Goldstein A.H. et Krishnaraj P.U. 2007. Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: what separates a phenotype from a trait?. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer, Dordrecht, pp. 203-213.

Hernandez G. et Drevon J.J. 1991. Influence of oxygen and acetylene during in situ open-flow assays of nitrogenase activity (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) in *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Journal of plant physiology*, 138(5), 587-590.

Huang H., Shi P., Wang Y., Luo H., Shao N., Wang G., Yang P. et Yao B. 2009. Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1508-1516.

Israel D.W. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant physiology*, 84(3), 835-840.

Jorquera M.A., Hernández M.T., Rengel Z., Marschner P. et de la Luz Mora M. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of soils*, 44(8), 1025.

Kouas S., Labidi N., Debez A., et Abdelly C. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for sustainable development*, 25(3), 389-393.

Lazali M., Zaman-Allah M., Amenc L., Ounane G., Abadie J. et Drevon J.J. 2013. A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*–rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta*, 238(2), 317-324.

Li Z., Huang, H., Yang, P., Yuan, T., Shi, P., Zhao J. et Yao B. 2011. The tandemly repeated domains of a  $\beta$ -propeller phytase act synergistically to increase catalytic efficiency. *The FEBS journal*, 278(17), 3032-3040.

Lim B.L., Yeung P., Cheng C. et Hill J.E. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME journal*, 1(4), 321.

Lung S.C. et Lim B.L. 2006. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant and soil*, 279 (1-2), 187-199.

Makoudi B., Kabbadj A., Mouradi M., Amenc L., Domergue O., Blair M., Drevon J.J. et Ghoulam C. 2018. Phosphorus deficiency increases nodule phytase activity of faba bean–rhizobia symbiosis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(3), 63.

Qiao Y., Tang C., Han X. et Miao S. 2007. Phosphorus deficiency delays the onset of nodule function in soybean. *Journal of plant nutrition*, 30(9), 1341-1353.

Plassard C., Robin A., Le Cadre E., Marsden C., Trap J., Herrmann L. et Hinsinger P. 2015. Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol?. *Innovations Agronomiques*, 43, 115-138.

Richardson A.E., Barea J.M., McNeill A.M., et Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 305-339.

Rodríguez H., Fraga R., Gonzalez T. et Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287(1-2), 15-21.

Rybakova D., Wetzlinger U., Müller H. et Berg G. 2015. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* strain Sb3-1, a soilborne bacterium with antagonistic activity toward plant pathogens. *Genome announcements*, 3(2), e00052-15.

Sa T.M. et Israel D.W. 1991. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. *Plant Physiology*, 97(3), 928-935.

Shen J., Yuan L., Zhang J., Li H., Bai Z., Chen X., Zhang W. et Zhang F. 2011. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant physiology*, 156(3), 997-1005.

Tang C., Hinsinger P., Drevon J.J. et Jaillard B. 2001. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals of Botany*, 88(1), 131-138.

Tang J., Leung A., Leung C. et Lim B.L. 2006. Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1316-1324.

Turner B.L., Baxter R. et Whitton B.A. 2002. Seasonal phosphatase activity in three characteristic soils of the English uplands polluted by long-term atmospheric nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, 120(2), 313-317.

Van Aarle I.M., Viennois G., Amenc L., Taty M.V., Luu D.T. et Plassard C. 2007. Fluorescent in situ RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*, 17(6), 487-494.

Vadez V. et Drevon J.J. 2001, Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21, 691–699.

Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: International Biological Programme Handbook n°. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73-97.

Yang X.J. et Finnegan P.M. 2010. Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annals of Botany*, 105(4), 513-526.

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de cette thèse concerne la compréhension des mécanismes qui facilitent l'assimilation du phosphore chez le niébé (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) en conditions de déficience en P. L'outil de base s'appuie sur les bénéfiques écosystémiques des symbioses rhizobia-niébé fixatrices d'azote.

Le premier volet (chapitre II) a permis la sélection des accessions de niébé performantes sous différents régimes de P et types d'inoculation. Il en ressort que l'origine géographique des accessions affecte considérablement la fixation symbiotique de l'azote et l'efficacité de cette espèce à utiliser le P. Ainsi, les accessions du Nord, NE4, NE11 et NE10 avec la souche *Mesorhizobium sp.* sont plus performantes pour la fixation symbiotique de l'azote et l'efficacité de l'utilisation du phosphore. Par conséquent, elles peuvent être utilisées comme source de diversité génétique pour augmenter la productivité de cette espèce. Elles peuvent servir aussi pour améliorer l'EUP au bénéfice de la FSN sous déficience en P.

Le deuxième volet (Chapitre III) a pour but de constituer une collection de souches rhizobiennes nodulant le niébé et d'étudier leur diversité, par une approche phénotypique, biochimique et moléculaire. Les données obtenues ont permis, sur la base des séquences du gène ADNr 16S, de distinguer trois classes :

Classe I : bactéries à croissance rapide dont les séquences sont proches des genres *Rhizobium* et *Mesorhizobium* ;

Classe II : bactéries à croissance intermédiaire dont les séquences sont proches du genre *Sinorhizobium* ;

Classe III : bactéries à croissance lente dont les séquences sont proches du genre *Bradyrhizobium*.

Ces résultats suggèrent que le niébé présente une forte promiscuité et peut être nodulé par plusieurs espèces rhizobiennes.

La phylogénie du gène *nifH* met en évidence de nouvelles séquences, inconnues de la base de données NCBI, formant une classe à part et révèle une incohérence avec la phylogénie du gène ADNr 16S due à un transfert de gène horizontal entre espèces bactériennes.

Les souches S2, F2, A1, F1, S21, S4 et F5 présentent une tolérance à la température et au pH acide, les souches S10, A3, S19, F6, S8, A2, F3 et F4 présentent une tolérance au pH

alcalin et les souches S19, S21, F6, F2, A2, S7 et S3 présentent une tolérance à la salinité. Ces facteurs inhibent la fixation symbiotique de l'azote en limitant la survie et la subsistance des rhizobia dans le sol, et donc, réduisent la nodulation. Il sera judicieux donc d'utiliser les souches tolérantes en particulier en Méditerranée et ce dans le cadre d'une agriculture durable.

Le troisième volet (chapitre IV) a principalement pour but l'identification et la caractérisation des souches rhizobiennes ayant une activité phytase minéralisant le phytate. Cette étude a confirmé la présence et la variabilité des séquences de ces enzymes. Elle a permis de distinguer trois souches (S21, S4 et A2) avec une activité phytase BPP et deux souches (S21 et S19) avec une activité phytase HAP dont une (S21) possédant les deux activités phytases. La capacité de ces souches rhizobiennes à produire des phytases constitue un caractère très intéressant dans l'adaptation du niébé à la déficience en P. En effet ces enzymes sont considérées comme des biofertilisants capables, d'améliorer l'absorption du phosphore par les plantes et par conséquent de contribuer à la préservation de l'environnement en réduisant les apports d'engrais chimiques.

Le quatrième volet (chapitre V) dont l'objectif est de vérifier l'infectivité des souches et leur efficacité à fixer l'azote atmosphérique en conditions de déficience en P. montre que toutes les souches, à l'exception de la S10, sont infectives.

L'adaptation des symbioses rhizobia-niébé à la déficience en P varie en fonction des souches. Celles qui ont une activité phytase sont les plus efficaces aussi bien en conditions de suffisance qu'en déficience en P notamment la S21 qui développe une forte capacité fixatrice probablement due à sa double activité phytase.

Les souches à activité phytase bactériennes peuvent constituer une stratégie pour améliorer la fixation d'azote sous déficience en phosphore, il serait donc judicieux de développer des bio-inoculants pour favoriser la fixation N<sub>2</sub> et améliorer la nutrition phosphatée notamment en zones céréalières où les sols sont riches en calcaire et déficients en P (**Sharma et al., 2016**).

Cependant, l'évaluation de l'efficacité des bactéries solubilisatrices de phytate en conditions contrôlées doit être vérifiée dans les conditions de plein champ afin de valider ces bénéfices écologiques (**Rani et Goel, 2012**). En effet la compétition avec la microflore native et les facteurs environnementaux peuvent limiter fortement, la densité de population des souches introduites et leur activité PGPR (**Richardson, 2001**).

Le cinquième volet (chapitre VI) a permis de localiser l'expression de la phytase bactérienne BPP au niveau des nodules de niébé ; le gène de cette enzyme est détecté sous

déficience en P dans les cellules infectées de la souche S21 qui possède l'activité phytase alcaline.

Cette activité phytase confère à la plante une meilleure adaptation de la fixation symbiotique de l'azote à la déficience en P. Ainsi, ces enzymes constituent l'une des adaptations biochimiques qui interviennent dans l'amélioration de l'acquisition du P, son efficacité d'utilisation et sa remobilisation intracellulaire optimale (Vance *et al.*, 2003).

## PERSPECTIVES

D'autres études (notamment en plein champ) avec un spectre plus large d'accessions de niébé et de rhizobia sont nécessaires pour vérifier si la symbiose génotype-rhizobia peut affecter l'EUP dans les sols pauvres en P ?

Une analyse moléculaire plus poussée des souches isolées est préconisée en utilisant les gènes de ménages (housekeeping gens) afin d'identifier la nouvelle classe du gène *nifH* et les espèces non identifiées du gène 16S inconnues des bases de données génomiques. Il peut s'agir peut être de nouvelles espèces qu'il faudrait identifier et intégrer dans NCBI.

Il serait intéressant de caractériser aussi les activités phytases au niveau protéique.

De même la localisation et la quantification *in situ* de l'expression du gène de la phytase HAP dans les nodules formés par la souche S21 est souhaitable pour approfondir son rôle dans la biodisponibilité du phosphore.

Abbas K. et Abdelguerfi A. 2005. Perspectives d'avenir de la jachère pâturée dans les zones céréalières semi-arides. *Fourrages*, 184, 533-546.

Alkama N. 2010. Adaptation de la symbiose rhizobienne chez le haricot à la déficience en phosphore: détermination de la réponse de la plante en terme d'échanges gazeux et de flux minéraux échangés avec la rhizosphère. Thèse de Doctorat, SupAgro, Montpellier, 185p.

Ba F.S., Pasquet R.S. et Gepts P. 2004. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51(5), 539-550.

Barber S.A. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. John Wiley & Sons, 414p.

Beattie G.A. 2007. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In *Plant-associated bacteria*. Springer, Dordrecht, pp. 1-56.

Bouwman A.F., Beusen A.H. et Billen G. 2009. Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period. *Global Biogeochemical Cycles*, 23(4). 1970–2050.

Cellier, Pierre, et al. "Impacts environnementaux de l'introduction de légumineuses dans les systèmes de production." (2015): 515-p.

Cellier P., Schneider A., Thiebeau P. et Vertes F. 2015. Impacts environnementaux de l'introduction de légumineuses dans les systèmes de production. Editions Quae, France, 515p.

Darrah P.R., Jones D.L., Kirk G.J.D., Roose T. 2006. Modelling the rhizosphere: a review of methods for 'up scaling' to the whole-plant scale. *European Journal of Soil Science* 57(1), 13-25.

