

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
*République Algérienne Démocratique et Populaire*

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

المدرسة الوطنية العليا للزراعة  
*Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie*



## **THESE**

*Pour obtenir le grade de Docteur en sciences agronomiques*  
*Spécialité : Biotechnologies végétales*

*LAZALI Mohamed*

---

*Etude des mécanismes agrophysiologiques et moléculaires d'adaptation*  
*à la déficience en phosphore chez la symbiose rhizobienne*  
*du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)*

---

*Soutenue le 13 Février 2014*

### **Jury**

**ABDELGUERFI Aïssa**

**ALKAMA Nora**

**ABROUS Ouzna**

**OUNANE Sidi Mohamed**

*Professeur, ENSA d'Alger*

*MCA, Université de Tizi Ouzou*

*Professeur, USTHB*

*Professeur, ENSA d'Alger*

*Président*

*Examinatrice*

*Examinatrice*

*Directeur de thèse*

---

## ❧ Avant-propos ❧

---

*Les travaux présentés dans cette thèse sont réalisés en partie au sein de l'UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des sols & Agro-écosystèmes (Eco&Sols) à l'INRA de Montpellier (France) et en partie au Laboratoire de Production Végétale à l'École Nationale Supérieure Agronomique d'Alger.*

*Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un Grand Projet Fédérateur FabaTropiMed (Services Ecologiques des Légumineuses pour les Cycles Biogéochimiques de N et P et la Séquestration du C dans des Systèmes de Culture Céréalière en Afrique Tropicale et dans le Bassin Méditerranéen) financé par Agropolis International sous la référence ID 1001-009.*

*L'objectif de FabaTropiMed est d'augmenter les services écologiques des légumineuses dans les systèmes céréaliers par une ingénierie de leurs interactions avec les organismes, micro et macro, des sols et le phosphore. Notre hypothèse est qu'un cycle vertueux de fertilité serait associé à des symbioses efficaces dans l'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique de l'azote, en association ou rotation avec des céréales. La perspective de FabaTropiMed consiste à limiter les conséquences néfastes sur l'air, l'eau et les sols, des agricultures céréaliers à fort intrants et à restaurer la fertilité des sols de celles à bas intrants. Elle s'inscrit dans un contexte sociétal de limitation des ressources planétaires en hydrocarbures et phosphore pour la production d'engrais minéraux, ainsi que des risques écologiques de leur production et utilisation. Il s'agit de promouvoir une gestion de la vie des sols par des innovations technologiques fondées sur la connaissance des interactions entre les racines et les organismes du sol. Le phosphore et l'eau sont des facteurs essentiels d'une telle intensification écologique car ils déterminent le fonctionnement des symbioses des légumineuses dans la majorité des sols d'Afrique inter-tropicale et du bassin Méditerranéen.*

---

## Remerciements

---

*Cette thèse a été pour moi une formidable expérience scientifique, professionnelle et humaine très enrichissante. C'est l'aboutissement de trois années de travail. Que toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail trouvent ici une juste reconnaissance.*

*Mes premiers remerciements s'adressent au Professeur Sidi Mohamed Ounane, mon directeur de thèse, pour la finesse de ses attitudes sur le plan aussi bien humain que scientifique. Il a toujours trouvé comme encadrant le juste équilibre entre la liberté qu'il m'a laissée dans le choix des grandes orientations et la détermination des pistes à suivre, d'une part, et un soutien total et sans faille dans les moments délicats, d'autre part. De lui, j'ai toujours reçu non seulement les encouragements que le doctorant ait tant besoin, mais aussi les précieux conseils pratiques que seul un homme, ayant des qualités humaines comme lui, peut amener à prodiguer. Grâce à son approche respectueuse de la personne humaine, je me suis continuellement senti à l'aise. Je lui en suis infiniment gré.*

*Je tiens à remercier Jean-Jacques Drevon directeur de recherches à l'INRA de Montpellier d'avoir accepté de m'accueillir au sein de UMR Eco&Sols et pour avoir co-encadré cette thèse. Je le remercie aussi pour ses orientations, ses conseils constructifs, ses nombreuses corrections, et toute la confiance qu'il a pu me témoigner tout au long de mon apprentissage dans la recherche.*

*Je voudrai ensuite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Aïssa Abdelguerfi, Professeur à l'ENSA d'Alger, d'avoir accepté de présider le jury ainsi que Nora Alkama, Maître de conférences à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et Ouzna Abrous, Professeur à l'USTHB, d'avoir accepté d'être les examinatrices de ma thèse et Lakhidar Khelifi, Professeur à l'ENSA d'Alger d'en être le rapporteur.*

*Merci à Jean Luc Chotte Directeur de l'UMR Eco&Sols qui continue à mettre son énergie à faire en sorte que les doctorants s'intègrent, se sentent écoutés et suivis, ingrédients indispensables à la vie d'un collectif.*

*Je souhaiterais également remercier tout le personnel de l'UMR Eco&Sols qui ont largement contribué à la réalisation de cette thèse. Merci à Hélène, Catherine, Josiane, Philippe, Didier, Jean Louis, Joëlle, Gabrielle, Nicole, Lucien, Michael, Barnard, Estelle, Gérard, Agnès, Farid, Michelle, Corine... Je remercie tout particulièrement Laurie pour sa précieuse assistance lors de*

*mon apprentissage aux techniques de biologie moléculaire. Merci aussi à tout le personnel du laboratoire de Production Végétale de l'ENSA d'Alger pour la bonne ambiance de travail.*

*Pendant ces trois années de thèse j'ai eu la chance de faire la connaissance de personnes de diverses origines avec qui j'ai pu échanger. Merci à tous les stagiaires, doctorants et post-doctorants que j'ai côtoyé et avec qui j'ai passé de bons moments. Au travers ce manuscrit je souhaite vous exprimer toute ma gratitude et vous adresser tous mes meilleurs vœux de réussite.*

*Merci à Adnane, Hesham, Rym, Chahinez, Hatem, Georg, Patrice, Amalia, Christian, Marek, Adeline, Odile, Brice, Tang, Gaëlle, Kittima, Wissem, Alaaeddine, Samir et tous les autres pour vos encouragements et soutien moral.*

*Je souhaite aussi remercier l'ensemble des chercheurs du projet FabaTropiMed avec qui j'ai eu des échanges très constructifs : Dr. Marc Pansu, Dr. Didier Blavet, Dr. Claire Marsden, Dr. Claude Plassard, Dr. Frédéric Gérard, Dr. Valérie Lullien-Pellerin, Dr. Zaman-Allah Mainassara, Dr. Matthew Blair, Dr. Gomaz Louis et Pr. Cherki Ghoulam. Je profite de cette occasion pour remercier FabaTropiMed qui a contribué en partie au financement de cette thèse.*

*J'exprime mes sincères remerciements aux agriculteurs de la région de Sétif qui nous ont cédé des parcelles et aidé à réaliser nos essais multi-locaux. Que ces gens généraux soient assurés de ma profonde gratitude et ma reconnaissance les plus respectueuses.*

*C'est aussi plus qu'un devoir pour moi de reconnaître que j'ai pu bénéficier de l'Université de Khemis Miliana, mon port d'attache de plusieurs avantages, qui m'ont permis d'aboutir à la finalisation de ma thèse, et surtout des 18 mois de détachement à l'INRA de Montpellier. Que tous les responsables et le personnel administratif de l'université de Khemis Miliana trouvent ici ma reconnaissance et ma gratitude.*

*J'espère que les étudiants que j'ai encadrés ou que j'encadre actuellement me pardonnent mes nombreux sauts d'humeur. Qu'ils sachent sincèrement que leurs intérêts sont toujours en jeu lorsqu'il m'arrive de m'emporter.*

*J'ai gardé le meilleur pour la fin... alors cette partie est consacrée aux membres de ma famille. Un énorme merci à mes parents sans qui je ne serai pas arrivé à ce stade de mes études. Ils m'ont toujours soutenu et poussé à aller de l'avant, à suivre le chemin de mes passions et à*

*persévérer. Ils ont partagé et supporté mes humeurs en veillant toujours à me reconforter. Je les remercie infiniment pour tous leurs encouragements, leur patience et leur amour même si je ne pourrai jamais les remercier à la hauteur de ce qu'ils m'ont apporté.*

*J'ai une pensée très tendre à l'égard de mon frère et mes sœurs pour leurs aides et leurs soutiens. Que ces modestes lignes leur servent de témoignage à mon attachement indéfectible au lien sacré de la famille.*

*Je dédicace cette thèse à ma chère Samoura, ma fiancée et futur épouse qui constitue ma richesse de cette terre. Merci Samoura pour ton soutien affectueux, ta compréhension, ta patience et ton indulgence. Sans toi, je n'aurai jamais eu le courage d'aller jusqu'au bout. Tu es le meilleur cadeau que Allah puisse m'offrir.*

*En fin, merci à tous ceux qui ont rendu possible ce travail, et même s'ils ne se retrouvent pas dans cette petite liste, ils sont dans mes pensées.*



*Etude des mécanismes agrophysiologiques et moléculaires d'adaptation à la déficience en phosphore chez la symbiose rhizobienne du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)*

## **Résumé**

La faible disponibilité des sols en phosphore (P) est l'un des facteurs limitant la production des légumineuses fixatrices de N<sub>2</sub>, en particulier dans les zones méditerranéennes. Le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), est considéré comme un mauvais fixateur d'azote et apparu plus exigeant en P que les autres légumineuses. Les réponses de la symbiose haricot-rhizobia à la déficience en P sont étudiées à travers des essais sous serre en culture hydroaéroponique et aux champs avec la participation des agriculteurs de la région de Sétif.

Les résultats en culture hydroaéroponique montrent que la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> (FSN) est un processus sensible à la déficience en P. Il est influencé par la nodulation, la respiration nodulaire et l'allocation en P inorganique (Pi) particulièrement nodulaire. La forte teneur nodulaire en Pi accumulée sous déficit en P est corrélée avec l'augmentation de la conductance nodulaire à la diffusion de l'O<sub>2</sub> et qui intervient dans la régulation de la FSN. Les activités phytase et phosphatase ainsi que leurs expressions dans les nodosités et graines en germination sont fortement stimulées dans les lignées tolérantes par rapport aux lignées sensibles. Ces enzymes sont impliquées dans l'efficacité d'utilisation du P (EUP) pour la FSN et pourraient constituer un mécanisme d'adaptation de ces lignées à la déficience en P. L'analyse de la séquence phytase (ADNc) des nodosités avec celle des graines révèle que ces séquences appartiennent à deux classes de phytases différentes.

Les essais dans les champs des agriculteurs montrent que les génotypes testés présentent différents niveaux de tolérances aux conditions édapho-climatiques notamment la faible disponibilité de leur sol en P. Ces différences génotypiques sont expliquées par des différences d'EUP, qui ouvre la voie d'une sélection orientée vers une meilleure gestion des intrants dans l'agriculture. Ainsi, les génotypes les plus efficaces ont, en plus de leur biomasse importante, les meilleures efficacités d'utilisation de la symbiose rhizobienne. La compréhension des mécanismes d'adaptation à la déficience en P serait d'une grande utilité pour l'amélioration de la productivité et l'identification des symbioses efficaces.

**Mots clés:** Nodulation, haricot, déficience en phosphore, phosphatase, phytase, fixation de N<sub>2</sub>, respiration nodulaire, symbiose.

*Study of agrophysiological and molecular mechanisms of adaptation to phosphorus deficiency in Phaseolus vulgaris-rhizobia symbiosis*

**Abstract**

The low availability of soil phosphorus (P) is one of the factors limiting the production of N<sub>2</sub>-fixing legumes, particularly in Mediterranean areas. The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is considered a species with low N<sub>2</sub> fixation and required more P than other grain legumes. The responses of the common bean-rhizobia symbiosis to P deficiency are studied through tests in glass houses in hydroaerobic culture and fields with participatory farmers in the region of Setif.

Results of hydroaerobic culture showed that the symbiotic N<sub>2</sub> fixation (SNF) is a sensitive physiological process to P deficiency and appears to be influenced by nodulation, nodule respiration and the inorganic P (Pi) allocation. The high of Pi content accumulated in nodules under P deficiency is correlated with the increase of nodule conductance to O<sub>2</sub> diffusion and therefore is involved in the regulation of SNF. In addition, the phytase and phosphatase activities as well as their expressions in nodules and germinating seeds are strongly stimulated in tolerant lines compared to sensitive ones. These enzymes are shown involved in the efficiency in use of P (PUE) for SNF and could provide a mechanism for tolerance of these lines to P deficiency. Thus, the sequence analysis of nodule cDNA phytase with germinated seeds cDNA phytase reveals that these sequences belonging to two different classes of phytases.

Furthermore, the rhizobial symbioses tested in farmers' fields showed different levels in their tolerance to environmental conditions, especially the low availability of their soil in P. This variability is largely due to differences in PUE, which leads to a selection oriented towards a more efficient use of input in agriculture. Thus, the most efficient genotypes in addition to their high biomass have the better efficiency in use of the rhizobial symbiosis. Understanding the mechanisms of the tolerance to P deficiency would be very useful for improving the productivity and identifying efficient symbioses.

**Keywords:** Nodulation, common bean, phosphorus deficiency, phosphatase, phytase, N<sub>2</sub> fixation, nodule respiration, symbiosis.

دراسة آليات التكيف الفيزيولوجية و الجزيئية لنقص الفسفور لدى التعايش البكتيري عند الفاصولياء  
(*Phaseolus vulgaris* L.)

## ملخص

تعتبر نقص كمية الفسفور في التربة من بين العوامل الأساسية المحددة لإنتاج البقوليات المثبتة للأزوت الجوي، خاصة في مناطق البحر الأبيض المتوسط. تعتبر الفاصولياء مثبت ضعيف للأزوت الجوي كما تبدو أكثر احتياجا للفسفور مقارنة بالبقوليات الأخرى. تمت دراسة استجابة التعايش البكتيري عند بعض أنواع نبات الفاصولياء لنقص الفسفور من خلال مجموعة من التجارب تحت البيوت الزجاجية وفي الحقل بمشاركة مجموعة من فلاحي ولاية سطيف.

أظهرت نتائج الزراعة المائية أن تثبيت التعايشي للأزوت الجوي آلية فيزيولوجية حساسة لنقص الفسفور وتتأثر بشدة على مستوى تكوين العقد الجذرية وتنفسها وتوزيع الفسفور بها وذلك بدرجات متفاوتة بين أصناف الفاصولياء المدروسة. إن محتوى العقد الجذرية المرتفع من الفسفور اللاعضوي لأصناف الفاصولياء المقاومة لنقص الفسفور في الوسط المائي مرتبط بارتفاع الناقلية العقدية لنشر الأكسجين و بالتالي فهو يساهم في تنظيم عملية تثبيت الأزوت الجوي. من جهة أخرى، إن إفراز الأنزيمات *phytase* و *phosphatase* وتعبيرها في العقد الجذرية والبذور محفزة بقوة في أصناف الفاصولياء المتحملة لنقص الفوسفور مقارنة بالأصناف الحساسة. حيث أن إفراز هذه الإنزيمات يلعب دور فعال في استغلال الفسفور من أجل تثبيت الأزوت الجوي، كما يمكن أن يشكل آلية لمقاومة نقص الفسفور.

نتائج دراسة التعايش البكتيري المختبر في حقل المزارعين أظهرت مستويات مختلفة في تحمله لظروف الوسط و خاصة نقص مستوى الفسفور في التربة، كذلك الأصناف الأكثر فاعلية تملك بالإضافة لأكثر كتلة حيوية، أفضل قدرة على استغلال التعايش. إن فهم آليات التكيف لنقص الفسفور لدى التعايش عند الفاصولياء، يساهم في تحسين إنتاجيته و يسمح بإنتقاء أصناف أكثر مقاومة.

**الكلمات المفتاحية:** تشكيل العقد، الفاصولياء، نقص الفسفور، *phosphatase*، *phytase*، تثبيت الأزوت، تنفس عقدي، التعايش.

---

## *Liste des abréviations*

---

<b>APase</b>	Phosphatase acide
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Ssearch Tool
<b>CIAT</b>	Centre International d'Agriculture Tropicale
<b>CONR</b>	Consommation d'Oxygène des Racines Nodulées
<b>DEPC</b>	L'eau traitée au Di-Ethyl Pyro-Carbonate
<b>Dj</b>	Djadida
<b>dNTP</b>	Désoxy Nucléotide Tri Phosphate
<b>EAC</b>	Exploitations Agricoles Collectives
<b>EAI</b>	Exploitations Agricoles Individuelles
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra Acétate
<b>ELF</b>	Enzyme-Labeled Fluorescent
<b>EP</b>	Exploitations Privées
<b>EUP</b>	Efficacité d'Utilisation du Phosphore
<b>EUSR</b>	Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne
<b>FBPase</b>	Fructose 1,6 bisphosphatase
<b>FP</b>	Fermes Pilotes
<b>FSN</b>	Fixation Symbiotique d'Azote
<b>Km</b>	Constante de Michaelis
<b>MF</b>	Matière Fraiche
<b>MSa</b>	Matière Sèche aérienne
<b>MSn</b>	Matière Sèche nodulaire
<b>N</b>	Azote
<b>NCBI</b>	National Center of Biotechnology Information
<b>P</b>	Phosphore
<b>PBS</b>	Phosphate-Suffered saline
<b>Pi</b>	Phosphore Inorganique
<b>PNP</b>	Para-Nitrophénol
<b>pNPP</b>	p-nitrophenyl phosphate
<b>PO<sub>2</sub></b>	Pression d'Oxygène
<b>RILs</b>	Lignées Recombinantes Contrastantes
<b>SAU</b>	Surface Agricole Utile
<b>TAE</b>	Tris Acétate EDTA
<b>TCA</b>	Acide Trichloro-Acétique
<b>Vm</b>	Vitesse maximale

---

## *Table des matières*

---

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Importance des légumineuses alimentaires.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Le haricot commun (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....</b>	<b>6</b>
2.1. Origine et extension de la culture .....	6
2.2. Diversité génétique.....	7
2.3. Domestication du haricot.....	9
2.4. Description morphologique et botanique.....	10
2.5. Nutrition azotée du haricot .....	11
2.6. Importance économique du haricot .....	12
<b>3. Fixation symbiotique d'azote chez le haricot.....</b>	<b>13</b>
3.1. Etablissement de la symbiose fixatrice d'azote .....	13
3.1.1. Processus d'infection et de nodulation.....	14
3.1.2. Initiation et développement nodulaire.....	17
3.2. Structure des nodosités .....	18
3.3. Fonctionnement des nodosités.....	20
3.4. Rhizobia associés au haricot.....	22
<b>4. Importance du phosphore dans la nutrition de la symbiose rhizobienne .....</b>	<b>23</b>
4.1. Phosphore dans le sol .....	23
4.2. Mécanismes d'acquisition de phosphore .....	24
4.3. Déficience des sols en phosphore et conséquences sur la symbiose rhizobienne.....	26
4.4. Mécanismes de réponses à la déficience en phosphore .....	28
4.4.1. Morphologie et le dynamisme du système racinaire .....	29
4.4.2. Exsudats racinaires.....	33
4.4.3. Sécrétion des phosphatases et phytases.....	34
4.4.4. Expression accrue des transporteurs de Pi à haute affinité.....	35
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre II : Rôle des phytases dans l'ajustement de la perméabilité nodulaire à l'oxygène chez la symbiose haricot-rhizobia sous déficience en phosphore.....</b>	<b>38</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>38</b>
<b>2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>40</b>
2.1. Culture de la symbiose rhizobienne.....	40
2.2. Consommation nodulaire en oxygène .....	41
2.3. Mesure de l'activité phytase .....	42
2.4. Détermination de la biomasse aérienne, racinaire et nodulaire .....	43
2.5. Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne .....	43
2.6. Analyse statistique.....	43

<b>3. Résultats</b> .....	<b>44</b>
3.1. Activité phytase et concentration en P assimilable dans les nodosités .....	44
3.2. Consommation et perméabilité nodulaire à l'oxygène .....	45
3.3. Conductance nodulaire à la diffusion de l'oxygène.....	47
3.4. Relation entre l'activité phytase et perméabilité nodulaire à l'oxygène .....	48
3.5. Croissance des plantes et nodulation .....	49
3.3. Efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne .....	51
<b>4. Discussion</b> .....	<b>52</b>
<b>5. Conclusion</b> .....	<b>54</b>

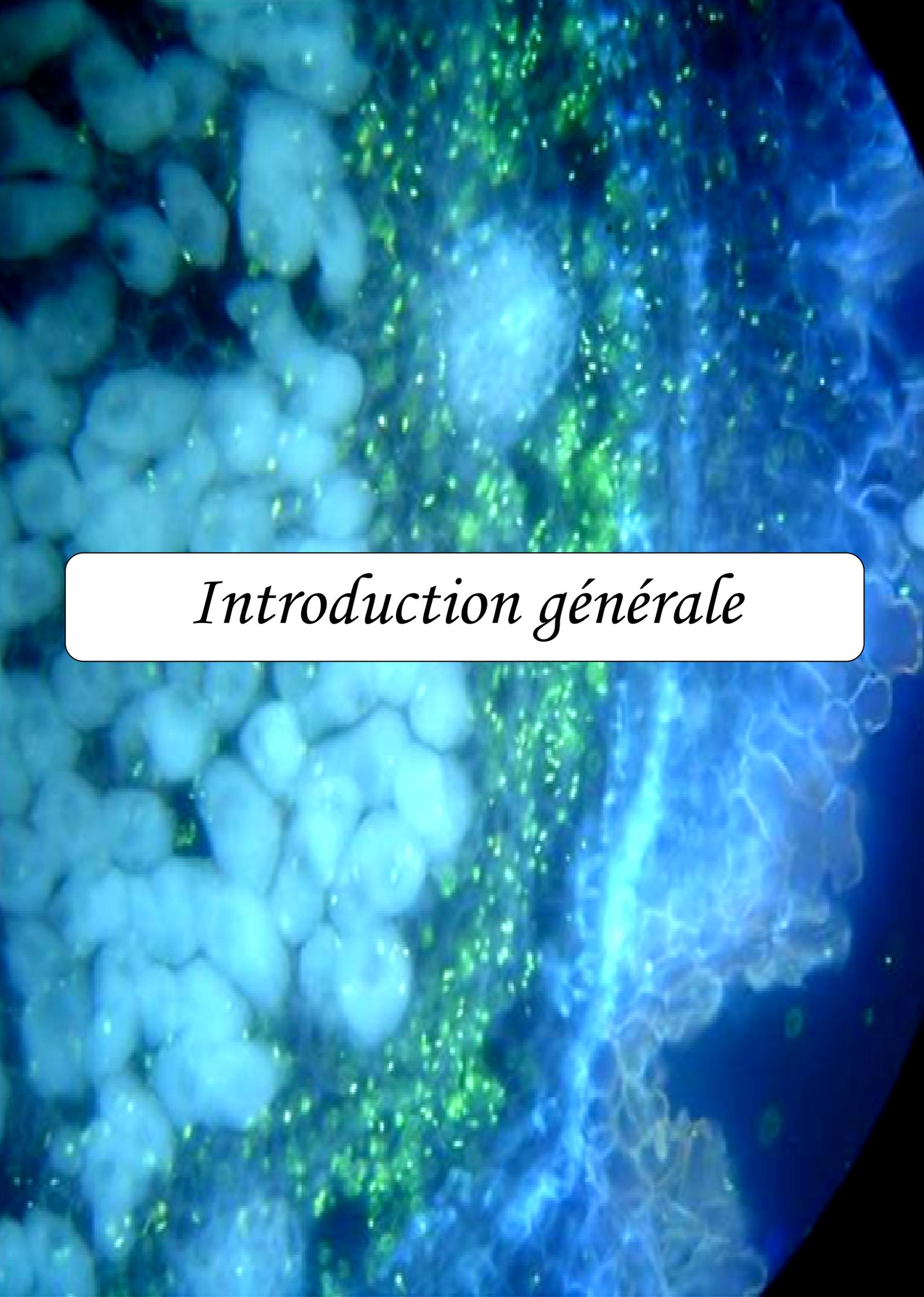
### **Chapitre III : Localisation de l'expression des phytases dans les graines en germination et nodosités de la symbiose haricot-rhizobia..... 56**

<b>1. Introduction</b> .....	<b>56</b>
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	<b>57</b>
2.1. Matériel végétal et conduite des cultures.....	57
2.2. Extraction des acides nucléiques et vérification des séquences amplifiées .....	57
2.3. Hybridation in situ du transcrit de phytase .....	58
2.4. Mesure de l'activité phytase .....	59
2.5. Détermination des constantes $K_m$ et $V_m$ de phytase.....	59
2.6. Teneur des nodulaire et graines en phosphore.....	60
3.7. Analyse statistique.....	60
<b>3. Résultats</b> .....	<b>60</b>
3.1. Localisation de l'expression de la phytase au niveau des nodosités.....	60
3.2. Localisation de l'expression de la phytase au niveau des graines en germination .....	61
3.3. Activité phytase des nodosités.....	62
3.3. Activité phytase des graines .....	63
3.4. Propriétés catalytiques de la phytase .....	64
3.5. Analyse des séquences de la phytase.....	65
<b>4. Discussion</b> .....	<b>67</b>
<b>5. Conclusion</b> .....	<b>70</b>