Dazzo F.B. 2008. Applications of quantitative microscopy in studies of plant surface microbiology. In *Plant Surface Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 503-550.

Denison R.F. et Kiers E.T. 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS microbiology letters*, 237(2), 187-193.

Dupuy Y. et Nougier P. 2005. Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses. France, 212p.

Ehlers J.D. et Hall A.E. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Field crops research, 53(1), 187-204.

Fox J.E., Gullledge J., Engelhaupt E., Burow M.E. et McLachlan J.A. 2007. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(24), 10282-10287.

Freire J.R.J. et Saccol, D. 2006. Sustainable agriculture and the rhizobia/legumes symbiosis. Handbook of Microbial Biofertilizers, Rai MK Editor, Haworth Press Inc, pp. 183-185.

Ghalmi N., Malice M., Jacquemin J. M., Ounane S. M., Mekliche L. et Baudoin J.P. 2010. Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. Genetic resources and crop evolution 57(3), 371-386.

Hadi, F., Hussain, F. et Arif, M. 2012. Growth performance and comparison of cowpea varieties under different NaCl salinity stresses. Greener J. Phy. Sci. 2, 44-49.

Halitim A. 1985. Contribution à l'étude des sols des zones arides. Morphologie, distribution et rôle des sels dans la genèse et le comportement des sols. Thèse de Doctorat, ENSA, 284p.

Hamidou F., Harou A., Achirou B.F., Halilou O., et Bakasso Y. 2018. Fixation de l'azote chez l'arachide et le niébé en conditions de sécheresse pour l'amélioration de la productivité au Sahel. Tropicultura, 36(1).

Hammond J.P., Broadley M.R. et White P.J. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. Annals of botany, 94(3), 323-332.

Harmsen J. 2007. Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. Journal of Environmental Quality 36, 1420-1428.

Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant and Soil 237, 173-195.

Hoffmann G. 1968. Phosphatases in the enzyme system of cultivated soils (in Germany) and possibilities of determining their activity. *Z. Pflanzenernähr Dung Bodenkd.* 118, 153-160.

Jones D.L. et Oburger E. 2011. Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: E.K. Bünemann , A. Oberson , E. Frossard (eds), *Phosphorus in action. Biological Processes in Soil Phosphorus*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.169-198.

Jorquera M., Martínez O., Maruyama F., Marschner P. et de la Luz Mora M. 2008. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes and environments* 23, 182-191.

Kopittke P. M., Blamey F., McKenna B.A., Wang P. et Menzies N.W. 2011. Toxicity of metals to roots of cowpea in relation to their binding strength. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(8), 1827-1833.

Kouakou C.K., Roy-Macauley H., Gueye M.C., Otto M.C., Rami J.F., Cissé N. et Pasquet R.S. 2007. Diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] au Sénégal: étude préliminaire. *Plant Genetic Resources Newsletter* 152, 33.

Kouas S., Labidi N., Debez A. et Abdelly C. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for sustainable development*, 25(3), 389-393.

Latati M., Blavet D., Alkama N., Laoufi H., Drevon J.J., Gerard F. et Ounane S.M. 2014. The intercropping cowpea-maize improves soil phosphorus availability and maize yields in an alkaline soil. *Plant and soil*, 385(1-2), 181-191.

Lim B. L., Yeung P., Cheng C. et Hill J.E. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME journal*, 1(4), 321.

Maougal R.T 2014. Contribution des phytases bactériennes à l'adaptation de *Phaseolus vulgaris* à la faible disponibilité de phosphore en sols méditerranéens. Thèse de doctorat, Université Constantine 1, Constantine, 250p.

Maougal R.T., Brauman A., Plassard C., Abadie J., Djekoun A. et Drevon J.J. 2014. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *European journal of soil biology*, 62, 8-14.

Maréchal R., Mascherpa J.M. et Stainier F. 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base de données morphologique et pollinique, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera*, 28, 2-7.

Marconi S., Manzi P., Pizzoferrato L., Buscardo E., Cerda H., Hernandez D.L. et Paoletti M.G. 2002. Nutritional evaluation of terrestrial invertebrates as traditional food in Amazonia. *Biotropica* 34(2), 273-280.

Mullaney E.J., Ullah A.H., Turner B., Richardson A. et Mullaney E. 2007. Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. *Inositol phosphates: Linking agriculture and the environment*, 97-110.

Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L. et Renella G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. *In Phosphorus in action*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 215-243

Ng NQ. et Padulosi S. 1991. Cowpea gene pool distribution and crop improvement. *In International Conference on Crop Genetic Resources of Africa*, Ibadan (Nigeria), 17-20 Oct 1988. IITA.

Oh B.C., Choi W.C., Park S., Kim Y.O. et Oh T.K. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 362-372.

Oke V. et Long, S.R. 1999. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Current opinion in microbiology*, 2(6), 641-646. *In Okechukwu R.U., Ekpo E.J.A., Okechukwu O.C., 2010. Seed to plant transmission of Xanthomonas campestris pv. vignicola isolates in cowpea. African Journal of Agricultural Research* 5(6), 431-435.

Olivera M., Tejera N., Iribarne C., Ocana A. et Lluch C. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 498-505.

Paino D. U., Pedalino M., Grillo S., Rao R. et Tucci M. 1990. Variability in major seed proteins in different *Vigna* species. *Cowpea genetic resources*, pp. 90-100.

Pasquet R. et Baudoin J.P. 2001. *Cowpea*. Springer, Germany, pp.177-198

Pedalino M., Paino D.U., Costa A., Grillo S. et Rao R. 1990. Biochemical characterization of cowpea seed proteins. *Cowpea genetic resources*. pp. 81-89.

Philippot L. et Germon J.C. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. *Microorganismis in soils: roles in genesis and functions*, 159-176.

Plante A.F., 2007. Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Third Edition, pp. 389-432.

Plassard C., Robin A., Le Cadre E., Marsden C., Trap J., Herrmann L. et Hinsinger P. 2015. Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol?. *Innovations Agronomiques*, 43, 115-138.

Quiquampoix H. et Mousain D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In B.L. Turner, F.E., B.D.S. (eds). *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI Publishing, Wallingford , UK, pp. 89-112.

Quiquampoix H. et Burns R.G. 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements*, 3(6), 401-406.

Raja N., Albert S., Ignacimuthu S. et Dorn S. 2001. Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.)(*Coleoptera: Bruchidae*) infestation. *Journal of Stored Products Research*, 37(2), 127-132.

Rani A. et Goel R. 2012. Role of PGPR under different agroclimatic conditions. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 169-183.

Rawal K.M., Rachie K.O. Franckowiak J.D. 1976. Reduction in seed size in crosses between wild and cultivated cowpeas. *Journal of Heredity*, 67(4), 253-254.

Richardson A.E., 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28(9), 897-906.

Richardson A.E., Hadobas P.A. et Hayes J.E. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal*, 25(6), 641-649.

Richardson A.E. et Simpson R.J. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*, 156(3), 989-996.

Rodrigues A.A.C., Menezes M., 2005. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. *Mycopathologia* 159(1), 79-85.

Sarr B., Diouf O., Diouf M., Roy-Macauley H. et Brou C. 2001. Utilisation de paramètres agronomiques comme critères de résistance à la sécheresse chez trois variétés de niébé cultivées au Sénégal et au Niger. *Sécheresse* 12(4), 259-266.

Sawadogo A. 2009. Evaluation de la production du niébé (*Vigna unguiculata* L. Walpers) en condition de stress hydrique: Contribution au phénotypage et à la sélection du niébé pour la résistance à la sécheresse. *BSc*, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Nasso. 90p.

Sharma V., Kumar A., Archana G., et Kumar G.N., 2016. *Ensifer meliloti* overexpressing *Escherichia coli* phytase gene (appA) improves phosphorus (P) acquisition in maize plants. *The Science of Nature*, 103(9-10), 76.

Spohn M. et Kuzyakov Y. 2013. Distribution of microbial-and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation—Coupling soil zymography with <sup>14</sup>C imaging. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 106-113.

Spohn M., Ermak A. et Kuzyakov Y. 2013. Microbial gross organic phosphorus mineralization can be stimulated by root exudates—a <sup>33</sup>P isotopic dilution study. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 254-263.

Štursová M. et Baldrian P. 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil*, 338(1-2), 99-110.

Susmitha P. et Rai P.K. 2017. Studies on effects of seed treatments, polymer coating and packaging materials on seed quality parameters of stored cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(3), 677-681.

Svistoonoff S., Laplaze L., Auguy F., Runions J., Duponnois R., Haseloff J. et Bogusz D. 2003. Cg12 expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocauarina verticillata* actinorhizal nodule development. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(7), 600-607.

Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., De Lajudie P. et Dreyfus B. 2001. Methylo-trophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of bacteriology*, 183(1), 214-220.

Tadano T., Ozawa K., Sakai H., Osaki M. et Matsui H. 1993. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. In *Plant Nutrition from Genetic Engineering to Field Practice*. Springer, Dordrecht, pp. 99-102.

Tampakaki A.P., Fotiadis C.T., Ntatsi G. et Savvas D. 2017. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Systematic and Applied Microbiology* 40(3), 179-189.

Tang J., Leung A., Leung C. et Lim B.L. 2006. Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1316-1324.

Tarafdar J.C., Yadav R.S. et Meena S.C. 2001. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(3), 279-282.

Tarafdar J.C., Yadav R. S. et Niwas R. 2002. Relative efficiency of fungal intra-and extracellular phosphatases and phytase. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165(1), 17-19.

Turner B.L., Baxter R. et Whitton B.A. 2002. Seasonal phosphatase activity in three characteristic soils of the English uplands polluted by long-term atmospheric nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, 120(2), 313-317.

Vance C.P., Uhde-Stone C. et Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157:423-447. idelberg, 2012. p. 141-168.

Vasse J., De Billy F., Camut S. et Truchet G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4295-4306.

Venkatesan S. et Senthurpandian V.K. 2006. Potassium and phosphorus releasing capacity of latosols under tea cultivation in South India. *International Journal of Soil Sciences* 1, 227-234.

## **Références bibliographiques**

Vertes F., Jeuffroy M.H., Justes E., Thiebeau P. et Corson M. 2010. Connaître et maximiser les bénéfices environnementaux liés à l'azote chez les légumineuses, à l'échelle de la culture, de la rotation et de l'exploitation. *Innovations Agronomiques* (11), 25-44.

Voisin A.S. et Gastal F. 2015. Nutrition azotée et fonctionnement agrophysiologique spécifique des légumineuses. *eds. Editions Quae* , 512p.

Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M. van Loon A.P.G.M. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 367-373.

Yoka J., Loumeto J.J., Djego J.G., Houinato M. Akouango P. 2014. Adaptation d'un cultivar de Niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) aux conditions pédoclimatiques de Boundji (République du Congo). *Afrique Science* 10(1), 217- 225.

Zahran H.H. 2006. Wild-Legume Rhizobia: Biodiversity and Potential As Biofertilizer. *Handbook of Microbial Biofertilizers*, pp.203-222

Zakhia F. et De Lajudie P. 2001. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, 21(6-7), 569-576.

## ANNEXE 1

*Agronomy Research* 16(X), xxx–ccc, 2018  
<https://doi.org/10.15159/AR.18.081>

**Influence of inoculation and phosphorus regimes on symbiotic nitrogen fixation and phosphorus use efficiency of Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) landraces**

S. Benlahrech\*, G. Kaci, M. Teffahi and S.M. Ounane

Integrative Breeding of Vegetable Production Laboratory, National High School of Agronomy, Avenue Hassen Badi, El Harrach, DZ16200 Algeria

\*Correspondence: [benlahrechsamia@gmail.com](mailto:benlahrechsamia@gmail.com)

**Abstract.** To study the genotypic variation of cowpeas on plant growth and phosphorus (P) uptake which is a function of different P regimes in the soil rhizosphere, 6 landraces of cowpea commonly found in northern Algeria (NE4, NE10, NE11, NKT5, NKT7, NKB7) and 4 landraces from Sahara in southern Algeria (NAG4, NAG5, NAT2 and ND3) were studied during 2013–2014 in greenhouse. They were inoculated with *Mesorhizobium sp.* (S1), *Bradyrhizobium sp.* (S2) and co-inoculation (S1–S2) under three P treatments: no P supply (P0), soluble P (PP) and insoluble P (TCP). Only varieties commonly found in northern Algeria nodulated with soluble P (PP) and inoculation containing *Mesorhizobium sp.* (S1). As a result of the symbiosis, the use of S1 has significantly increased shoot dry weight by 22%, total P content by 20% and P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation by 18% compared to no inoculation (T). The landraces from the northern of Algeria expressed a higher growth than those from Sahara in the south of Algeria, especially three of them (NE4, NE10 and NE11) who showed a high performance under all P regimes. We suggest that these three landraces may be useful for improving symbiotic nitrogen fixation in cowpeas when growth is limited by low-P soils and that they could contribute to sustainable farming systems through reduction of farmer's dependence on fertilizers.

**Key words:** Cowpea, Landraces, Nitrogen fixation, Phosphorus, Rhizobia, Symbiosis.

## INTRODUCTION

Legumes as a source of symbiotic fixation of atmospheric nitrogen play a major environmental role in cropping systems, which may save nitrogen fertilizer (Graham, 2008). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) is an important leguminous crop that is used for live stocks as feed, as green vegetables, as well as dry beans for human consumption (Murillo–Amador et al., 2006; Goenaga et al., 2008). In Algeria cowpea is mainly consumed for home consumption and subsistence and considered to have therapeutic properties.

Symbiotic nitrogen fixation (SNF) by legume symbionts, or the ability to convert di-nitrogen to ammonia, occurs only within nodules, which are formed specifically in

response to the bacterial symbionts (Beattie, 2007). In addition, SNF is highly sensitive to environmental stresses, such as phosphorus deficiencies (Drevon & Hartwig, 1997). The P requirement of legumes is increased when the legume is dependent on N<sub>2</sub> fixation (Leidi & Rodriguez-Navarro, 2000; Gentili & Huss-Danell, 2003). Nodule growth is more sensitive to P deficiency than plant growth (Drevon & Hartwig, 1997). Thus, P deficiency leads to nodulation delay (Kouas et al., 2005). Indeed, SNF is an energetically expensive process which requires more inorganic P than mineral nitrogen assimilation (Vadez & Drevon, 2001).

Phosphorus (P) is one of the most important plant growth-limiting nutrient in soils besides nitrogen (Deubel & Merbach, 2005; Richardson et al., 2009). Low phosphorus fertility of the soils may be due to low total P content, particularly in soils with low organic matter content. The low availability of P is often due to its insoluble association with such cations as Ca, Al or Fe and its adsorption on surfaces of mineral phases (Alkama et al., 2012).

Ghalmi et al. (2010) identified the various landraces of cowpea cultivated in Algeria, mainly from two regions: Kabylia in northern Algeria (Tizi-Ouzou) and Saharian oases (El Gole'a, Adrar) in southern Algeria. They identified two different cultivar groups of cowpea: Melanophthalmus in Kabylia and Biflora in the Sahara.

Our investigation is the first study to determinate if the geographical origin of accession affects the phosphorus use efficiency (PUE) in Algerian cowpeas. The purpose of the present work was firstly to characterize different cowpea landraces for their ability to establish a symbiosis with rhizobia by checking the effectiveness and infectivity of the strains used, and secondly to investigate their efficiency in nitrogen fixation, and their tolerance to P deficiency in order to reduce production costs and dependence of farmers on soil fertilizers.

## MATERIALS AND METHODS

The present study was conducted during 2013–2014 in pots in a greenhouse at the Experimental Station of ENSA (Ecole Nationale Supérieure Agronomique), Algiers, (36° 30. 50'N). It included ten landraces of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.)) obtained from collection of ENSA (Ghalmi et al., 2010). Seeds characteristics are given in Table 1.

**Table 1.** Characters of Algerian cowpea accessions

Landraces	Geographical region	SC	EC	SSH	ST	SL	WHS
NKB7	Bejaia, North	Holstein	Absent	Kidney	Smooth	0.9	23.46
NKT7	Tizi Ouzou, North	Cream	Black	Kidney	Smooth	1.2	27.34
NKT5	Tizi Ouzou, North	Black	Absent	Ovoid	Smooth	0.5	7.83
NAG5	Adrar, Oasis	Black	Black	Globose	Rough	0.5	14.38
NAG4	Adrar, Oasis	Black	Absent	Ovoid	Smooth	0.4	9.49
NAT2	Adrar, Oasis	Brown	Absent	Ovoid	Smooth	0.4	10.82
NE4	El Kala, North	Cream	Black	Globose	Smooth	0.5	14.87
NE10	El Kala, North	Brown	Absent	Ovoid	Smooth	0.5	13.43
NE11	El Kala, North	Black	Absent	Ovoid	Smooth	0.6	15.33
ND3	Djanet, Oasis	Cream	Absent	Rhomboid	Smooth	0.4	10.1

SC Seed Color, EC Eye Color, SSH Seed Shape, ST Seed texture, SL Seed Length (cm) WHS Weight of Hundred Seeds (g).

## Soil

The soil (obtained from the Institut Technique des Cultures Maraîchères Industrielles' experimental station, Algiers (36° 45. 24.3'N)) was selected for its low phosphorus content. It was sterilized and divided into 480 sterile pots with a capacity of 10 kg.

The soil has undergone physical–chemical analysis: (granulometry, pH, and electrical conductivity (CE), CaCO<sub>3</sub> content, Total–N, Total–P and Olsen–P), granulometrical and chemical soil properties of experimental soil are given in Table 2.

**Table 2.** Granulometrical and chemical soil properties

Clay %	Loam %	Sandy %	pH	CE Ms cm <sup>-1</sup>	CaCO <sub>3</sub> %	Total–N g kg <sup>-1</sup>	Total–P mg kg <sup>-1</sup>	Olsen–P mg kg <sup>-1</sup>
20.3	21.5	58.2	7.1	3.725	13.54	0.7	235	20.3

Thus, Olsen–P value reveals that the initial soil (P0 regime) without P input has a low available P rate; 10 times lower than the total P content. This is related to the fact that the soil is calcareous and that much of the total P can be precipitated. The mechanisms of precipitation of P in calcareous soil have been studied previously by Tunesi et al. (1999). In this case P0 is considered as deficient P.

## Bacteria

For this study, two isolates of bacteria (a fast–growing strain as *Mesorhizobium sp.* (S1), and slow–growing strain as *Bradyrhizobium sp.* (S2)) were isolated from northern Algeria' cowpea nodules and obtained from collection of ENSA, Algiers, Algeria. Isolates were cultivated on Yeast Extract Agar medium (YEAM), inoculums were prepared in YEAM without addition of Agar.

## Culture conditions and experimental device

The ten landraces were grown under three different P regimes (deficient P (P0), soluble inorganic P as KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PP) 0.2 g per 10 kg of soil and insoluble Tricalcium phosphate as Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (TCP) 0.7 g per 10 kg of soil). These P regimes were combined with four inoculation types (control without inoculant (T), inoculated with *Mesorhizobium sp.* (S1), *Bradyrhizobium sp.* (S2) or doubly inoculated (S1–S2)). The experiment was organized into a split–plot design with four replications for each combination of landraces, P regime and inoculation type, providing the 480 pots (10 x 3 x 4 x 4). The seeds of cowpeas were surface–sterilized using absolute ethanol for 10 seconds followed by the sodium hypochlorite at 12 ° for 5 minutes; followed by 10 washes in sterile distilled water, and then sown. The seedlings were inoculated by covering with 1ml of bacterial culture containing 10<sup>8</sup>bacteria mL<sup>-1</sup> and 10<sup>9</sup> bacteria mL<sup>-1</sup> respectively for *Mesorhizobium sp.* and *Bradyrhizobium sp.*

## Data collection

At full flowering stage, which is spread out according to the precocity of the landraces, shoots were separated from roots at the cotyledon node, dried for 48 h at 75 °C and weights recorded. However, for landraces which has nodulated, nodules were detached from the roots, counted, dried and dry weight determined.

### Total P concentration

Plant P uptake corresponded to the total P taken up by plants during plant growth. Total P concentration in plant (shoot, root and nodules) was determined by green malachite method after digestion by nitric and perchloric acids according to Valizadeh et al. (2003). It was calculated as follows: P uptake (total P content) = [P concentration in shoot ( $\text{mg g}^{-1}$ )  $\times$  shoot dry weight (g)] + [P concentration in root ( $\text{mg g}^{-1}$ )  $\times$  root dry weight (g)] + [P concentration in nodule ( $\text{mg g}^{-1}$ )  $\times$  nodule dry weight (g)] / 1,000.

### Phosphorus use efficiency (PUE)

PUE represents the efficiency of use of phosphorus by the plant. There are several ways to design and calculate PUE, from physiological point of view to agronomic point of view (Baligar et al., 2011; MacDonald et al., 2011). In this study, we chose to calculate a physiological PUE which is the ratio between the dry weight of the whole plant and the concentration of phosphorus in the plant (Vadez & Drevon, 2001).

### Statistical analyzes

Effects of inoculation and P nutrition on plant growth, nodulation, P concentration in plant and plant P uptake were tested using multi-way analyses of variance (ANOVA) with R software, version 3.0.2 (R Core Team, 2013), using Rcmdr package (Fox, 2005) and RcmdrPlugin.EZR (Kanda, 2013), considering landraces, inoculation treatments and soil P regimes as factors. The means were compared by Tukey's multiple comparison test at 0.05 probability. Graphics were performed using RcmdrPlugin.FactoMineR (Husson et al., 2014) and RcmdrPlugin.KMggplot2 (Triad & Kengo, 2013).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Plant Growth expression under different P regimes and inoculation types

In order to assess the effects of P deficiency on growth and SNF, the dry weight of the different landraces was evaluated considering shoot measurement under different P regimes and different inoculation types (Fig. 1). The ANOVA results of shoot dry weight are reported in Table 3.