### **Chapitre IV : Efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique d'azote chez la symbiose haricot-rhizobia ..... 73**

<b>1. Introduction</b> .....	<b>73</b>
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	<b>74</b>
2.1. Culture des plantes en hydroaéroponie.....	74
2.2. Mesure de l'activité FBPase et phosphatase.....	74
2.3. Récolte des plantes et détermination des biomasses.....	75
2.4. Dosage de la l'azote total et l'enrichissement en $^{15}\text{N}$ .....	76
2.5. Estimation de la quantité de $\text{N}_2$ fixée .....	76

3.6. Analyse statistique.....	76
<b>3. Résultats .....</b>	<b>77</b>
3.1. Efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne .....	77
3.2. Activités FBPase et phosphatase .....	79
3.3. Teneur des nodosités en P et efficacité de son utilisation pour la FSN .....	81
3.3. Rôle de FBPase dans l'efficacité d'utilisation du P pour la FSN .....	82
3.4. Fixation symbiotique de N <sub>2</sub> et discrimination contre le <sup>15</sup> N .....	83
<b>4. Discussion .....</b>	<b>84</b>
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>87</b>
<b>Chapitre V : Enquête sur la nodulation du haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) dans l'agro- écosystème de Sétif .....</b>	
<b>90</b>	
<b>1. Introduction .....</b>	<b>90</b>
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>92</b>
2.1. Matériel végétal .....	92
2.2. Tests multiloceaux .....	93
2.3. Analyses physico-chimiques des sols.....	94
2.4. Echantillonnages des plants et paramètres analysés .....	95
2.5. Efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne .....	95
2.6. Analyse statistique.....	95
<b>3. Résultats .....</b>	<b>96</b>
3.1. Caractérisation physico-chimique des sols.....	96
3.2. Teneurs en P assimilable des sols.....	98
3.3. Nodulation.....	99
3.4. Croissance des plantes.....	100
3.5. Corrélation entre la biodisponibilité du P dans le sol et la nodulation des plantes .....	101
3.6. Efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne .....	103
<b>4. Discussion .....</b>	<b>105</b>
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>108</b>
<b>Discussion, conclusion générale &amp; perspectives .....</b>	
<b>110</b>	
<b>Références bibliographiques .....</b>	
<b>115</b>	
<b>Annexes .....</b>	
<b>141</b>	



*Introduction générale*

---

## *Introduction générale*

---

Par leur capacité à fixer l'azote de l'air, les légumineuses constituent une voie privilégiée d'introduction de l'azote dans les systèmes de culture. Leur autonomie vis-à-vis de cet élément permet, en réduisant l'utilisation des engrais azotés dans les systèmes de culture, de limiter ainsi les impacts environnementaux directement proportionnels à la quantité d'azote minéral fabriqué, transporté et épandu. L'introduction de légumineuses dans les systèmes de culture offre aussi d'autres atouts environnementaux tels que la réduction des maladies telluriques (Colbach et al., 1996) et les infestations d'adventices (Chauvel et al., 2001) grâce à la diversification des successions culturales. La symbiose légumineuses-rhizobia a joué un rôle déterminant dans le développement de la production agricole durable et sa compréhension a été perçue comme un grand événement scientifique. Elle est envisagée pour procurer des économies dans la pratique agricole et assurer des bénéfices écologiques à même de constituer une sorte d'alternative aux producteurs des pays en voie de développement souffrant d'un accès limité aux intrants chimiques.

Le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) est la légumineuse alimentaire la plus importante au monde de part sa richesse en protéines. C'est un aliment de base pour environ 500 millions d'êtres humains qui peut constituer une alternative aux protéines animales qui sont souvent inaccessibles pour une grande partie de la population. En Algérie, la culture du haricot ne représente qu'environ 1% des superficies agricoles utiles. De plus, la production est en régression suite à des rendements faibles et une production en constante régression. Plusieurs contraintes seraient responsables de cette situation, notamment la faible disponibilité en phosphore (P), en raison de sa précipitation dans les sols calcaires très fréquents dans le bassin méditerranéen et en Algérie. Cette déficience en P représente une contrainte majeure pour les légumineuses qui assurent leur nutrition azotée par la fixation de N<sub>2</sub>. En effet, dans ces conditions, la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> (FSN) est souvent inhibée chez le haricot et demeure la plus sensible à la déficience en P en comparaison avec d'autres symbioses rhizobiennes (Graham et Vance, 2003). De plus, les besoins en P pour la croissance de la plupart des légumineuses sont plus élevés en nutrition azotée symbiotique que nitrique ou ammoniacale (Darrah, 1993). Cette exigence est généralement attribuée au coût énergétique élevé de la FSN qui augmente lorsque la légumineuse nodulée est exposée à une déficience de P (Ribet et Drevon, 1995b). En réponse à la déficience en P, les plantes mettent en œuvre deux stratégies. La première consiste à développer un système d'acquisition plus efficace du P en augmentant la surface d'échange racinaire ou en secrétant des acides organiques et des phosphatases dont le rôle est de dissoudre le P insoluble du sol. Les phosphatases, un groupe

d'enzymes largement distribuées chez les plantes et les microorganismes, sont capables d'hydrolyser une variété d'inositol phosphates. La seconde stratégie consiste à optimiser l'efficacité métabolique d'utilisation du P en produisant plus de biomasse ou en fixant plus de N par unité de P consommée.

L'utilisation des engrais phosphatés augmente significativement le coût de production, ainsi que les risques de pollution des ressources hydriques est relativement peu efficace puisqu'il est estimé que seulement 15 à 30% des apports réalisés sont absorbés par les plantes (Cordell et al., 2009). Cela est d'autant plus préjudiciable quand on sait que l'utilisation des engrais phosphatés est bien souvent à l'origine de problèmes de pollution graves tel que l'eutrophisation des rivières et des nappes phréatiques où s'accumule le phosphate lessivé des sols. Enfin, le plus important est que les engrais phosphatés sont issus de ressources minérales naturelles limitées. En effet, les réserves diminuent d'autant plus rapidement que les demandes mondiales en phosphate augmentent constamment. Un pic de production est attendu autour de 2030-2050, moment à partir duquel on estime que la production ne pourrait que diminuer (Gilbert, 2009). Les scientifiques parlent aujourd'hui de crise du P, crise malheureusement encore invisible pour la majorité des citoyens mais bien connue des agriculteurs et des biologistes du domaine végétal qui étudient de près les voies de régulation et les multiples mécanismes de réponse mis en place chez les plantes pour faire face aux conditions de carence phosphatée. Aujourd'hui ces processus commencent à être bien décryptés. Ils représentent des voies potentielles d'amélioration des conditions de culture des plantes, limitant l'utilisation d'intrants phosphatés.

Bien que le haricot soit une plante sensible à la déficience en P (Vance, 2001), la sélection de symbioses haricot-rhizobia tolérantes à la déficience en P resterait une voie très prometteuse pour améliorer la production de cette espèce sur des sols à faible disponibilité en P. En effet, la diversité génétique de cette espèce en Amérique latine a permis d'identifier avec le Centre International d'Agriculture Tropicale, des lignées recombinantes contrastantes à forte efficacité d'utilisation du P pour la FSN susceptibles d'être adaptées aux conditions méditerranéennes (Drevon et al., 2011). Ainsi, le travail que nous proposons de faire s'inscrit dans le contexte de la recherche des bases physiologiques et moléculaires d'adaptation de ces lignées à la déficience en P par l'évaluation de leur comportement sous cette contrainte à travers des essais sous serre et aux champs en adoptant une approche participative des agriculteurs de la région de Sétif. Ce travail nous permettra de vérifier la pertinence des critères d'adaptation de la symbiose haricot-rhizobia à la faible disponibilité de P et servira d'appui à la sélection de variétés locales de haricot plus performantes pour la FSN sous déficience en P. Les progrès dans cette approche

seront transférés à d'autres légumineuses comme la fève, la lentille et le pois-chiche qui sont importantes pour la sécurité alimentaire dans le bassin méditerranéen.

L'hypothèse de départ est qu'il existerait un lien étroit entre la nutrition phosphatée et la FSN dans le métabolisme énergétique intense des nodosités. Les lignées de haricot, sous fixation de  $N_2$ , du fait de la sécrétion des phosphatases et phytases contribuent-elles à mobiliser le P ? Existerait-il des différences entre les lignées de haricot pour l'efficacité d'utilisation du P pour la FSN ?

Le présent travail comporte cinq chapitres. Le premier chapitre rapporte une synthèse bibliographique sur la problématique de la faible disponibilité des sols en P et ses effets sur la croissance et le développement des plantes en général et de la symbiose haricot-rhizobia en particulier. Le deuxième chapitre traite le rôle de la phytase dans l'ajustement de la perméabilité nodulaire à la diffusion de l'oxygène sous conditions de déficience en P. Le troisième chapitre porte sur la localisation histologique de la phytase sur des coupes nodulaires de haricot cultivé sous déficit en P afin de comprendre son rôle dans l'adaptation de la symbiose à cette contrainte. Ensuite, le quatrième chapitre est consacré à l'étude de la déficience en P sur l'induction des phosphatases nodulaires en vue de comprendre leur contribution dans l'efficacité d'utilisation du P pour la FSN. L'évaluation d'adaptation de plusieurs génotypes de haricot à la déficience en P à l'aide d'un diagnostic nodulaire dans un agro-écosystème de référence constitue le cinquième chapitre.



*Chapitre I*

*Synthèse bibliographique*

## **1. Importance des légumineuses alimentaires**

Les légumineuses alimentaires constituent une composante essentielle pour la nutrition humaine et animale ainsi que pour le maintien des systèmes de production dans les zones arides et semi arides. Elles représentent une famille d'une grande importance économique et occupent le second rang après les céréales comme culture alimentaire dans le monde (Rochester et al., 2001). Leur intérêt réside dans leur richesse en protéines de qualité, et constituent en association avec les céréales, la base de l'alimentation de milliards de personnes et une source importante de fourrage et de produits naturels (Werner et Newton, 2005).

En Algérie, depuis la restructuration du secteur agricole et sa libéralisation en 1987, ces cultures ont connu des perturbations dont les conséquences se traduisent par une réduction de la superficie, une chute de la productivité et une marginalisation accentuée par le manque de soutien et d'encouragement à ce secteur jusqu'à l'avènement du plan national de développement agricole en 2000. En parallèle, les importations ne cessent d'augmenter pour satisfaire les besoins de plus en plus croissants de la consommation humaine en mettant ainsi notre dépendance vis-à-vis de l'extérieur pour notre approvisionnement.

Les légumineuses alimentaires sont cultivées sur l'ensemble des zones agro-écologiques d'Algérie. En effet, de la zone littorale jusqu'aux hauts-plateaux, on peut trouver l'ensemble des espèces telles que la fève et la féverole, le pois chiche, le pois, le haricot ainsi que la lentille. En ce qui concerne la fève, elle est principalement cultivée dans les zones littorales et sub-littorales et à l'Ouest, dans les Wilyas de Tlemcen, Mascara, Relizane, Ain-Temouchent, Sidi-Bel-Abbès, Mostaganem et Chlef, et à l'Est à Skikda, Bejaia et Guelma. On la cultive aussi dans la région de Biskra.