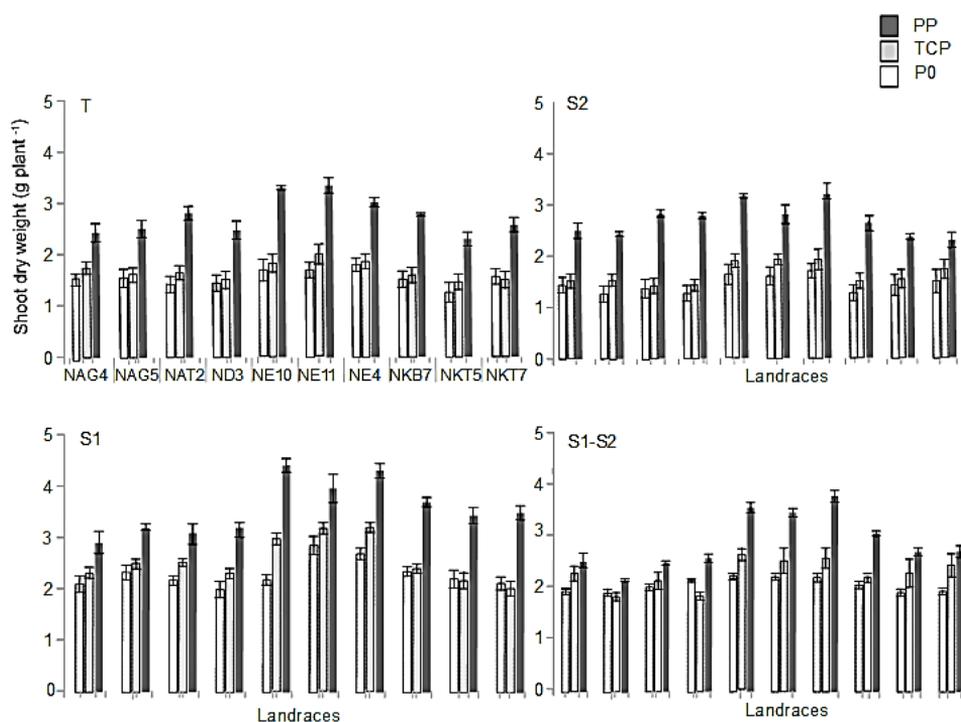
**Table 3.** ANOVA results of sDW

	Sum Sq	Df	F value	Pr(> F)
Factor1.P regime	319.6	2	293.8886	< 2.2e-16 ***
Factor2.Landraces	10.6	9	2.1617	0.024105 *
Factor3.Inoculation	68.8	3	42.2055	< 2.2e-16 ***
Factor1 X Factor2	28.1	18	2.8712	9.461e-05 ***
Factor1 X Factor3	12.0	6	3.6657	0.001512 **
Factor2 X Factor3	16.4	27	1.1156	0.317789
Factor1XFactor2XFactor3	19.9	54	0.6771	0.959624
Residuals	195.7	360		

\*\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively.

The results showed that the P regime, landraces and the inoculation type significantly affected the shoot dry weight (sDW). There were also interaction effects between P regime and landraces and P regime and inoculation type.

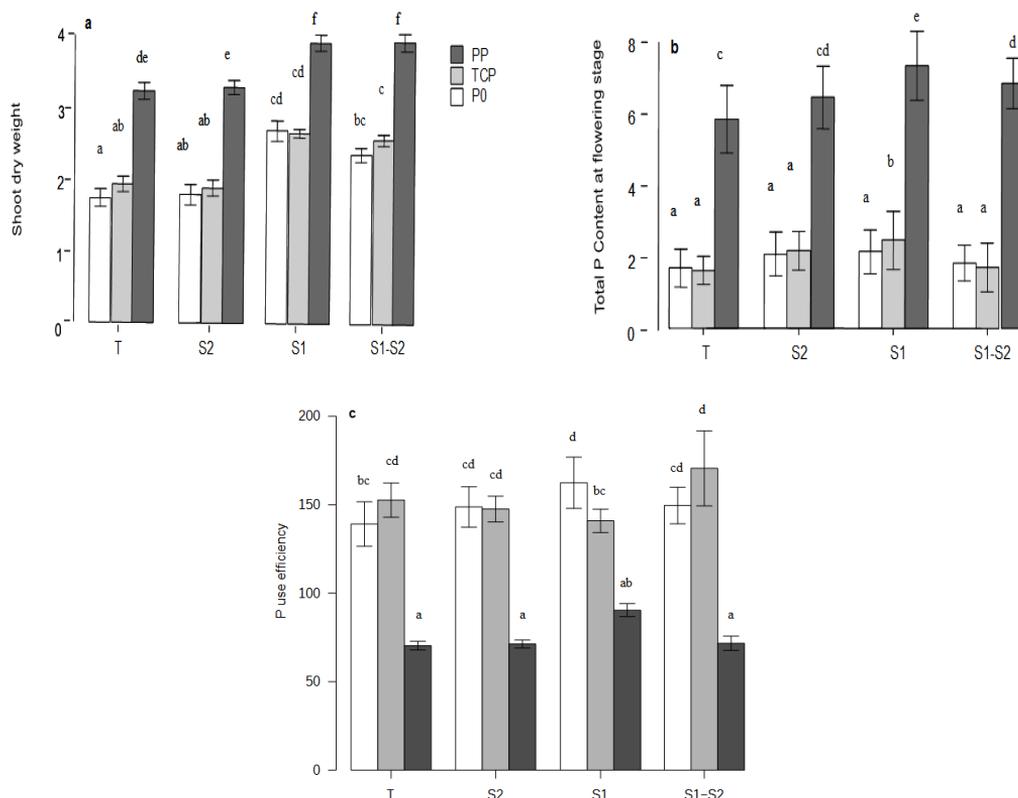
sDW varied between 1.4 and 3.2 g sDW  $\text{pl}^{-1}$  for NKT5 and NE11 without inoculation (Fig. 1, T), between 1.2 and 3.1 g sDW  $\text{pl}^{-1}$  for NAG5 and NE11 for inoculation S2 (Fig. 1, S2), between 2 and 4.5 g sDW  $\text{pl}^{-1}$  for NAG4 and NE10 for inoculation S1 (Fig. 1, S1) and between 1.8 and 3.3 g sDW  $\text{pl}^{-1}$  for NAG5 and NE4 for co-inoculation S1–S2 (Fig. 1, S1–S2). Landraces NE10 and NE4 expressed the highest production potential with more than 4 g sDW  $\text{pl}^{-1}$  under soluble P regime (PP). Growth under TCP varied between 1.3  $\text{pl}^{-1}$  for landraces from Saharian region and 3 g sDW  $\text{pl}^{-1}$  for landraces from the north of Algeria. For all P regimes, the highest sDW were found for the landraces NE4, NE11, and NE10, from the north of Algeria.



**Figure 1.** Effect of P regimes on shoot dry weight for landraces under control without inoculation (T), inoculation with (S2), inoculation with (S1) and co-inoculation (S1–S2). Data are means and SD of 4 harvested plants.

As indicated by the ANOVA in Table 3 and by Fig. 2, a, P regimes and inoculation significantly affected the shoot biomass. For a given inoculation type, the soluble P regime (PP) resulted in a significant increase in the shoot biomass compared to insoluble P (TCP) and deficient P (P0) regimes. Also, for a given P regime, the shoot dry weight significantly increased with inoculation with the fast growing strain *Mesorhizobium sp.* (S1) or S1–S2, compared to no inoculation (T) or inoculation with the slow growing strain *Bradyrhizobium sp.* (S2). Then, inoculation S1 increased shoot

dry weight not only for PP regime but also for TCP and P0 regimes by 22% and 30% respectively (Fig. 2, a)



**Figure 2.** Effect of P regimes (P0, TCP and PP) and inoculation types (T, S2, S1 and S1–S2) on shoot dry weight ( $\text{g plant}^{-1}$ ) (a), on total P content ( $\text{mg P g plant}^{-1}$  DW) (b) and on P use efficiency ( $\text{P}^2$  dry weight  $\text{mg}^{-1}$  P) (c). Values are the means of 40 replicates. Bars indicate standard errors. Mean values labelled with the same letter were not significantly different at  $p < 0.05$ .

### Variability in phosphorus use efficiency (PUE) response for SNF

In order to evaluate the PUE of landraces, a first evaluation of the impact of P deficiency was performed by measuring the total P content of the plants at flowering stage.

Table 4 shows the ANOVA results for total P content in the plants. This P content was significantly influenced by the P regime, the inoculation type, and the landraces, with also an interaction between P regime and inoculation. Under soluble P regime (PP), total P content increased, by more than 20% and 16% respectively for inoculation with S1 and co-inoculation with S1–S2 compared to no inoculation (T) (Fig. 2, b). Under insoluble P regime (TCP), inoculation with S1 significantly increased P content by 20% compared to the other inoculation types (Fig. 2, b).

Furthermore, in response to P deficiency, plants can adjust their internal P requirement by optimizing the metabolic phosphorus use efficiency (PUE) by

producing overall more biomass per unit of P consumed, which in fixing more N<sub>2</sub> per unit of P for a SNF-dependent legume (Vadez & Drevon, 2001). In Table 5 are reported the ANOVA results of physiological PUE.

From this ANOVA, P regimes and inoculation type significantly affected the P use efficiency. There was also an interaction between P regimes and inoculation type.

The inoculation with *Mesorhizobium sp.* (S1) significantly increased the PUE by about 8% and 11% respectively for soluble P (PP) and (P0) compared to other inoculation type (Fig. 2, c). Whereas, the co-inoculation S1–S2 significantly increased the PUE by more than 10% under insoluble P. (Fig. 2, c) shows a strong decrease of PUE for PP regime compared to P0 regime and TCP regime.

**Table 4.** ANOVA results of total P content

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Factor1.P regime	2294.8	2	2175.1601	< 2.2e-16 ***
Factor2.Landraces	10.2	9	2.1409	0.02561 *
Factor3.Inoculation	35.1	3	22.1865	3.327e-13 ***
Factor1 X Factor2	3.8	18	0.4038	0.98678
Factor1 X Factor3	37.1	6	11.7201	5.245e-12 ***
Factor2 X Factor3	8.7	27	0.6078	0.94052
Factor1XFactor2 XFactor3	16.6	54	0.5835	0.99151
Residuals	189.9	360		

\*, \*\*\*, Significant difference at  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively.

**Table 5.** ANOVA results of PUE

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Factor1.P regime	554021	2	60.6961	< 2e-16 ***
Factor2.Landraces	78297	9	1.9062	0.04996 *
Factor3.Inoculation	9845	3	0.7191	0.54111
Factor1 X Factor2	39945	18	0.4862	0.96337
Factor1 X Factor3	64143	6	2.3424	0.03120 *
Factor2 X Factor3	77921	27	0.6324	0.92467
Factor1XFactor2 XFactor3	96135	54	0.3901	0.99997
Residuals	1642999	360		

\*, \*\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively.

### Plant nodulation

Dry matter and number of nodules were evaluated in the different landraces (Fig. 3).

No nodules were found without supply of P (P0) and with supply of insoluble P (TCP P regime), and nodulation was only observed under soluble P regime (PP). This shows that nodulation does not occur in P deficiency conditions.

The landraces and the inoculation type affected significantly the nodule dry weight (nDW) as indicated by the ANOVA results of nodule dry weight for the 6 landraces having nodules under PP regime (Table 6).