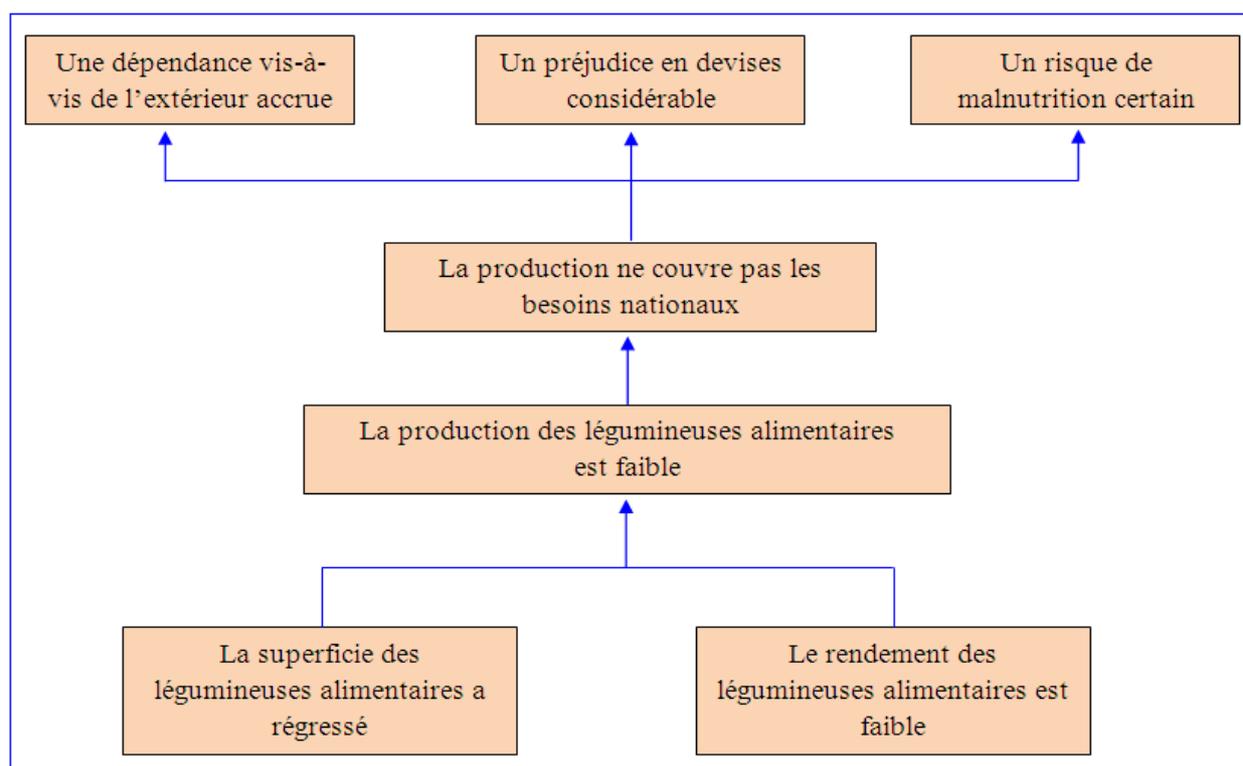
Le pois chiche est situé aussi dans les zones littorales et les plaines intérieures. Du côté Ouest, cette espèce est cultivée à Ain Temouchent, Tlemcen et Sidi-Bel-Abbès. Alors qu'à l'Est, nous la trouvons à Skikda, Guelma (littoral et sub-littoral) et Mila (plaines intérieures). Ce sont les deux zones les plus importantes de culture de pois chiche. Quant à la lentille, elle est peu cultivée. Les principales zones de culture sont les hauts-plateaux (Tiaret, Saida et Sétif) et les plaines intérieures (Bouira, Médéa et Mila). Mais la région du Sersou (Tiaret) reste la principale région connue pour la culture de la lentille. Le haricot sec est très peu cultivé en Algérie, avec seulement 1200 ha durant l'année 2011 soit 2% des superficies réservées à la production des légumes secs (MADR, 2013). Les zones de production du haricot sont situées essentiellement sur le littoral et le sublittoral.

La mauvaise répartition des précipitations dans l'espace et dans le temps représente le principal facteur limitant la production des légumineuses alimentaires conduites en culture pluviale. En année sèche, des surfaces considérables sont déclarées non productives, ce qui provoque des fluctuations inter-annuelles des surfaces emblavées. Cette situation rend, dans certains cas, les agriculteurs hostiles à l'introduction des légumineuses alimentaires dans leur assolement.

**Tableau I.1.** Evolution des superficies, des productions et des rendements des légumineuses alimentaires durant la période 2000-2011 (FAO, 2013).

Périodes Espèces	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<b>Superficie (ha)</b>												
Lentille	690	920	920	840	862	1 090	1 218	873	1 369	2 588	4 230	6900
Pois-chiche	19 480	19 290	19 330	22 850	23 079	23 348	21 252	20 681	20 361	22 274	25 520	32 000
Fève	34 250	31 450	33 610	34 050	36 777	35 082	33 537	31 284	30 688	32 278	34 210	34 500
Pois sec	7 170	6 570	7 070	8 680	9 328	8 299	9 157	9 184	7 556	8 487	8 860	9 200
Haricot sec	1 280	1 180	1 190	1 560	1 992	1 206	1 496	1 394	1 040	1 616	1 210	1 200
<b>Production (T)</b>												
Lentille	194	458	435	490	613	423	654	561	1 081	2 693	4 590	7 000
Pois-chiche	6 661	12 312	14 971	19 102	16 367	13 727	12 706	14 294	11 211	17 840	23 470	29 000
Fève	12 895	21 230	22 933	30 700	32 053	26 886	24 298	27 974	23 521	36 495	36 620	37 000
Pois sec	1 593	3 674	4 304	6 342	7 371	5 339	5 381	6 243	3 618	5 969	6 610	7 300
Haricot sec	419	734	864	1 096	1 581	666	915	917	544	1 159	840	800
<b>Rendement (q/ha)</b>												
Lentille	2.18	4.97	4.72	5.83	7.11	3.88	5.36	6.42	7.89	10.40	10.85	10.14
Pois-chiche	3.41	6.38	7.74	8.36	7.09	5.87	5.97	6.91	5.50	8.00	9.19	9.09
Fève	3.76	6.75	6.82	9.01	8.71	7.66	7.24	8.94	7.66	11.30	10.70	10.72
Pois sec	2.22	5.59	6.08	7.30	7.90	6.43	5.87	6.79	4.78	7.03	7.46	7.93
Haricot sec	3.27	6.22	7.26	7.02	7.93	5.52	6.11	6.57	5.23	7.17	6.94	6.66

La culture des légumineuses alimentaires en Algérie est soumise à un certain nombre de contraintes tant techniques et économiques qu'organisationnelles qui limitent sa production, son développement et son extension.



**Figure I.1.** Les conséquences de faible rendement des légumineuses alimentaires en Algérie.

## 2. Le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.)

La famille des Leguminosae a une distribution mondiale estimée entre 18 000 et 20 000 espèces réparties dans environ 750 genres. Les taxonomistes, sur la base de différences florales, ont divisé cette famille en trois sous familles distinctes, les Mimosacées, les Caesalpinacées et les Papilionacées.

### 2.1. Origine et extension de la culture

Le haricot est originaire d'Amérique latine et centrale où il a été domestiqué depuis plus de 8000 ans, (Gepts et Debouck, 1991). La distribution géographique du haricot dans des zones très diversifiées, tant du point de vue climatique que du point de vue pédoclimatique, ont font une culture adéquate pour des systèmes agro-cultureaux très variés. En effet, il peut être cultivé en grande culture, sans limitation en intrants dans les grandes plaines du Minnesota aux USA ou celles de l'Alberta au Canada, mais aussi dans la province du Goianã au Brésil ou en Argentine. On le trouve aussi dans les assolements de systèmes vivriers, extensifs ou non, des zones d'agriculture marginales au Costa Rica, ou cultivé en association avec d'autres cultures telle que le maïs comme au Rwanda ou dans certaines zones Andines (Woolley et Davis, 1991) ou encore en rotation avec d'autres cultures non légumineuses (maïs, patate douce) comme à Cuba. Les

navigateurs européens, surtout espagnols et portugais, répandirent la culture du haricot en Afrique, en Europe et en Asie (Polèse, 2006).

La teneur en protéines du haricot est cependant bien inférieure aux 40-45% du soja, ce qui limite sa rentabilité par une éventuelle utilisation dans l'industrie des protéagineux selon les critères de rentabilité actuels (Broughton et al., 2003). De plus les rendements du haricot sont souvent faibles par rapport à ceux du soja. C'est pourquoi on retrouve fréquemment la culture de haricot dans des zones agricoles relativement défavorisées, comme au Mexique (Singh, 1991). Pour son importance diététique, pour satisfaire les populations qui en dépendent, il est donc important d'améliorer les rendements du haricot, et notamment dans les conditions défavorables.

## 2.2. Diversité génétique

Le genre *Phaseolus* appartient à la sous tribu des Phaseolinae, elle-même incluse dans la tribu des Phaseoleae. Celles-ci font partie de la sous-famille des Papillonacées qui appartiennent à la grande famille des Léguminosae. Le genre *Phaseolus* renferme environ 55 espèces (Debouck, 1991).

La compréhension de l'organisation taxonomique de la sous tribu des Phaseolinae et du genre *Phaseolus* a des implications importantes dans l'utilisation pratique, ce que le concept de pool génétique nous permet de mieux comprendre (Harlan et de Wet, 1971). On entend par pool génétique primaire un ensemble de génotypes cultivés ou sauvages d'une même espèce, au sein de laquelle il existe normalement un échange libre de gènes. Une autre espèce relativement apparentée représentera un pool génétique secondaire tandis qu'une troisième moins apparentée représentera un pool génétique tertiaire. Le choix entre primaire, secondaire et tertiaire dépend des trois critères suivant : (i) possibilité de croisement ; (ii) viabilité du croisement ; (iii) fertilité du croisement. Concrètement, tout améliorateur d'une espèce désireux d'utiliser des aptitudes intéressantes dans telle ou telle autre espèce devra en premier lieu vérifier la distance génétique de l'espèce à améliorer. Ainsi, les espèces *Phaseolus coccineus* et *Phaseolus polyanthus* pourraient servir de pool génétique secondaire à *Phaseolus vulgaris*, tandis que *Phaseolus acutifolius* serait un pool tertiaire. *Phaseolus lunatus* semble être le plus éloigné de *vulgaris*.

Il apparaît des différences et un certain degré d'insuccès dans les croisements entre les formes sauvages de l'Amérique du sud et celles d'Amérique centrale. En outre il existerait des différences entre les formes de Colombie et respectivement celles du Mexique et de l'Argentine. L'organisation de l'espèce *P. vulgaris* est donc complexe et actuellement basée sur l'origine géographique. Ces faits marquants suggèrent que le haricot cultivé actuellement résulte de

domestications indépendantes depuis plusieurs populations sauvages, résultants en plusieurs pools génétiques primaires pour les variétés cultivées. Ceci expliquerait la fréquente faiblesse des hybrides F1 dans les croisements entre génotypes cultivés d'origine Andine et Méso-américaine. Les études morphologiques et biochimiques, notamment par analyse du profil électrophorétique des phaséolines qui constituent l'essentiel des protéines et réserves de la graine, confirment l'existence de trois pools génétiques principaux : (i) un pool Andin, caractérisé par les phaséolines T et de grosses graines, s'étendant depuis l'Argentine jusqu'à l'Equateur (ii) un pool Méso-américain, caractérisé par les phaséolines S et des petites graines couvrant l'ensemble de l'Amérique centrale depuis le Panama jusqu'au Nord du Mexique (iii) un pool intermédiaire entre les deux autres situé en Colombie et jusqu'à récemment assimilé au pool Andin.

L'étude des phaséolines et de la morphologie des graines permet ainsi d'étudier l'origine des haricots que l'on trouve maintenant disséminés dans les zones sud américaines plus basses comme le Brésil ou en dehors du continent comme en Europe et Afrique. Dans le premier cas, le haricot serait originaire du pool Méso-américain et aurait pu cheminer par le Venezuela. Les haricots cultivés en Afrique seraient d'origine Andine, ayant cheminé directement ou indirectement via l'Europe au cours de la période coloniale.

On distingue aussi les variétés sauvages et les variétés cultivées, qui diffèrent notamment pour deux caractéristiques, à fort déterminisme phénotypique : (i) les haricots cultivés manifestent une grande diversité d'habitus de croissance, de tailles et couleurs de graines alors que les sauvages sont tous les grimpants typiques dont les graines sont toujours très petites ; (ii) dans une même zone géographique les génotypes sauvages montrent une grande diversité de phaséolines, alors que les génotypes cultivés d'un même centre d'origine ont le même profil. Pourtant, peu de gènes seraient impliqués dans ces différences selon Gepts et Debouck (1991) et auraient eu principalement un déterminisme anthropique. Le génome des variétés cultivées et sauvages aurait évolué dans le même sens faisant partie d'une même entité taxonomique, ne justifiant pas leur différenciation en espèces. Notamment, on retrouve à la fois chez des génotypes cultivés et sauvages certaines incompatibilités génétiques entre Andins et Méso-américains, ce qui suggère que les différences entre pools génétiques auraient été maintenues chez les variétés domestiquées et sauvages. L'ensemble de ces faits appuie l'hypothèse selon laquelle la domestication aurait pu s'effectuer à partir d'une seule population sauvage, à l'intérieur d'un même centre d'origine. Ce phénomène a pu causer un goulot d'étranglement pour la variabilité génétique du haricot, ce qui

suggère l'importance du génome sauvage de *P. vulgaris* pour compléter la base génétique vraisemblablement étroite de *P. vulgaris* cultivé actuel.