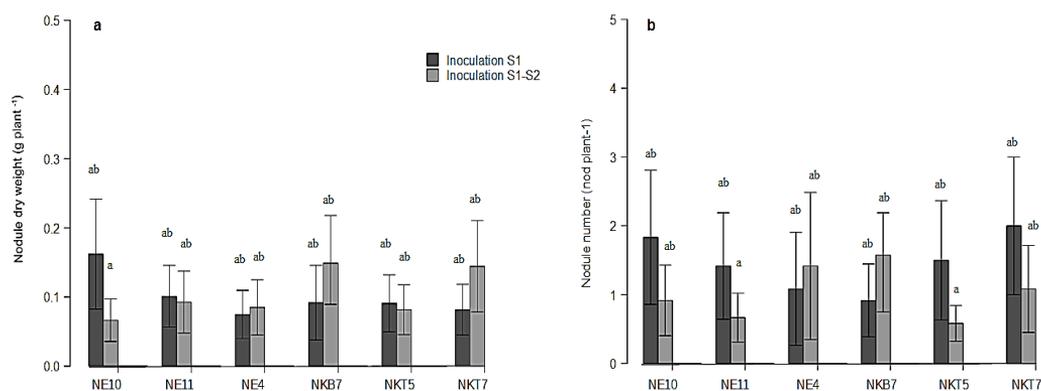
**Table 6.** ANOVA results of nodule dry weight

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Factor1.Landraces	0.5913	9	2.5197	0.008013 **
Factor2.inoculation	0.7487	3	9.5710	3.912e-06 ***
Factor1 X Factor2	0.8432	27	1.1976	0.229169
Residuals	11.4732	440		

\*\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively.

The nodulation only occurred for landraces from the north of Algeria, namely; NE10, NE11, NE4, NKT7, NKB7, and NKT5, and for the inoculations including *Mesorhizobium sp.* (S1 or S1–S2). For these northern landraces nodule dry weight nDW was found to vary between 50 and 180 mg nDW  $pl^{-1}$  for double inoculation with S1–S2 and between 80 and 230 mg nDW  $pl^{-1}$  for inoculation with S1 (Fig. 3, a).

Within the landraces that provided nodules, the nodule number was also influenced by the inoculation type and the cowpea landraces as indicated by Fig. 3, b, for inoculation with S1, the 6 landraces showed high nDW for S1. On the other hand, for double inoculation S1–S2, NE10, NE4 NKB7, and NKT7 significantly showed a higher nodule number than NE11 and NKT5.

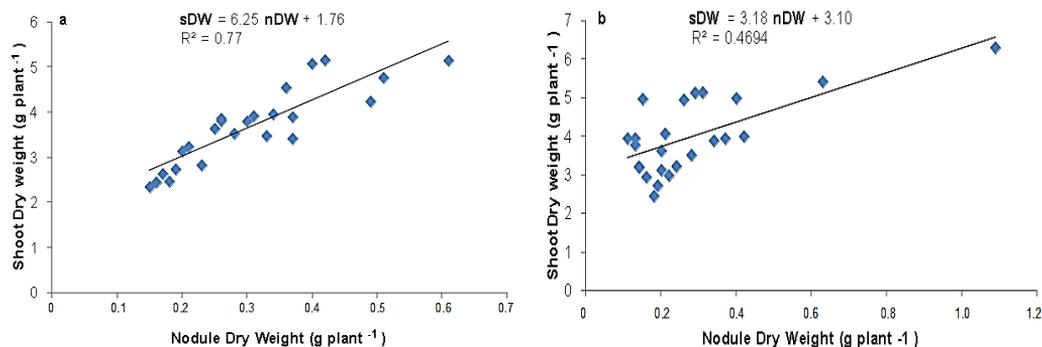


**Figure 3.** Effect of landraces and inoculation on nodule dry weight ( $g\ plant^{-1}$ ) (a) and nodule number ( $nod\ plant^{-1}$ ) (b) for PP regime. Values are the means of 4 replicates. Bars indicate standard errors. Mean values labeled with the same letter were not significantly different at  $p < 0.05$ .

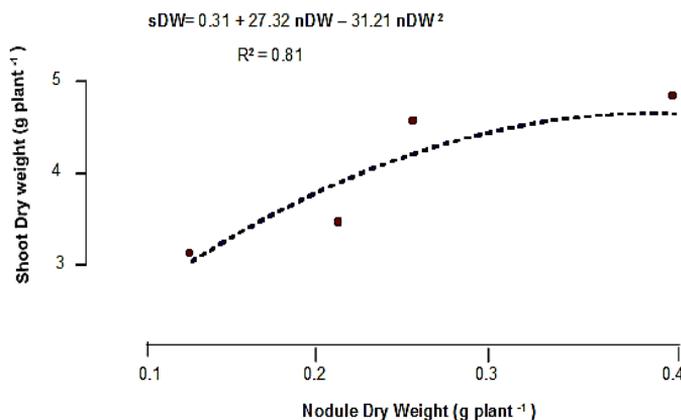
### Efficiency in use of the rhizobial symbiosis for plant growth

In order to assess the efficiency in use of the rhizobial symbiosis (EURS), the values of the shoot biomass were plotted against their corresponding nodule biomass. The slopes of the regressions were considered as an estimate of the EURS. This was achieved under PP regime (the only one having provided nodules) with S1 inoculation type (Fig. 4, a) and co-inoculation S1–S2 (Fig. 4, b). We first proceeded by grouping together all the landraces having provided nodules (i.e the northern landraces). Then we proceeded for each landrace. Fig. 4, a shows, for all the northern landraces together, that shoot and nodule biomass of northern landraces were positively correlated (up to  $R^2 = 0.77$ ) under inoculation type S1. Whereas Fig. 4, b shows a positive correlation between shoot and nodule biomass up to  $R^2 = 0.46$ . However, by considering

landraces individually, only landrace NE10 showed a positive correlation between sDW and nDW under inoculation S1 with  $R^2 = 0.81$  (Fig. 5).



**Figure 4.** Global relationship between nodule dry weight and shoot dry weight for northern landraces under PP regime for inoculation S1(a) and co-inoculation S1–S2 (b). Data are means standard errors of 24 replicates.



**Figure 5.** Correlation between nodule dry weight and shoot dry weight for NE10 under inoculation S1 and PP regime. Data are means standard errors of 4 replicates.

## GENERAL DISCUSSION

The aim of this research was to investigate the ability of ten different cowpea landraces to establish a symbiosis with rhizobia and their efficiency in nitrogen fixation. Nodulation did not occur for all landraces, the process was observed only for northern landraces under PP regime and inoculations including S1 (Fig. 3). Thus, *Mesorhizobium sp.* (S1) was better at infecting than *Bradyrhizobium sp.* (S2). The lack of infectivity of S2 can be explained by the fact that legume root nodules may contain a range of bacteria that are unable to nodulate their hosts (Sprent, 2009).

Depret & Laguerre (2008), reported that different rhizobial genotypes may be better at infecting legume roots and producing effective nodules at different stages of host development. However, the nodulation for SNF with co-inoculation S1–S2 for PP

showed a slight decrease compared to S1, which may have resulted in competition established between both of rhizobia strains. Wielbo et al. (2007) demonstrated that competitiveness is affected by edaphic factors and soil nutrients, in this case by P availability.

No nodulation of *Mesorhizobium sp.* (S1) under TCP and P0 may be explained by a low tolerance to low levels of P for the fast-growing strains (Raman et al., 2006).

Landraces from oasis in Saharian region showed no nodulation with the two rhizobial strains that we tested so low SNF capacity. This might be attributed to their original domestication promoting a high level of specificity for the symbiosis rhizobia-cowpea genotype. In fact S1 and S2 are strains isolated from northern landraces, where they are adapted.

The nodulation and as a result, the SNF in the cowpea landraces, was found to be influenced by P deficiency. Thus, P deficiency particularly affects the rhizobial symbiosis (Attar, 2014). In fact, P appears to be essential for both nodulation and nitrogen fixation (Rai, 2006).

The increased plant growth under PP shown in Fig. 1 is likely attributed to enhanced P nutrition (Fig. 1). In addition to nitrogen-fixation, enhancement of legume symbioses is often manifested by an increase in the phosphorus content of the plant (Vessey, 2003).

The increase of shoot dry weight with S1 under P0 and TCP could result from a phosphatase release by S1, which can contribute to increase P availability to the plant. This could explain the increase of P content observed with S1 under P0 and TCP (cf. Fig. 2 b).

The greater sDW for NE4, NE11, and NE10 landraces under all P regimes compared to others landraces may be related to enhanced phosphorus use efficiency. In fact, one of the strategies employed by plants in response to P deficiency consists in optimizing the metabolic phosphorus use efficiency (PUE). This is achieved by producing higher overall biomass per unit of P consumed, through fixing more N<sub>2</sub> per unit of P for an SNF-dependent legume (Vadez & Drevon, 2001).

Our findings presented in figure 4 also revealed a positive correlation for inoculation S1 and co-inoculation (S1-S2) under PP regime between the biomass of symbiotic nodules nDW and the shoot dry weight sDW. This correlation may indicate that the symbiotic nitrogen fixation is effective under P sufficient conditions. The increase in EURS suggests high regulation between EURS and the plant P requirement, probably in relation to the high energy requirement of the SNF process (Lazali et al., 2013). This finding is in agreement with previously published data (Attar, 2014).

## CONCLUSIONS

The presented research was focused on the influence of inoculation and phosphorus regimes on symbiotic nitrogen fixation and phosphorus use efficiency of Algerian cowpea landraces. It was determined that:

- Soluble P enhances the growth of plants, their total P content and nodulation.
- The fast-growing *Mesorhizobium sp.* (S1) is better at infecting and effectiveness than the slow-growing *Bradyrhizobium sp.* (S2).

- S1 increased shoot dry weight under P0 and insoluble P (TCP). This could be due to releasing of phosphatase by S1, which can contribute to enhance P availability.
- Only northern landraces showed nodulation with soluble P regime and inoculations with fast growing strains *Mesorhizobium* sp. (S1). As the soil was sterilised before inoculation and as the tested strains came also from the northern region, this suggests that there are probably regional adaptations between the rhizobia strains and the cowpea landraces.
- The strain S1 significantly increased the phosphorus use efficiency by 8% under P soluble conditions.
- The landraces NE4, NE11 and NE10 exhibited a higher performance under all P regimes with S1 inoculation. Therefore, these landraces may be used as a source of genetic diversity for cowpea production to improve PUE for SNF potential, and their adaptation to the climatic conditions of the South could be tested.

However, further studies on field experiments are needed to identify whether similar results may be observed with a more extensive array of cowpea landraces and rhizobia potentially adapted to southern landraces whether their potential differences in PUE are associated with genotype–rhizobia interaction in adaptation to low–P soils.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by the laboratory of Laboratoire d'Amélioration Intégrative des Productions Végétales (LAIPV) from the 'Ecole Nationale Supérieure Agronomique' (ENSA) of Algiers. We are grateful to Dr Ghalmi N. and his team for putting at our disposal the cowpea collection.