On classe les variétés du haricot en quatre groupes selon leur type de croissance, qui dépend notamment de la caractéristique du bourgeon terminal. Le type I, est déterminé, c'est-à-dire que la croissance du bourgeon terminal reproductif est déterminée. Même si au sens strict, on ne peut pas parler de croissance déterminée du bourgeon terminal chez le haricot, sa croissance est de type buissonnant avec une ramification importante. Les types II et III sont eux aussi à port buissonnant mais le bourgeon terminal est végétatif et sa croissance est indéterminée. Le type IV a également un bourgeon terminal végétatif à croissance indéterminée mais à port grimpant typique sans ramification. C'est la forme de croissance la plus proche du phénotype sauvage.

Approximativement 500 variétés de haricot sont connues. Cette liste n'est pas exhaustive. Singh (1991) a regroupé, sur la base des caractéristiques allozymes et de la teneur en protéine des graines, 76 accessions de haricot de l'Amérique latine (Andes) et du Mésoamérique en neuf groupes. Plus récemment, Tohme et al. (1996) utilisant la technique de l'amplification aléatoire de fragments de restriction (AFLP), ont distingué 16 groupes dans les accessions sauvages du Mésoamérique, de la Colombie et de la région sud des Andes. Une collection mondiale comprenant plus de 40000 accessions existe au Centre International de l'Agriculture Tropical (CIAT) en Colombie.

### **2.3. Domestication du haricot**

Dans l'étude de la diversité du haricot, les données archéologiques sont d'une importance capitale, puisque le haricot domestiqué actuel a résulté de sa lente interaction avec l'homme. La domestication a dépendu des critères retenus par les paysans pour le choix des graines. La déhiscence des gousses de haricot sauvage a dû être l'un des premiers caractères indésirables éliminés. La taille des graines a probablement été un autre critère important. En particulier, les génotypes à larges graines ont pu être retenus pour leurs réserves plus importantes, nécessaire pour une germination plus lente en climat plus frais, comme c'est le cas en certaines parties des Andes. Certains critères organoleptiques ont aussi pu jouer. La durée pour parvenir à maturation a une importance déterminante pour la fixation d'azote, a été vraisemblablement prise en compte, dans un souci précoce d'harmoniser les récoltes. En particulier, la réduction du cycle de croissance et de la morphologie pour des raisons de récolte ou de compétition pour la lumière en culture associée seraient à l'origine des types déterminés actuels. L'apparition de la cuisson a permis l'emploi des variétés à cuisson lente alors que seul le haricot apte à « toaster » pouvait

être consommé avant cette étape. On comprend donc aisément que des critères d'aptitudes agronomiques tels qu'on peut les concevoir de nos jours ont pu être exclus des critères préférentiellement retenus par les agriculteurs au cours de la domestication.

La grande diversité des conditions pédo-climatiques de l'Amérique latine, notamment au niveau des chaînes de montagne peut en partie expliquer les quelques 35 000 entrées dans la collection de haricot cultivé du CIAT. Le génome actuel de chaque variété, notamment en ce qui concerne les aptitudes agronomiques, résulte des pressions de sélection exercées par le milieu, telle que température, photopériode, acidité des sols ou sécheresse. En regard des aptitudes agronomiques, le haricot a pu être domestiqué sur certains sols fertiles ou dans certaines conditions favorables n'ayant exercé que de très faibles pressions, relatives à la nutrition minérale des plantes. L'interaction homme-milieu a alors pu prendre une part importante. En effet, le haricot a été beaucoup utilisé comme culture de cour à proximité des habitations, en association éventuelle avec d'autres cultures maraichères ou fruitières recevant une quantité substantielle de déchets anthropiques. Il a aussi pu être domestiqué sur un sol peu fertile, ce qui requiert une adaptation du génome pour faire face à la limitation en minéraux (croissance plus lente, absorption renforcée, etc...). Il a encore pu être domestiqué en association avec d'autres cultures non légumineuses comme le maïs, ce qui suggère dans ce cas une pression spécifique sur certains caractères physiologiques de la nutrition azotée dont la symbiose avec les rhizobia. La physiologie actuelle du haricot serait donc en relation avec les conditions de sa domestication et notamment certains facteurs géologiques, ethnologiques ou anthropologiques.

#### **2.4. Description morphologique et botanique**

On reconnaît actuellement cinquante-six espèces dans le genre *Phaseolus*, dont seulement quatre présentent un intérêt pour l'agriculture. D'un point de vue morphologique, il existe deux types de haricots. Les haricots nains, qui mesurent 40 ou 50 cm de hauteur, et les haricots à rames ou haricots grimpants, dont la hauteur varie, selon les espèces, de 2 à 3 m.

Comme pour la plupart des espèces du genre, le génome du haricot comprend 11 paires de chromosomes ( $2n=22$ ). Avec 625 Mpb par génome haploïde, c'est le plus petit de la famille des légumineuses alimentaires. Le haricot est une plante herbacée, annuelle, qui peut prendre plusieurs types de port selon les variétés. Le port de la plante est principalement déterminé par son génome, mais les conditions écologiques aux différents stades phénologiques peuvent l'influencer. Ainsi, une température chaude (30 °C) au stade de la première feuille trifoliolée déclenche toujours le port volubile. On peut également obtenir des plantes à port intermédiaire.

Le haricot a une racine principale non dominante qui est très rapidement complétée de racines latérales. Les racines peuvent atteindre un mètre de profondeur si le sol s'y prête. Elles sont le siège du phénomène de nodulation. Les tiges grimpantes sont peu ramifiées et s'enroulent autour de leur support dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (tiges volubiles). Les feuilles adultes sont pétiolées, alternes et composées trifoliées, de couleur verte ou pourpre. Les folioles ont une forme ovale-acuminée, presque losangée et ont de 6 à 15 cm de long sur 3 à 11 cm de large. Les pétioles, renflés à la base sont munis de stipules, et de petites stipules ou stipelles se trouvent à la base des pétioles supportant les folioles. Les deux feuilles primordiales qui apparaissent immédiatement au-dessus des cotylédons sont entières et opposées.

Les fleurs sont de teinte blanche, rose violette ou rouge suivant les variétés. Elles sont disposées en grappes lâches. Les fleurs sont auto fertiles : les ovaires d'une fleur sont fécondés par le pollen provenant de la même fleur. Les gousses de la plupart des variétés peuvent être consommées fraîches, avant leur maturité. Par la suite, les gousses ne sont plus comestibles ; on les écosse et les graines peuvent être consommées fraîches ou sèches, mais toujours cuites. Le fruit du haricot est une gousse. Cette dernière se forme rapidement à la suite de la floraison ; elle mesure de 20 à 50 cm de long. Les gousses peuvent être vertes, parfois striées de pourpre ou de rouge, jaunes ou violettes. Elles sont plus ou moins droites ou courbées, et les variétés sélectionnées ces dernières années sont exemptes de fils. Les fils des haricots sont des filaments fins comme un cheveu, qui se trouvent tout le long de la gousse, à la jonction entre les deux compartiments qui la composent. Les graines des haricots sont au nombre de quatre à douze dans chaque gousse ; elles sont de diverses formes (plus ou moins sphérique ou en forme de rein), de diverses couleurs, unies, tachetées ou rayées (blanches, jaunes, rouges, violacées, brunes, noires), et évidemment de différentes saveurs et textures.

## **2.5. Nutrition azotée du haricot**

Comme pour la plupart des légumineuses la nutrition azotée du haricot se fait soit par assimilation des nitrates du sol soit par fixation symbiotique d'azote atmosphérique. Ces deux processus sont complémentaires au cours du cycle de croissance de la plante. La nitrate réductase intervient essentiellement avant la floraison et la nitrogénase prend la relève au début de la floraison soit deux semaines après le semis chez le haricot et se poursuit jusqu'au début de la formation des gousses. Une deuxième période d'activité maximale de la nitrate réductase peut apparaître après la formation des gousses et les deux processus peuvent être concurrents lors d'un apport d'azote nitrique, qui augmente l'activité de la nitrate réductase tout en diminuant l'activité

de la nitrogénase (Félix et al., 1981). L'activité nitrogénasique suit une courbe de croissance exponentielle avec une activité maximale pendant la période de floraison et diminue pendant le remplissage des gousses. Obaton et al. (1982) ont montré qu'au champ c'est essentiellement l'assimilation du nitrate qui prédomine au début du cycle, la fixation de N<sub>2</sub> intervient au dernier stade.

Le haricot a été décrit par plusieurs auteurs comme étant une légumineuse à faible capacité de fixation d'azote, comparée à d'autres légumineuses comme le soja (Pereira et Bliss, 1987 ; Isoi et Yoshida, 1991). Ce phénomène est dû en partie aux conditions de la culture mais aussi, à la compétitivité des souches de rhizobia indigènes ineffectifs. Le rendement et le développement du haricot sont très dépendants de la teneur en azote du sol. Or les sols sont pour la plupart déficients en cet élément (Graham, 1981). Cependant, l'existence d'une grande variabilité génotypique pour le potentiel fixateur d'azote du haricot décrit par Bliss (1993) permet de sélectionner des variétés à très fort potentiel fixateur d'azote. Ainsi, des efforts ont été faits dans la sélection des variétés à nodulation profuse (Kipe-Nolt et Giller, 1993), ou dans la sélection de variétés précoces (Chaverra et Graham, 1992) ou dans la sélection de variétés présentant une sénescence tardive des nodules (Vikman et Vessey, 1993).

## 2.6. Importance économique du haricot

Dans le genre *Phaseolus*, le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est l'espèce économiquement la plus importante et occupe plus de 85% des superficies consacrées à cette espèce dans le monde. Il constitue la principale légumineuse alimentaire de plus de 300 millions de personnes en Amérique latine et en Afrique centrale et de l'est (Broughton et al., 2003). Le haricot constitue une source protéique importante pour l'alimentation humaine et sa culture est répandue sur l'ensemble des continents. Il est cultivé pour ses gousses que l'on consomme entières, ou pour ses graines que l'on consomme mures ou immatures, à l'état sec, frais ou en conserve. Dans de nombreux pays d'Amérique latine et d'Afrique, le haricot est considéré comme la viande du pauvre. Sa proportion en protéines (25% environ) est le double de celle de beaucoup de céréales, il est riche en micro-éléments essentiels comme le fer et l'acide folique (l'une des vitamines B). Consommé avec le maïs, il permet de couvrir complètement les besoins en acides aminés essentiels.

La production mondiale du haricot sec en 2011 était estimée à 23 millions de tonnes. La surface totale consacrée à cette production représentait environ 29 millions d'hectares pour un rendement moyen de 1.40 t/ha. Le rendement moyen en Amérique du nord et dans l'Union Européenne est

de 1.63 t/ha et pour l'Afrique il n'est que de 0.59 t/ha (FAO, 2013). Ce faible rendement dans les pays en développement est dû d'une part, aux contraintes biotiques et abiotiques de production auxquelles le haricot commun est très sensible, et d'autre part à l'absence de variétés résistantes ou tolérantes à ces contraintes au sein du pool génique primaire du haricot commun. En effet, plus de 200 agents pathogènes (fongiques, bactériens et viraux) sont connus chez le haricot commun et certains d'entre eux causent des pertes économiques considérables (Mahuku et al., 2002 ; Caixeta et al., 2003). Les facteurs abiotiques tels que les hautes températures, la sécheresse contribuent aussi à réduire les rendements du haricot (Bayuelo-Jiménez et al., 2003 ; Rainey et Griffiths, 2005).

### 3. Fixation symbiotique d'azote chez le haricot

L'azote est l'un des éléments les plus abondants sur terre et se produit dans trois réservoirs principaux: la lithosphère, l'atmosphère et la biosphère. Les relations complexes entre ces réservoirs constituent le cycle d'azote. La lithosphère contient la plus grande réserve d'azote, mais seulement une petite partie est accessible aux plantes. La teneur en N de la plupart des sols est d'environ de 0.02 à 0.5%. Cependant, la plupart des sols l'azote est sous forme organique associée à l'humus et les silicates d'argiles et seulement 2 à 3% de cette forme est minéralisée chaque année. Dans les sols, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles (1 à 2%), ce qui constitue souvent un des principaux facteurs limitants de la croissance des végétaux.

L'azote est cependant très abondant dans l'atmosphère qui contient 80% de diazote, mais les seuls organismes capables de l'utiliser sont les bactéries diazotrophes qui possèdent le complexe enzymatique nitrogénase. Pour certains groupes de végétaux, l'association avec ce type de bactérie leur permet d'améliorer leur nutrition azotée. Quand l'association est très étroite, on parle de symbiose. Deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes : les légumineuses qui s'associent aux rhizobia et les plantes actinorhiziennes, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries du genre *Frankia*. Dans les deux cas, la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation d'un organe nouveau au niveau des racines, le nodule fixateur d'azote. Dans les nodules, les bactéries protégées et nourries par la plante lui fournissent en échange de l'azote fixé.

#### 3.1. Etablissement de la symbiose fixatrice d'azote

La symbiose légumineuse-rhizobia culmine par la formation d'un nouvel organe, le nodule racinaire, au sein duquel les rhizobia fixent l'azote atmosphérique. Le processus de nodulation commence lors de la pré-infection, par une phase de reconnaissance entre les deux partenaires, et

qui est suivie de deux étapes quasiment simultanées, l'infection de la racine par les bactéries et l'organogenèse du nodule (Patriarca et al., 2004).

### 3.1.1. Processus d'infection et de nodulation

Le processus d'infection et de nodulation implique une interaction intime entre les deux partenaires symbiotiques (Sadowsky, 2005). L'initiation et la continuation de la nodulation dépend d'un échange continu des signaux chimiques entre la légumineuse et les bactéries (Dénarié et Cullimore, 1993 ; Dénarié et al., 1996 ; Parniske et Downie, 2003).



*Figure I.2. Nodosités sur les racines de haricot cultivé en hydroaéroponie sous serre à l'INRA de Montpellier, France (Lazali, 2012).*

#### *- Etape de pré-infection : reconnaissance des partenaires*

Lors de l'étape de pré-infection, les bactéries provoquent au niveau des différents tissus racinaires de la plante hôte, diverses réponses qui sont présumées préparer les étapes d'infection et organogenèse nodulaire. Il est bien établi que cette étape s'initie par un dialogue moléculaire spécifique entre les deux partenaires (Figure I.3). Dans un premier temps, les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires de la plante vont induire chez la bactérie des gènes *nod* qui codent pour des protéines impliquées dans la biosynthèse et la sécrétion de facteurs Nod (F-Nods). Les F-Nods sont des signaux symbiotiques clés requis pour la reconnaissance plante hôte-bactérie, ainsi qu'au cours des étapes d'infection et d'initiation de l'organogenèse nodulaire (Perret et al., 2000 ; Broughton et al., 2000 ; Cooper, 2007). Les F-Nods produits par les rhizobia sont des composés lipochito-oligosaccharidiques constitués d'un squelette oligomérique de N-acétyl-D-glucosamine liés en  $\beta$ -1,4 et d'une chaîne d'acides gras (de 16 à 18 atomes de carbone) au niveau de l'extrémité non réductrice (Lerouge et al., 1990). La nature de la chaîne d'acide

gras ainsi que les substitutions (acétylation, sulfatation, méthylation, etc...) sur le sucre réducteur et sur le sucre non réducteur sont caractéristiques de chaque espèce et sont impliqués dans la spécificité d'hôte (Denarié et al., 1996).

Les F-Nods agissent essentiellement sur deux types de cellules au niveau de la racine : Les cellules épidermiques et corticales. Au niveau des cellules épidermiques, les F-Nods induisent une dépolarisation de la membrane plasmique, une oscillation du flux de  $Ca^{2+}$ , une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants (Esseling et al., 2003). A partir de cette niche, les rhizobia pénètrent la cellule végétale par la formation d'un cordon d'infection qui traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures (Gage, 2004). Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire.

#### *- Processus d'infection de la racine*

Le processus infectieux dans la racine correspond à l'ensemble des événements qui sont associés à la pénétration des bactéries dans les cellules de la racine et leur progression vers le nodule en formation. Deux types d'infection peuvent être distingués : soit elle débute entre les jonctions inter-cellulaires crack-entry comme dans le cas des nodules formés à la base des racines latérales chez *Sesbania rostrata*, soit elle débute dans les poils absorbants de la racine comme dans le cas des légumineuses tempérées telles que *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*.

La première étape de l'infection consiste en l'attachement des bactéries sur les jeunes poils absorbants (Figure I.3). Les rhizobia ont la capacité de s'attacher aux poils absorbants, et il a été montré chez *Rhizobium leguminosarum* que cet ancrage se déroule en deux étapes. D'abord, les rhizobia se lient aux poils grâce à une protéine bactérienne calcium dépendante de type adhésine, appelée rhicadhésine (Smit et al., 1989). Ensuite, les fibrilles de cellulose synthétisées par les bactéries permettent de former un biofilm à l'apex des poils absorbants (Smit et al., 1987). Des lectines végétales localisées à l'apex des poils sont également impliquées dans l'adhésion des bactéries. Ces lectines ont la capacité de se lier de manière spécifique et réversible à des composés saccharidiques présents à la surface des bactéries (Kijne et al., 1997 ; Hirsch, 1999).

Une fois fixées à l'apex du poil en croissance, les bactéries vont induire par l'intermédiaire des F-Nods la courbure du poil absorbant en crosse de berger (Figure I.3). Cette déformation typique de l'infection par bactéries correspond à un recourbement à 360° du poil absorbant autour d'une

micro-colonie bactérienne. Pendant ce recourbement, le noyau du poil migre vers l'apex et les microtubules se concentrent graduellement entre l'apex du poil et le noyau pour finalement converger vers le centre de la courbure (Timmers et al., 1999). A la suite de cette déformation les rhizobia pénètrent dans le poil absorbant via une structure tubulaire appelée cordon d'infection.

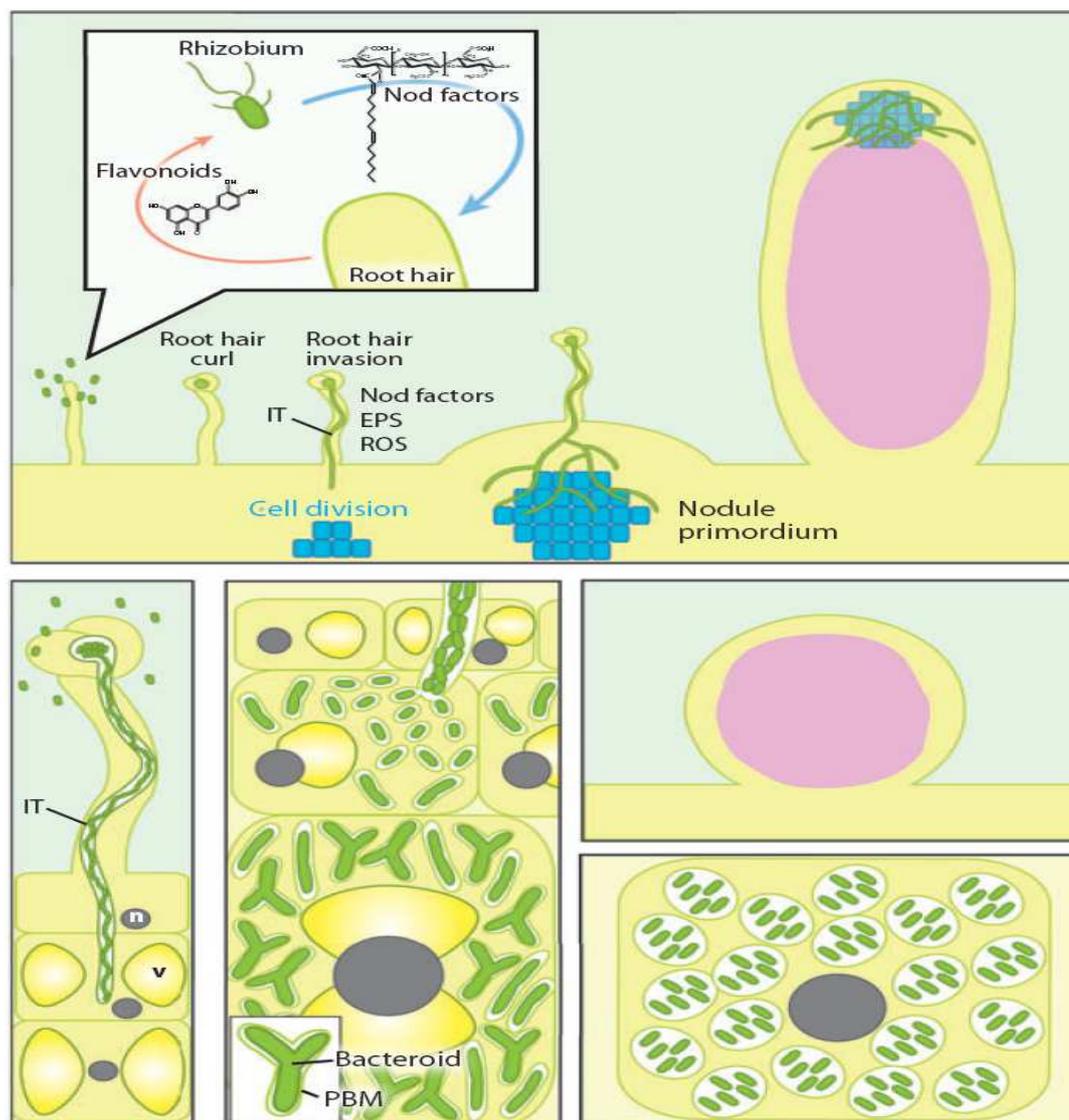
La croissance et la division des bactéries dans l'espace confiné de la crosse de berger provoquent une pression qui semble contrer la pression de turgescence du poil et qui favoriserait ainsi l'entrée des bactéries (Brewin, 2004). Au niveau du site de pénétration, la dégradation de la paroi végétale du poil absorbant a été montrée chez différentes plantes hôtes telles que le soja et le trèfle (Mateos et al., 2001). Des observations au microscope électronique ont montré que les bactéries semblent capables d'induire la formation de puits dans la paroi, mais l'origine de la dégradation reste inconnue (Mateos et al., 2001). Pendant que la paroi est dégradée au point d'entrée des bactéries, la membrane plasmique s'invagine et du nouveau matériel pariétal est synthétisé, ce qui conduit à la formation du cordon d'infection dans lequel les bactéries vont proliférer (Gage et al., 1996 ; Gage et Margolin, 2000).

#### *- Progression du cordon d'infection*

La progression des bactéries vers la base du poil absorbant se fait grâce à l'élongation du cordon d'infection, qui est délimité du reste de la cellule par une paroi végétale primaire néo-synthétisée et de nature pecto-cellulosique (Rae et al., 1992). L'observation au microscope de la progression du cordon d'infection montre que l'apex de ce dernier est relié au noyau par une colonne de cytoplasme (Gage, 2004). Chez la luzerne, cette colonne de cytoplasme co-localise avec le réseau de microtubules qui pourrait être impliqué dans la croissance du cordon d'infection (Timmers et al., 1999). A l'intérieur du cordon d'infection, les bactéries apparaissent alignées en une ou deux colonnes plus ou moins parallèles à l'axe du cordon (Figure I.3).

La croissance du cordon implique également la synthèse et le dépôt de nouveaux composés membranaires et pariétaux transportés vers l'apex du cordon par les vésicules de Golgi. La matrice du cordon est constituée à la fois de composés végétaux tels que des glycoprotéines et des extensines (Rae et al., 1992 ; Rathbun et al., 2002) ainsi que des composés bactériens tels que des exopolysaccharides et des lipopolysaccharides de surface (Cheng et Walker, 1998 ; Gage et Margolin, 2000). Il a été proposé un modèle pour la croissance du cordon d'infection, dans lequel la matrice située à l'apex serait plus fluide que la matrice en amont. Dans ce modèle, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) présentes dans la matrice du cordon d'infection (Santos et al., 2000 ; Herouart et al., 2002), induiraient la réticulation des extensines et provoqueraient ainsi

la rigidification progressive de la matrice. De ce fait, la plus grande fluidité de la matrice à l'apex permettrait la multiplication des bactéries (Brewin, 2004).



**Figure I.3.** Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice d'azote (Gibson et al., 2008). IT, cordon d'infection ; V, vacuole

### 3.1.2. Initiation et développement nodulaire

En parallèle de la pénétration des bactéries dans la racine, le cycle cellulaire est réactivé au niveau du cortex externe, en face du site d'infection (Yang et al., 1994), ce qui conduit à la formation de ponts cytoplasmiques, aussi appelés cordons de pré-infection (PITs). Le passage du cordon d'infection est donc préparé dans les cellules du cortex externe par la présence des PITs. Lorsque le cordon d'infection atteint la base de la cellule épidermique, il fusionne avec la paroi et les bactéries se propagent dans l'espace intercellulaire. Dans le même temps, la paroi de la cellule corticale sous-jacente s'invagine au niveau du PIT, au travers duquel le cordon

d'infection continue ensuite sa progression (van Brussel et al., 1992). La propagation du cordon d'infection vers le nodule en formation est assurée par ce type de passages successifs à travers les assises de cellules corticales.