## REFERENCES

- Alkama, N., Ounane, G. & Drevon, J.J. 2012. Is genotypic variation of H<sup>+</sup> efflux under P deficiency linked with nodulated–root respiration of N<sub>2</sub>–Fixing common–bean (*Phaseolus vulgaris* L.)?. *Journal of plant physiology* **169**, 1084–1089.
- Attar, H. 2014. Phosphorus Availability and Proton Efflux of Nodulated–root Varies among Common–bean Genotypes (*Phaseolus vulgaris*) in Rhizobox. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* **7**, 391–401.
- Baligar, V.C., Fageria, N.K. & He, Z.L. 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **32**(7–8), 921–950.
- Beattie, G.A. 2007. Plant–associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In *Plant–associated bacteria*. Springer, Netherlands, pp.1–56.
- Depret, G. & Laguerre, G. 2008. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* populations nodulating pea. *New Phytologist* **179**, 224–235.
- Deubel, A. & Merbach, W. 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp.177–191.
- Drevon, J.J. & Hartwig, U.A. 1997. Phosphorus deficiency increases the argon–induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta* **201**, 463–469.
- Fox, J. 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software* **14**(9), 1–42.
- Gentili, F. & Huss–Danell, K. 2003. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. *J. Exp. Bot.* **54**, 2757–2767.

- Ghalmi, N., Malice, M., Jacquemin, J.M., Ounane, S.M., Mekliche, L. & Baudoin, J.P. 2010. Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. *Genetic resources and crop evolution* **57**, 371–386.
- Goenaga, R., Gillaspie, V. & Quiles, A. 2008. Assessing yield potential of cowpea genotypes grown under virus pressure. *Hort Sci.* **43**, 673–676.
- Graham, P.H. 2008. Ecology of the root–nodule bacteria of legumes. In: Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. and Newton, W.E. (eds) *Leguminous nitrogen–fixing symbiosis*. Springer, Netherlands, pp.23–58.
- Husson, F., Josse, J. & Le, S. 2014. RcmdrPlugin.FactoMineR: Graphical User Interface for FactoMineR. R package version 1.5-0. <http://CRAN.R-project.org/package=RcmdrPlugin.FactoMineR>
- Lazali, M., Zaman-Allah, M., Amenc, L., Ounane, G., Abadie, J. & Drevon, J.J. 2013. A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*–rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta* **238**(2), 317–324.
- Leidi, E.O. & Rodríguez–Navarro, D.N. 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. *New Phytol.* **147**, 337–346.
- Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software {EZR} for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation* 2013 **48**, 452–458, advance online publication, December 3, 2012.
- Kouas, S., Labidi, N., Debez, A. & Abdelly, C. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agron. Sustain.* **25**, 389–393.
- MacDonald, G.K., Bennett, E.M., Potter, P.A. & Ramankutty, N. 2011. Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(7), 3086–3091.
- Murillo–Amador, B., Troyo–Diéguez, E., García–Hernández, J.L., López–Aguilar, R., Ávila–Serrano, A.G., Zamora–Salgado, S., Rueda–Puente, E.O. & Kaya, C. 2006. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. *Hort Sci.* **108**, 423–431.
- Rai, M. 2006. *Handbook of microbial biofertilizers*. CRC, New York, USA, 385p.
- Raman, N., Selvaraj, T. & Rai, M. 2006. Tripartite relationship of Rhizobium, AMF, and host in growth promotion. In: M. Rai (Eds). *Handbook of Microbial Biofertilizers*, New York, USA, pp.51–88.
- R Core team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Richardson, A.E., Hocking, P.J., Simpson, R.J. & George, T.S. 2009. Plant mechanisms to optimize access to soil phosphorus. *Crop Pasture Sci.* **60**, 124–143
- Sprent, J. 2009. *Legume nodulation*. John Wiley & Sons, United Kingdom, pp.36–45.
- Triad S. & Kengo N. 2013. RcmdrPlugin.KMggplot2: An Rcmdr Plug-In for Kaplan-Meier Plots and Other Plots by Using the ggplot2 Package. R package version 0.2-0. <http://CRAN.R-project.org/package=RcmdrPlugin.KMggplot2>.
- Tunesi, S., Poggi, V. & Gessa, C. 1999. Phosphate adsorption and precipitation in calcareous soils: the role of calcium ions in solution and carbonate minerals. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **53**(3), 219–227.
- Vadez, V. & Drevon, J.J. 2001. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in common–bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* **21**, 691–699.
- Valizadeh, G.R., Rengel, Z. & Rate, A.W. 2003. Response of wheat genotypes efficient in P utilization and genotypes responsive to P fertilisation to different P banding depths and watering regimes. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**, 59–65.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* **255**, 571–586.

## ***ANNEXES***

Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., Kubik-Komar, A. & Skorupska, A. 2007. Increased metabolic potential of *Rhizobium spp.* is associated with bacterial competitiveness. *Canadian journal of microbiology* **53**, 957–967.

## ANNEXE 2

**Tableau 1.** ANOVA du poids sec de la partie aérienne

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1.P traitement	319.6	2	293.8886	< 2.2e-16 ***
Facteur2.Accessions	10.6	9	2.1617	0.024105 *
Facteur3.Inoculation	68.8	3	42.2055	< 2.2e-16 ***
Facteur1 X Facteur2	28.1	18	2.8712	9.461e-05 ***
Facteur1 X Facteur3	12.0	6	3.6657	0.001512 **
Facteur2 X Facteur3	16.4	27	1.1156	0.317789
Facteur1XFacteur2XFacteur3	19.9	54	0.6771	0.959624
Residuals	195.7	360		

\*\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively

**Tableau 2.** ANOVA de la teneur en P total de la plante

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1.P traitement	2294.8	2	2175.1601	< 2.2e-16 ***
Facteur2.Accessions	10.2	9	2.1409	0.02561 *
Facteur3.Inoculation	35.1	3	22.1865	3.327e-13 ***
Facteur1 X Facteur2	3.8	18	0.4038	0.98678
Facteur1 X Facteur3	37.1	6	11.7201	5.245e-12 ***
Facteur2 X Facteur3	8.7	27	0.6078	0.94052
Facteur1XFacteur2 XFacteur3	16.6	54	0.5835	0.99151
Residuals	189.9	360		

\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively

**Tableau 3.** ANOVA de l'efficacité d'utilisation du P (EUP)

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1.P traitement	554021	2	60.6961	< 2e-16 ***
Facteur2.Accessions	78297	9	1.9062	0.04996 *
Facteur3.Inoculation	9845	3	0.7191	0.54111
Facteur1 X Facteur2	39945	18	0.4862	0.96337
Facteur1 X Facteur3	64143	6	2.3424	0.03120 *
Facteur2 X Facteur3	77921	27	0.6324	0.92467
Facteur1XFacteur2 XFacteur3	96135	54	0.3901	0.99997
Residuals	1642999	360		

\*, \*\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively

**Tableau 4.** ANOVA du poids sec des nodules

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1.Accessions	0.5913	9	2.5197	0.008013 **
Facteur2.inoculation	0.7487	3	9.5710	3.912e-06 ***
Facteur1 X Facteur2	0.8432	27	1.1976	0.229169
Residuals	11.4732	440		

\*\* , \*\*\* Significant difference at  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively

**ANNEXE 3**

**1. Mode opératoire des galeries API 20NE**

- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures fraîches (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**a. Inoculation de la galerie**

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
  - pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule,
  - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
  - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

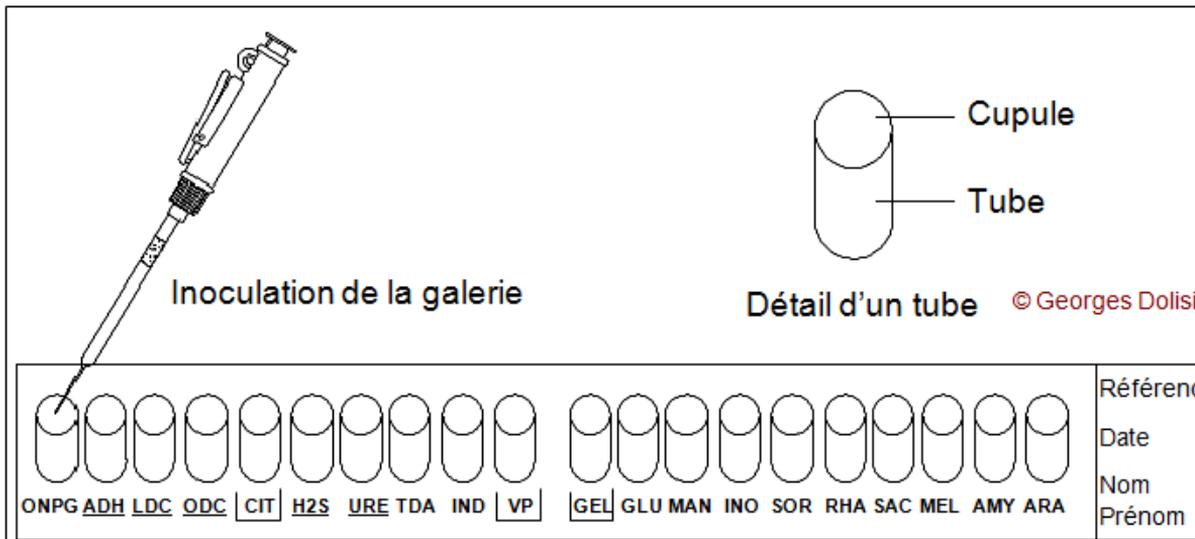


Figure. Présentation d'une galerie Test api 20EN

### b. Identification

- Avec le tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau : chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité.
- Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification.
- Avec un logiciel d'identification.

## **2. Protocole d'extraction d'ADN (protocole MP soil)**

### **a. Étape d'extraction d'ADN**

1. Prélever 2 ml de la préculture.
2. Centrifuger la culture de 2 ml 5 min à 5000g dans des falcons à 15ml.
3. 3X laver le culot de 2 ml avec 1ml d'eau pure centrifuger après chaque lavage (5 min à 5000g).
4. Reprise du culot de 2ml de culture dans 200 µl de MT buffer.
5. Transférer dans la matrice bleue (bactéries).
6. Ajouter 978 µl de Sodium Phosphate Buffer puis 122 µl de MT Buffer
7. Broyage des échantillons avec le FastPrep®-2. Lancement du programme approprié (temps de run 40s vitesse de run 6m/s).
8. Centrifuger 10 min à 14 000g (= 14 rcf) à température ambiante.
9. Transférer le surnageant dans un tube de 1,5 ml.
10. Ajouter tube par tube 250 µl de PPS (Protein Precipitation Solution) et mélanger par retournement le tube 10 fois.
11. Centrifuger 5 min à 14 000g à température ambiante.
12. Transférer le surnageant dans un tube de 2 ml.
13. Ajouter 1 ml de DNA binding matrice. Bien mélanger la binding matrice avant utilisation et entre chaque échantillon.
14. Placer dans un agitateur rotatif (23 rpm) pendant 10 minutes à température ambiante.
15. Centrifuger 2 min à 14 000g à température ambiante.
16. Ajouter 500 µl de SEWS-M et re-suspendre la matrice doucement.
17. Placer la solution sur colonne Spin Filter (penser à noter la colonne et le bouchon).
18. Centrifuger 1 min à 14 000g à température ambiante.