Les cordons d'infection atteignent le primordium nodulaire et y relâchent les bactéries par le phénomène d'endocytose (Bassett et al., 1977). Les bactéries se trouvent alors entourées par une membrane qui dérive de l'hôte, la membrane pér bactéroidale qui protège les bactéries des molécules de défenses de l'hôte. Dans ces unités fermées appelés symbiosomes (Roth et Stacey, 1989), les bactéries subissent des changements morphologiques et physiologiques qui mènent à la formation de bactéroïdes (Irigoyen et al., 1990).

Dans les nodules déterminés (nodules avec une activité méristématique limitée dans le temps), les différents symbiosomes fusionnent et/ou les bactéroïdes se divisent dans le symbiosome. Par conséquence, les symbiosomes contiennent typiquement plusieurs bactéroïdes. Cependant, dans les nodules indéterminés (nodules avec une activité méristématique continue dans le temps), les différents symbiosomes se divisent, ainsi que le bactéroïde, ce qui a la plupart du temps comme conséquence un seul bactéroïde dans un symbiosome (Prell et Poole, 2006). Les cellules distales du primordium ne sont pas envahies par les bactéries et gardent un état non différencié. Elles continuent la division cellulaire et forment le méristème nodulaire. Ces différentes activités cellulaires conduisent rapidement au développement d'une structure complexe : le nodule. L'ensemble des mécanismes génétiques et moléculaires qui permettent le développement d'un nodule ne sont pas encore ni compris ni complètement décrits.

La production de nodulines tardives est particulièrement intéressante au développement nodulaire. Elles activent entre autres, l'expression des gènes *nif*, *fix*...etc. qui codent pour la synthèse de différents enzymes de la fixation comme la nitrogénase, l'uricase, le glutamate déshydrogénase, la glutamine synthétase. Ainsi, le N<sub>2</sub> fixé est converti en glutamate, glutamine, aspartate, asparagine...etc. qui seront transportés dans la sève du xylème de la plante. Une abondance de composés carbonés est fournie en retour aux bactéroïdes.

### 3.2. Structure des nodosités

La structure très différenciée de la nodosité est déterminante dans la régulation, notamment par l'O<sub>2</sub>, du métabolisme complexe lié à la fixation de N<sub>2</sub>. L'activité intense du méristème nodulaire jusqu'au stade de nodosité mature a été décrite avec précision par Robertson et Farnden (1980). On rencontre selon l'espèce et indépendamment de la souche de rhizobia, deux principaux types de nodosités : (i) Les nodosités indéterminées (*Acacia mangium*, *Trifolium*, *Pisum*...), issues de

mères du méristème apical persistant qui leur confère une croissance longitudinale ; (ii) les nodosités déterminées (*Glycine*, *Phaseolus*, *Vigna* ...), issues de l'auxèse des cellules de méristème apical qui cesse son activité à maturation de la nodosité, environ 12 à 18 jours après l'inoculation chez le soja.

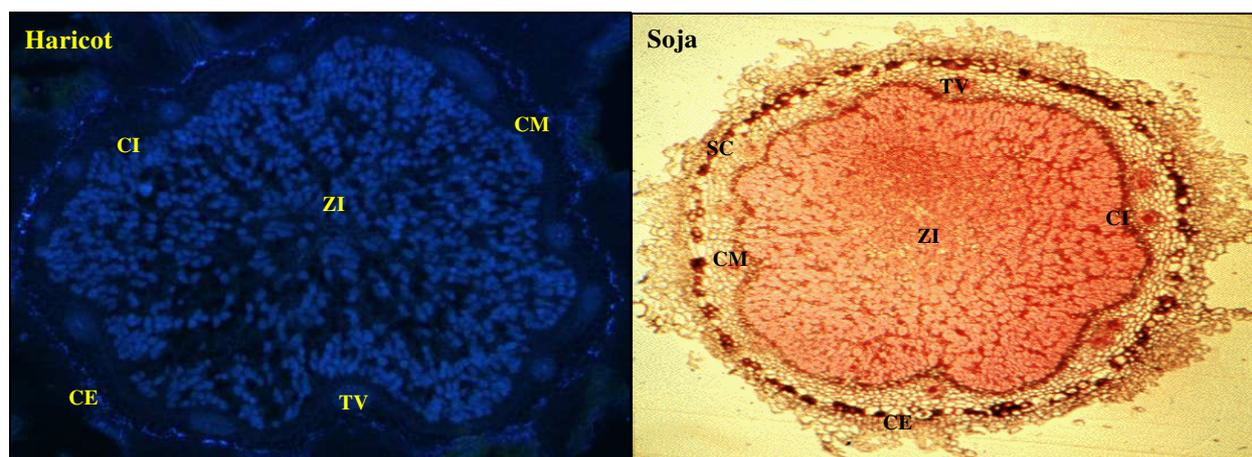
Le cortex externe est compris entre la surface externe de la nodosité et une couche de cellules sclérifiées. Il est constitué principalement de cellules parenchymateuses, et les espaces intercellulaires représentant 5% du volume de cette zone (Parsons et Day, 1990). Le cortex externe comprend un sclérenchyme présentant des interruptions, et la surface externe de ce cortex est constituée vers l'intérieur d'un tissu compact de cellules effondrées recouvert d'une fine matrice amorphe, et vers l'extérieur, au niveau des traces vasculaires, d'un amas de cellules très lâches, qui sont des lenticelles à parois hydrophobes (Webb et Sheehy, 1991).

Le cortex moyen est compris entre les cellules sclérifiées et le cortex interne. Les cellules qui le constituent ont généralement des parois plus épaisses que les autres cellules et limitent des espaces intercellulaires estimés à 2 ou 3% du volume de cette zone (Parsons et Day, 1990). Ces espaces peuvent être occlus par une glycoprotéine (James et al., 1991).

Le cortex interne s'étend autour de la zone centrale infectée, et peut être le siège d'une forte accumulation d'amidon. Il est constitué généralement d'une à trois couches de cellules disposées régulièrement, ne comprenant que de très petits méats gazeux orientés radialement (Bergersen et Goodchild, 1973 ; Webb et Sheehy, 1991), et d'une assise cellulaire limitrophe de la zone centrale, appelée zone de distribution. Cet ensemble comprend un volume d'environ 5% d'espaces intercellulaires (Parsons et Day, 1990).

Les traces vasculaires sont localisées entre le cortex moyen et le cortex interne. Elles sont composées majoritairement d'éléments phloémiens, et sont entourées par un endoderme et un péricycle de plusieurs assises cellulaires. Les traces vasculaires se terminent en « cul de sac » au voisinage de l'apex de la nodosité (Walsh et al., 1989).

Enfin, la zone centrale comprend des cellules infectées de grande taille ainsi que des cellules non infectées plus petites. Ces dernières forment des rayons qui pénètrent au cœur de la nodosité. Il y a environ trois cellules infectées pour deux cellules non infectées chez le haricot, mais il existe peut être des différences chez d'autres symbioses. Les cellules infectées sont très peu vacuolisées, et sont caractérisées par un nombre très élevé de mitochondries près des méats gazeux (Bergersen, 1994). Les espaces intercellulaires occupent 3 à 4% du volume de cette zone (Parsons et Day, 1990).



**Figure 1.4.** Structure d'une nodosité déterminée de haricot (Lazali et al., 2013) en comparaison avec d'une nodosité indéterminée du soja (Ribet et Drevon, 1995a). SC, Sclérenchyme ; CE, cortex externe ; CM, cortex moyen ; CI, cortex interne ; TV, traces vasculaires ; ZI, zone infectée.

### 3.3. Fonctionnement des nodosités

Le fonctionnement de la nitrogénase dépend du métabolisme respiratoire nodulaire et de la concentration intra-nodulaire en  $O_2$ . Il apparaît ainsi que l'approvisionnement des nodules en  $O_2$  doit être suffisamment important pour soutenir une activité respiratoire intense, d'une part, et que la concentration des cellules infectées des nodules en  $O_2$  doit être maintenue à un niveau très bas pour éviter l'inactivation irréversible de la nitrogénase, d'autre part. La fixation d'azote nécessite un environnement micro-aérobie pour permettre la synthèse et éviter l'inactivation de la nitrogénase et cependant les besoins énergétiques de ce processus sont tels que l' $O_2$  devient le facteur limitant. En effet, il a été montré que la concentration d' $O_2$  dans les cellules infectées est de l'ordre de 4 à 70 nM, tandis que dans les cellules externes du cortex nodulaire, qui sont en équilibre avec l'air atmosphérique, peut avoir une concentration intercellulaires 10 000 fois plus élevée malgré qu'un espace d'un millimètre entre les différents types de cellules (Layzell et Atkins, 1997).

Le cortex interne joue un rôle capital dans le maintien des conditions de micro-aérobie, nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase. Cette barrière est formée de couches de cellules parenchymateuses dont certaines présentent des parois cellulaires alignées et des espaces intercellulaires réduits. L'existence de cette barrière expliquerait l'aptitude de la plupart des nodosités intactes à tolérer des pressions extérieures de l'oxygène de l'ordre de 80 kPa (Hunt et Layzell, 1993). Selon ces auteurs, l'augmentation de la pression extérieure de l'oxygène provoquerait une augmentation transitoire de la concentration intra-nodulaire de l' $O_2$  excédant la capacité respiratoire, ce qui entraînerait en retour une augmentation de la résistance corticale à la

diffusion de l'O<sub>2</sub>. Cependant, il semble que la diminution de l'activité nitrogénase précéderait l'augmentation de la résistance corticale chez le soja suggérant que l'ajustement de la résistance nodulaire n'est pas le seul, ni le premier mécanisme de protection intra-nodulaire de la nitrogénase contre un excès d'O<sub>2</sub> (Purcell et Sinclair, 1995).

L'exigence d'O<sub>2</sub> pour la respiration des bactéroïdes afin de répondre à la forte demande d'ATP de l'activité nitrogénase contre les effets inhibiteurs d'O<sub>2</sub> sur la nitrogénase, est souvent appelé le paradoxe d'O<sub>2</sub>. Tout d'abord, les bactéroïdes peuvent offrir une protection partielle à leurs nitrogénases par des changements de conformation (Denison et al., 1992). Deuxièmement, le potentiel de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la zone de bactéroïdes contenant des nodules de légumineuses est grand (Dalton et al., 1993; Matamoros et al., 2003). Dans les nodules, la formation de ROS est favorisée par le pH cytosolique légèrement acide, la forte concentration de leghémoglobine, l'abondance de fer hémique et les conditions fortement réductrices dans la zone infectée. Les chaînes de transport d'électrons dans les bactéroïdes, les mitochondries, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique et les membranes plasmiques peuvent régénérer aussi la formation des ROS (Corpas et al., 2001).

La fourniture d'O<sub>2</sub> dans la symbiose a des exigences contradictoires. Bien que la nitrogénase soit irréversiblement inactivée par l'oxygène, des quantités importantes d'O<sub>2</sub> au niveau des chaînes respiratoires bactéroïdiennes sont nécessaires pour produire l'ATP abondamment consommé par la nitrogénase. Par conséquent, la plante a dû élaborer un système capable de fournir un flux important d'O<sub>2</sub> aux bactéroïdes tout en maintenant une très faible concentration d'O<sub>2</sub> dissous dans l'environnement immédiat de la nitrogénase.

De nombreux travaux ont montré que les nodosités sont capables d'adapter physiologiquement leur résistance corticale à des variations de la pression d'O<sub>2</sub> ce qui a poussé les auteurs à employer le terme d'ajustement de la conductance corticale nodulaire (Witty et al., 1987 ; Hunt et Layzell, 1993). Si la pression externe d'O<sub>2</sub> augmente, la nodosité protège sa nitrogénase en abaissant sa conductance corticale. Le mécanisme impliqué présente cependant un temps d'adaptation de plusieurs minutes puisque la nitrogénase est inactivée en cas d'élévation trop brusque de cette pression (Witty et al., 1984). Inversement, la nodosité est aussi capable d'élever sa conductance pour répondre à un appauvrissement du milieu en O<sub>2</sub>, mais le rétablissement du niveau initial de l'activité nitrogénase est plus long et varie de 1 à 4h (Weisz et Sinclair, 1987). La conductance nodulaire serait fonction de l'épaisseur de la phase liquide qui obstrue les espaces intercellulaires du cortex interne (Hunt et al., 1988). Il a été calculé qu'une ceinture aqueuse de 45 µm d'épaisseur dans le cortex d'une nodosité exposée à la pression

atmosphérique, suffirait à maintenir une pression d'O<sub>2</sub> intra-nodulaire non inhibitrice de la nitrogénase (Sinclair et Goudrian, 1981).