19. Centrifuger à vide 2 min à 14 000g à température ambiante.
20. Laisser sécher à l'air libre 5 min (Pour éviter l'évaporation lors de l'incubation à 55°C).
21. Re-suspendre la matrice dans 150 µl de DES.
22. Incubation durant 15 min à 55°C.
23. Mettre le spin filter dans un nouveau « catch tube ». Centrifuger 1 min à 14 000g et à température ambiante.
24. Récupération du sous-nageant en mélangeant bien à la pipette et le transférer dans un nouveau tube de 1,5ml (low binding).
25. Vérification de la pureté des ADN sur gel d'agarose 1% (déposer 2 µL) à 120v pendant 30 minutes.

## ANNEXE 4

**Tableau 1.** ANOVA du poids sec des nodules

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1.Traitement de P	21.996	1	126.2910	< 2e-16 ***
Facteur2. Souches	60.085	19	18.1567	< 2e-16 ***
Facteur1 X Facteur2	6.217	19	1.8787	0.02748 *
Residuals	13.934	80		

\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively

**Tableau 2.** Test de Tukey du poids sec des nodules

Souches	Traitement de P	Groupes
F4	P déficient	ab
F6	P déficient	ab
S2	P déficient	abc
F3	P déficient	abcd
A1	P déficient	abcd
S5	P déficient	abcd
S3	P déficient	abcd
F5	P déficient	abcd
A2	P déficient	abcd
S7	P déficient	abcd
F2	P déficient	abcd
F1	P déficient	abcd
S8	P déficient	abcd
F2	P suffisant	abcde
S7	P suffisant	abcdef
F6	P suffisant	abcdef
F3	P suffisant	abcdef
S3	P suffisant	abcdef
A1	P suffisant	abcdef
S8	P suffisant	abcdef
F4	P suffisant	abcdef
S5	P suffisant	abcdef
F1	P suffisant	abcdef
A2	P suffisant	abcdef
S2	P suffisant	abcdefg
CB756	P déficient	abcdefg
A3	P déficient	abcdefg
S19	P déficient	bcdefgh
S4	P déficient	cdefgh
S21	P déficient	defgh
F5	P suffisant	efgh
S19	P suffisant	efgh
CB756	P suffisant	fgh
S4	P suffisant	gh
S21	P suffisant	gh
A3	P suffisant	h

**Tableau 3.** ANOVA du poids sec des parties aériennes

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1. Traitement de P	747.90	1	251.9645	< 2.2e-16 ***
Facteur2. Souches	508.36	19	9.0139	4.973e-13 ***
Facteur1 X Facteur2	226.65	19	4.0188	5.821e-06 ***
Residuals	237.46	80		

\*\*\* Significant difference at  $p < 0.001$

**Tableau 4.** Test de Tukey du poids sec des parties aériennes

Souches	Traitement de P	Groupes
S10	P déficient	a
S5	P déficient	a
F1	P déficient	a
F6	P déficient	a
S19	P déficient	a
F2	P déficient	a
S7	P déficient	a
A2	P déficient	a
S2	P déficient	ab
S4	P déficient	ab
S8	P déficient	ab
A1	P déficient	ab
F5	P déficient	ab
S3	P déficient	ab
S10	P suffisant	ab
Témoin urée	P déficient	ab
F3	P déficient	ab
F6	P suffisant	ab
CB756	P déficient	ab
A3	P déficient	abc
F4	P déficient	abc
S3	P suffisant	abcd
S8	P suffisant	abcde
S2	P suffisant	abcde
F3	P suffisant	abcdef
S21	P déficient	abcdef
S7	P suffisant	abcdef
A1	P suffisant	abcdef
F2	P suffisant	abcdef
F4	P suffisant	abcdef
A2	P suffisant	abcdef
S5	P suffisant	abcdef
F1	P suffisant	abcdef
S19	P suffisant	bcdefg
Témoin urée	P suffisant	cdefg
S4	P suffisant	defg
F5	P suffisant	efg
A3	P suffisant	fg
CB756	P suffisant	g
S21	P suffisant	g

**Tableau 5.** ANOVA du poids sec des parties racinaires

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1. Traitement de P	119.26	1	48.6930	7.819e-10 ***
Facteur2. Souches	105.15	19	2.2595	0.006262 **
Facteur1 X Facteur2	22.86	19	0.4912	0.959125
Residuals	195.93	80		

\*\*, \*\*\* Significant difference at  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively

**Tableau 6.** Test de Tukey du poids sec des parties racinaires

Souches	Groupes
S10	a
S2	ab
S3	ab
F6	ab
S5	ab
A1	ab
S7	ab
S8	ab
F2	ab
F1	ab
A3	abc
F3	abc
F4	abc
F5	abc
S4	bcd
A2	bcd
Témoin urée	bcd
S19	bcd
CB756	bcd
S21	cd

**Tableau 7.** ANOVA de la concentration en P des nodules

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1. Traitement de P	233.0	1	4073.161	$< 2.2e-16$ ***
Facteur2. Souches	411.3	19	378.492	$< 2.2e-16$ ***
Facteur1 X Facteur2	38.3	19	35.245	$< 2.2e-16$ ***
Residuals	4.6	80		

\*\*\* Significant difference at  $p < 0.001$

**Tableau 8.** Test de Tukey de la teneur en P des nodules

Souches	Traitement de P	Groupes
S8	P déficient	b
F1	P déficient	bc
F3	P déficient	bc
S7	P déficient	bcd
F4	P déficient	bcd
F2	P déficient	bcde
S2	P déficient	bcde
F5	P déficient	bcde
S5	P déficient	bcdef
F6	P déficient	bcdef
A1	P déficient	bcdef
S4	P déficient	bcdef
CB756	P déficient	bcdef
S3	P déficient	cdef
A2	P déficient	def
S19	P déficient	ef
A3	P déficient	ef
S21	P déficient	f
F1	P suffisant	g
F2	P suffisant	gh
S8	P suffisant	ghi
S3	P suffisant	ghij
F3	P suffisant	ghijk
S2	P suffisant	ghijk
F4	P suffisant	ghijkl
S5	P suffisant	hijkl
A1	P suffisant	ijkl
F6	P suffisant	jklm
F5	P suffisant	klm
A3	P suffisant	lmn
CB756	P suffisant	lmn
S7	P suffisant	mno
A2	P suffisant	nop
S4	P suffisant	op
S19	P suffisant	op
S21	P suffisant	p

**Tableau 9.** ANOVA de la concentration en P des parties aériennes

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1. Traitement de P	141.66	1	1320.460	< 2.2e-16 ***
Facteur2. Souches	170.82	19	83.803	< 2.2e-16 ***
Facteur1 X Facteur2	38.22	19	18.750	< 2.2e-16 ***
Residuals	8.58	80		

\*\*\* Significant difference at  $p < 0.001$

**Tableau 10.** Test de Tukey de la teneur en P des parties aériennes

Souches	Traitement de P	Groupes
A1	P déficient	a
S10	P déficient	a
F1	P déficient	a
S2	P déficient	ab
F2	P déficient	ab
S7	P déficient	ab
CB756	P déficient	abc
S3	P déficient	abcd
S10	P suffisant	abcd
F1	P suffisant	bcde
F4	P déficient	bcde
F3	P déficient	cdef
F6	P déficient	cdef
S8	P déficient	cdef
F4	P suffisant	cdefg
A3	P déficient	cdefg
A2	P déficient	cdefgh
Témoin urée	P déficient	cdefgh
S5	P déficient	defgh
S3	P suffisant	efghi
F5	P déficient	efghi
S19	P déficient	efghi
S7	P suffisant	efghi
S2	P suffisant	fghij
F6	P suffisant	ghijk
S5	P suffisant	hijk
S8	P suffisant	ijkl
A1	P suffisant	klm
CB756	P suffisant	klm
S4	P déficient	klm
F2	P suffisant	klm
F5	P suffisant	klm
S21	P déficient	lmn
Témoin urée	P suffisant	lmno
S21	P suffisant	mno
S19	P suffisant	mno
F3	P suffisant	mno
A2	P suffisant	nop
S4	P suffisant	op
A3	P suffisant	p

**Tableau 11.** ANOVA de la concentration en P des parties racinaires

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1. Traitement de P	86.4	1	1006.508	< 2.2e-16 ***
Facteur2. Souches	267.5	19	163.946	< 2.2e-16 ***
Facteur1 X Facteur2	153.5	19	94.072	< 2.2e-16 ***
Residuals	6.9	80		

\*\*\* Significant difference at  $p < 0.001$

**Tableau 12.** Test de Tukey de la teneur en P des parties racines

Souches	Traitement de P	Groupes
A1	P déficient	a
S10	P déficient	a
F1	P déficient	a
S2	P déficient	ab
F2	P déficient	ab
S7	P déficient	ab
CB756	P déficient	abc
S3	P déficient	abcd
S10	P suffisant	abcd
F1	P suffisant	bcde
F4	P déficient	bcde
F3	P déficient	cdef
F6	P déficient	cdef
S8	P déficient	cdef
F4	P suffisant	cdefg
A3	P déficient	cdefg
A2	P déficient	cdefgh
Témoin urée	P déficient	cdefgh
S5	P déficient	defgh
S3	P suffisant	efghi
F5	P déficient	efghi
S19	P déficient	efghi
S7	P suffisant	efghi
S2	P suffisant	fghij
F6	P suffisant	ghijk
S5	P suffisant	hijk
S8	P suffisant	ijkl
A1	P suffisant	jklm
CB756	P suffisant	jklm
S4	P déficient	klm
F2	P suffisant	klm
F5	P suffisant	klm
S21	P déficient	lmn
Témoin urée	P suffisant	lmno
S21	P suffisant	mno
S19	P suffisant	mno
F3	P suffisant	mno
A2	P suffisant	nop
S4	P suffisant	op
A3	P suffisant	p

**Tableau 13.** ANOVA de la concentration en N des parties aériennes

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1. Traitement de P	11174	1	298.9280	< 2.2e-16 ***
Facteur2. Souches	74378	19	104.7243	< 2.2e-16 ***
Facteur1 X Facteur2	6743	19	9.4941	1.364e-13 ***
Residuals	2990	80		

\*\*\* Significant difference at  $p < 0.001$

**Tableau 14.** Test de Tukey de la teneur en N des parties aériennes

Souches	Traitement de P	Groupes
S10	P déficient	a
S2	P déficient	ab
S3	P déficient	ab
S10	P suffisant	abc
S8	P déficient	abcd
S2	P suffisant	abcd
S3	P suffisant	abcd
F3	P déficient	abcd
A1	P déficient	abcd
F4	P déficient	abcd
F5	P déficient	abcde
A1	P suffisant	abcdef
F6	P déficient	bcdefg
F1	P déficient	bcdefg
F2	P déficient	bcdefg
S5	P déficient	cdefgh
S8	P suffisant	defghi
S4	P déficient	defghij
F6	P suffisant	efghijk
S5	P suffisant	efghijk
S21	P déficient	fghijk
F1	P suffisant	ghijk
F2	P suffisant	hijkl
A2	P déficient	ijklm
F5	P suffisant	ijklm
F3	P suffisant	ijklm
A3	P déficient	ijklm
F4	P suffisant	ijklm
S7	P déficient	jklm
S19	P déficient	klm
S7	P suffisant	klmn
CB756	P suffisant	lmno
CB756	P déficient	lmno
S4	P suffisant	lmno
A3	P suffisant	mno
S19	P suffisant	nop
S21	P suffisant	opq
A2	P suffisant	opq
Témoin urée	P déficient	pq
Témoin urée	P suffisant	q

**Tableau 15.** ANOVA de la concentration en N des parties racinaires

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Facteur1. Traitement de P	23517	1	696.115	< 2.2e-16 ***
Facteur2. Souches	59309	19	92.397	< 2.2e-16 ***
Facteur1 X Facteur2	13909	19	21.668	< 2.2e-16 ***
Residuals	2703	80		

\*\*\* Significant difference at  $p < 0.001$

**Tableau 16.** Test de Tukey de la teneur en N des parties racinaires

Souches	Traitement de P	Groupes
S3	P déficient	a
S7	P déficient	a
S10	P déficient	a
S8	P déficient	a
F5	P déficient	a
CB756	P déficient	a
S5	P déficient	a
S10	P suffisant	ab
A1	P déficient	abc
F4	P déficient	abc
S3	P suffisant	abc
S4	P déficient	abc
S5	P suffisant	abcd
S2	P déficient	abcd
A1	P suffisant	abcde
S2	P suffisant	abcde
F6	P déficient	abcde
S8	P suffisant	abcdef
F3	P déficient	abcdef
S19	P déficient	abcdefg
F2	P déficient	abcdefg
F1	P déficient	bcdefgh
A2	P déficient	cdefgh
F4	P suffisant	defgh
S7	P suffisant	efgh
F1	P suffisant	fgh
F3	P suffisant	gh
F2	P suffisant	gh
F6	P suffisant	h
F5	P suffisant	h
S21	P déficient	h
A3	P déficient	h
S4	P suffisant	i
Témoin urée	P déficient	i
A2	P suffisant	i
S19	P suffisant	i
S21	P suffisant	i
CB756	P suffisant	i
A3	P suffisant	i
Témoin urée	P suffisant	i

## ANNEXE 5

**1. Extraction d'ARN (kit Qiagen)**

Le kit Rneasy de Qiagen peut être utilisé pour nettoyer de l'ARN préalablement isolé par différentes techniques (réactions enzymatiques notamment à la Dnase).

**a. Précautions à prendre**

Le matériel utilisé doit être stérile (autoclavé 2X à 120°C pendant 20').

**Attention** : le  $\beta$  Mercaptoéthanol ( **$\beta$ ME**) doit être ajouter au Buffer RLT avant utilisation 10 $\mu$ l de  $\beta$ ME pour 1ml de Buffer RLT (mélange stable 1 mois après l'addition de  $\beta$ ME). Le  $\beta$ ME est toxique à **manipuler sous hotte**.

Ajouter 4 volumes d'éthanol (96-100%) dans un volume de buffer RPE pour obtenir la solution de travail.

**b. Mode opératoire****Pour bactéries en milieux solide**

- Ajouter 1ml d'H<sub>2</sub>O stérile dans chaque boîte, racler à l'aide d'un râteau stérile pour homogénéiser, prélever ensuite à l'aide de pipette (cône stérile). Transférer dans un mortier stérile broyer les bactéries avec de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre en dentelle (voir figure ci-dessous)



**Figure.** Poudre en dentelle

- Prendre la poudre la mettre dans un tube de 2ml.
- Ajouter 600  $\mu$ l de buffer RLT et mélanger vigoureusement. Plonger dans l' $N_2$  liquide quelques secondes puis incuber rapidement de 1 à 3 min à 56°C peut aider à la lyse des tissus.
- Note : s'assurer que le  $\beta$  Mercapto-Ethanol est bien ajouté au buffer RLT ou RLC.
- Pipeter le lysa directement dans la colonne blanche à bague violette placée dans un tube de 2 ml. (Identifier l'échantillon sur tube et colonne).
- Centrifuger 2 min à 13 000 rpm et mettre le sous nageant dans un nouveau tube de 2 ml.
- Si nécessaire couper le bout d'un cône pour introduire le lysat dans la colonne.
- La centrifugation retient les débris cellulaire et homogénéise le lysat. S'il y a beaucoup de débris, certaines particules peuvent passer dans le tube. Faire attention alors de ne pas les collecter en transférant le lysat dans un autre tube.

- Ajouter 0,5 volume (usuellement 225 $\mu$ l) d'éthanol pur dans le lysat et mélanger à la pipette immédiatement. Ne pas centrifuger. Continuer sans délais à la prochaine étape.
- Un précipité peut se former après l'addition d'éthanol, mais cela n'affecte pas la procédure.
- Mettre l'échantillon (environ 650 $\mu$ l) avec les précipités formés dans une colonne rose placée dans un tube de 2 ml. Fermer le tube doucement et centrifuger 15 s à plus de 10000 RPM. Enlever le sous-nageant.
- Si le volume est plus grand que 700  $\mu$ l, centrifuger en plusieurs fois.
- Ajouter 700  $\mu$ l de buffer RW1 dans la colonne. Fermer gentiment et centrifuger 15 s à plus de 10 000 RPM. Jeter le sous nageant et le tube collecteur.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml. Ajouter 500  $\mu$ l de buffer RPE additionné d'éthanol dans la colonne. Centrifuger 15s à plus de 10 000RPM. Jeter le sous-nageant.
- Ajouter encore 500  $\mu$ l de buffer RPE dans la colonne. Centrifuger 2 min) plus de 10 000 RPM pour sécher la membrane de la colonne.
- Optionnel : mettre la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et centrifuger 1 min afin d'éliminer la totalité de l'éthanol qui pourrait interférer avec les prochaines étapes.
- Pour l'éluion : mettre la colonne dans un tube de 1,5ml, ajouter 30 en un premier temps d'eau DEPC directement sur la membrane. Attention à bien placer l'eau au centre de la colonne pour éviter la rétention d'eau par la bague. Laisser «reposer » 5 pour que l'ARN soit bien solubilisé puis rajouter 20 $\mu$ l en un second temps et laisser reposer 5 min.
- Centrifuger 1 min à 10.000 rpm.
- Conserver les ARN à - 20°C

## **2. Extraction d'ADN**

- La colonne blanche à bague violette retient l'ADN et laisse passer l'ARN et les protéines pour récupérer l'ADN :
- Rajouter à la colonne blanche 500 µl de l'AP3/E Binding buffer en s'assurant de bien mélanger et immédiatement à la pipette.
- Centrifuger 15s à plus de 10000 rpm. Enlever le sous-nageant, mettre la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2ml et centrifuger 1 min à 8000 rpm. Jeter le sous-nageant et réutiliser le tube collecteur pour l'étape suivante.
- Ajouter 500 µl de Buffer AW dans la colonne et centrifuger 2 min à 13000 rpm. Il est important de ne plus avoir de trace d'éthanol sur la membrane sèche de la colonne.
- Note : Faire attention à ne pas toucher le sous-nageant avec le fond de la colonne.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube de 1,5 ou 2ml (non fourni) et mettre 100 µl de buffer AE en un premier temps sur la membrane. Laisser reposer 5min à température ambiante puis rajouter 100 µl de buffer AE et laisser reposer 5 min.
- Centrifuger 1 min à 10000 rpm.
- Conserver les ADN à 4°C.

## Résumé :

Le niébé, comme toutes légumineuses, est très exigeant en phosphore pour fixer l'azote atmosphérique. De ce fait la déficience en cet élément devient un facteur limitant sévère de la production de cette légumineuse. L'outil de base de cette étude s'appuie sur des symbioses rhizobia-niébé fixatrices d'azote et la sélection de génotypes performants sous déficience en phosphore. Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis de répondre à l'objectif global de la thèse qui consistait à caractériser les mécanismes qui améliorent l'assimilation du phosphore chez le niébé. Il en ressort que (i) l'origine géographique des accessions affecte considérablement la fixation symbiotique de l'azote et l'efficacité de cette espèce à utiliser le P (ii) le niébé présente une forte promiscuité et peut être nodulé par plusieurs espèces rhizobiennes (*Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Rhizobium*) (iii) l'activité phytase bactérienne est démontrée chez les rhizobia et est localisée au niveau de la zone infectée du nodule en conditions de déficience en P. Cette activité phytase confère à la plante une meilleure adaptation de la fixation symbiotique de l'azote à la déficience en P.

**Mots clés :** Niébé, rhizobia, symbiose, phytase, déficience en P.

## الملخص:

فاصوليا النيببي ، كباقي البقوليات تعد من النباتات التي تتطلب الفوسفور لتثبيت الأزوت الجوي لذا النقص في هذا المركب يعتبر عامل محد للإنتاج. تعتمد هذه الدراسة على التعايش بين الفاصوليا النيببي و البكتيريا العقدية المثبتة للأزوت و انتقاء النمط الجيني الأنسب عند نقص الفوسفور. النتائج المتحصل عليها خلال هذا العمل سمحت لنا بالإجابة على الإشكالية المجلدة للأطروحة المعتمدة على تمييز الآلية التي تحسن استيعاب نبات الفاصوليا النيببي للفوسفور. ابرزنا ان المنشأ الجغرافي للسلسلة يؤثر تأثيرا معتبرا على التعايش بين البكتيريا العقدية و الفاصوليا النيببي وفعالية هذا النوع لاستعمال الفوسفور. للفاصوليا النيببي قابلية اختلاط عالية بالبكتيريا العقدية ومنه تشكيل الحبيبات العقدية مع أصناف كثيرة من البكتيريا (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* و *Mesorhizobium*). اظهر نشاط الفيتاز عند البكتيريا العقدية و حدد موقعه على مستوى الحبيبات العقدية في حالة نقص الفوسفور. ان نشاط الفيتاز يزيد من تكيف النبات لتثبيت الأزوت بالتكافل في حالة نقص الأزوت.

**الكلمات المفتاحية:** الفاصوليا نيببي، البكتيريا العقدية، نقص الفوسفور، التعايش، الفيتاز

## Abstract:

Cowpea, as a legume, is very depending in phosphorus for N<sub>2</sub>-fixing. As a result, the deficiency in this element becomes a severe limiting factor in the production of this legume. The basic tool of this study is based on nitrogen-fixing rhizobia-cowpea symbiosis and the selection of high-performance genotypes with phosphorus deficiency. The results obtained during this work enabled us to confirm our main aim of this of the thesis which consisted in characterizing the mechanisms that improve phosphorus uptake in cowpea. It appears that (i) the geographical origin of accessions considerably affects the symbiotic nitrogen fixation and the effectiveness of this species in using P (ii). Cowpea has a strong promiscuity and can be nodulated by several rhizobial species. (*Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium*) (iii) bacterial phytase activity is demonstrated in rhizobia and is localized at the nodule infected zone under P deficiency. This phytase activity may constitute an adaptive mechanism for N<sub>2</sub>-fixing legumes to tolerate P deficiency.

**Key words:** Cowpea, rhizobia, symbiosis, phytase, P deficiency