### 3.4. Rhizobia associés au haricot

Le haricot est une plante capable de former des nodules effectifs avec des groupes bactériens génétiquement hétérogènes d'origines différentes (Martinez et al., 1988 ; Laguerre et al., 1993 ; Eardly et al., 1995). En plus de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *R. tropici* (Martinez et al., 1988), *R. etli* (Segovia et al., 1991), *Sinorhizobium meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Michiels et al., 1998), deux nouveaux genres capables de former des nodules sur les racines du haricot ont été décrits *R. gallicum* bv. *phaseoli* et *R. giardinii* bv. *phaseoli* (Amarger et al., 1997). D'autres espèces comme *Rhizobium* sp. BR816 (Hungria et al., 1993) et *Rhizobium* sp. GRH2 (Herrera et al., 1985) sont également capables d'induire la nodulation du haricot.

Selon la littérature, les souches de rhizobia nodulant le haricot peuvent être séparées en deux groupes. Le premier groupe contient les rhizobia qui forment des nodules effectifs chez le haricot. Ce sont *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. etli*, *R. Tropici*, *Rhizobium* sp. BR816, GRH2, et *Rhizobium* sp. NGR234. Le second groupe contient les rhizobia qui sont capables de former des nodules ineffectifs tels que *Bradyrhizobium japonicum* et *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Sardowsky et al., 1988 ; Waelkens et al., 1995).

**Tableau I.2.** Classification des rhizobia nodulant le haricot (Graham, 2008).

Genre	Espèces	Plantes hôtes	Références
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i> biovar <i>trifolii</i> biovar <i>phaseoli</i>	<i>Pisum. vicia</i> , <i>Lalhyrtils</i> , <i>Lens</i> <i>Trifolium</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Jordan, 1984 Jordan, 1984 Jordan, 1984
	<i>R. galegae</i> biovar <i>orientalis</i> biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i>	Lindstrom, 1989 Lindstrom, 1989
	<i>R. tropici</i> type II A <i>R. tropici</i> type II B	<i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero et al., 1991 Martinez-Romero et al., 1991
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Segovia et al., 1993
	<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinualum</i>	Chen et al., 1995 ; Chen et al., 1997
	<i>R. gallicum</i> biovar <i>gallicum</i> biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger et al., 1997 Amarger et al., 1997
	<i>R. giardinii</i> biovar <i>giardinii</i> biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger et al., 1997 Amarger et al., 1997
	<i>R. mongolense</i> <i>R. huautlense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Sesbania herbacea</i>	van Berkum et al., 1998 Wang et al., 1998

#### 4. Importance du phosphore dans la nutrition de la symbiose rhizobienne

Le phosphore (P) est le cinquième élément composant la matière vivante. Quelque soit sa forme, l'atome de P est toujours associé à des atomes d'oxygène pour former le groupement phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ . La formation d'une liaison anhydride d'acide entre deux groupements phosphate (ATP) riche en énergie lui confère un rôle central dans le stockage de l'énergie cellulaire. Le groupement phosphate entre aussi dans la composition de nombreuses molécules telles que les acides nucléiques (ADN, ARN) et les phospholipides, ce qui lui confère un rôle structural fondamental. Enfin, le processus de phosphorylation/déphosphorylation des protéines est un des principaux mécanismes de régulation du métabolisme cellulaire, ce qui confère au groupement phosphate un rôle supplémentaire dans le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. Cependant, malgré cette importance fondamentale dans le cycle du vivant, l'approvisionnement en P est une contrainte majeure pour de nombreux organismes vivants du sol.

##### 4.1. Phosphore dans le sol

Les différentes formes de P dans le sol sont classées selon différents critères : la nature des composés phosphorés, le fractionnement chimique ou l'échange ionique. La nature des composés phosphorés permet de séparer le P organique du P inorganique. La répartition entre ces deux catégories dépend du type de végétation, de l'historique de fertilisation, du type de cultures et du type de sol (Bolan, 1991).

La quantité de P présente dans un sol est donc une conséquence directe de la richesse de la roche mère. Mais la connaissance de cette quantité ne donne qu'une indication très imparfaite sur l'aptitude du sol à fournir du P aux végétaux et à satisfaire leurs exigences. Le sol est un environnement hétérogène et la disponibilité du P varie considérablement puisqu'il est fortement lié à des composants organiques et inorganiques du sol. Il est présent sous forme de P soluble dans la solution du sol et sous forme de P insoluble adsorbé sur les particules du sol ou comme composant de la matière organique du sol.

##### *- Phosphore minéral*

Les ions orthophosphates ou  $\text{P}_i$  constituent la seule forme de P directement assimilable par les plantes. La faible mobilité du  $\text{P}_i$  dans la solution du sol résulte de sa forte réactivité avec les constituants du sol. Seule une faible proportion de P est présente sous forme de  $\text{P}_i$  en solution et sa concentration se maintient pour la majorité des sols entre 0,1 et 10  $\mu\text{M}$  (Hinsinger, 2001).

Les ions P sont des ligands, c'est-à-dire des molécules capables de se lier à d'autres entités

chimiques pour former des complexes plus larges. Ils ont fortement tendance à se complexer avec des cations, Ca et Mg dans les sols alcalins, et avec Fe et Al dans les sols acides. Dans les sols acides, les oxydes de Fe et d'Al sont très solubles et les concentrations des cations Al et Fe peuvent être élevées en solution. Dans les sols alcalins, les oxydes de Fe et d'Al sont peu solubles et le P inorganique est essentiellement complexé au Ca et, de façon moins importante, au Mg. Cette spéciation dépend par ailleurs de la présence d'autres ligands compétiteurs et notamment des ligands organiques (Hinsinger, 2001).

Dans les sols, moins de 1% du P est présent sous formes ioniques en solution. La majorité du P inorganique est liée à la phase solide par des liaisons plus ou moins énergétiques ou, est constitutif des minéraux. A l'interface solide-solution, de nombreux processus physico-chimiques (adsorption/désorption, précipitation/dissolution, diffusion) régulent la concentration des ions P en solution (Frossard et al., 2000 ; Hinsinger, 2001).

#### ***- Phosphore organique***

On peut définir le P organique comme l'ensemble des composés comportant un ou plusieurs groupements phosphate et qui sont produits par le métabolisme des êtres vivants. De ce fait, le P organique dérive principalement des résidus végétaux, des cellules microbiennes et fongiques et des métabolites cellulaires. Le P organique peut représenter jusqu'à 80 % du P total présent dans un sol (Condrón et Tiessen, 2005). Il est essentiellement présent sous forme de phosphates d'inositol (phytate) et secondairement sous forme de sucres, acides nucléiques, et phospholipides (Mengel et Kirby, 1987).

La présence d'un ou plusieurs groupements phosphate dans les composés de P organique entraîne une faible mobilité dans la solution du sol. En effet, ils peuvent être fortement adsorbés par les minéraux argileux et peuvent former avec la matière organique des composés difficilement dégradables ou précipiter avec les oxydes de Fe ou d'Al dans les sols acides ou de Ca et Mg dans les sols alcalins. Le taux d'adsorption du P organique dans les sols est fonction de sa structure, notamment du nombre de résidus P, de sa charge mais aussi de sa taille moléculaire. Ainsi, les phosphates d'inositol s'adsorbent plus facilement à la surface des argiles que les acides nucléiques, les phospholipides ou les sucres simples (Leytem et al., 2002).

## **4.2. Mécanismes d'acquisition du phosphore**

### ***- Mécanismes physico-chimiques***

Les mécanismes physico-chimiques responsables de la mobilisation de P sont l'altération des

minéraux primaires, la destruction des agrégats qui libère des minéraux P secondaires suivie de la désorption des ions phosphate contenus dans ces minéraux et enfin les échanges ioniques qui permettent la mise en solution de Pi à partir du pool labile de P inorganique. Cependant, le mécanisme majeur qui détermine la mise en solution de Pi à partir des minéraux phosphatés ou des surfaces d'échanges du sol est la variation de pH de la solution du sol (Hinsinger, 2001). Concernant la dynamique de dissolution des minéraux phosphatés, les isothermes de dissolution/précipitation de ces minéraux peuvent être établies en fonction du pH et de la concentration en  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  de la solution. Pour chaque minéral, les points situés au-dessus des isothermes indiquent une précipitation du minéral. Il est ainsi possible de voir qu'à pH acide, les minéraux de Fe et d'Al précipitent pour de très faibles concentrations en Pi. Inversement, l'augmentation du pH de la solution du sol augmente leur solubilité. La précipitation des minéraux calciques requiert des valeurs de concentration en Pi et de pH plus élevées que les phosphates de Fe et d'Al. Par conséquent, une acidification du pH d'un sol riche en minéraux calciques pourra facilement libérer du Pi à partir de ces minéraux, en particulier le phosphate dicalcique dihydraté.

#### *- Mécanismes biologiques*

Le sol contient une très grande diversité d'organismes (bactéries, champignons, plantes) capables de libérer du Pi à partir des formes de P minérales et organiques. Les organismes vivants du sol sont capables de libérer du Pi à partir de P minéral et notamment des minéraux phosphatés du sol. La solubilisation de P minéral s'effectue par la sécrétion de ligands ou acides organiques qui vont se complexer avec le Ca, le Fe ou Al, libérant ainsi du Pi dans la solution du sol (Hinsinger, 1998 ; Jones, 1998). Le Pi libéré dans la solution du sol par minéralisation ou solubilisation peut être absorbé par les plantes et les champignons, immobilisé par la population bactérienne, adsorbé sur les surfaces minérales ou perdu par lessivage et ruissellement.

La minéralisation des composés de P organique s'effectue grâce à la sécrétion d'enzymes qui ont la propriété de catalyser l'hydrolyse des liaisons esters phosphoriques et d'anhydrides d'acides en libérant du Pi. Ces enzymes appartiennent à un groupe très diversifié appelé phosphatases (Burns, 1982). Parmi les phosphatases, on peut différencier les phosphomonoestérases, les phosphodiesterases, les phytases et les nucléases qui vont respectivement libérer du Pi à partir des monoesters, des diesters, du phytate et des acides nucléiques. Ces enzymes peuvent être adsorbées sur la phase solide du sol, notamment avec les argiles, modifiant ainsi leurs propriétés catalytiques (Leprince et Quiquampoix, 1996 ; Quiquampoix et Mousain, 2005). Il est estimé

que 70 à 80% des phosphatases sécrétées dans la rhizosphère sont d'origine bactérienne (Plante, 2005).

### 4.3. Déficience des sols en phosphore et conséquences sur la symbiose rhizobienne

#### *- Effet de la déficience en P sur la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>*

La disponibilité du P dans le sol et surtout sa mobilisation par la plante ont un effet direct sur l'aptitude de fixer l'azote atmosphérique (Hirsch et al., 2001). La déficience en P augmente la proportion de biomasse racinaire au détriment de la biomasse aérienne, et la présence de nodosités fonctionnelles modifie peu cette répartition de la biomasse bien que l'expansion des racines latérales soit généralement diminuée par la nodulation (Cassman et al., 1980). Ultérieurement, la croissance des nodosités est davantage ralentie que celle de la partie aérienne (Israel, 1987 ; Ribet et Drevon, 1995b).

Selon Bieleski (1973), le Pi absorbé par la racine est transporté par le flux xylémique vers les feuilles seulement après satisfaction de l'exigence en Pi des racines où cet élément diffuse par voie symplasmique dans le cortex racinaire. Toutefois, il est peu probable qu'il en soit de même pour les nodosités malgré leur origine corticale et leur proximité de la source de P. En effet, la nutrition minérale des nodosités, comme celle des apex aériens et des jeunes feuilles, se ferait uniquement par le flux phloémique (Parsons et al., 1995). Pourtant, les nodosités sont généralement plus riches en P que les autres organes végétatifs, et leur teneur en P est généralement moins affectée par la déficience que celle des racines et de la partie aérienne (Israel, 1987 ; O'Hara et al., 1988).

Robson (1981) a suggéré que la déficience en P limiterait la fixation de N<sub>2</sub> indirectement, via la croissance de la plante hôte, car chez la plupart des légumineuses nodulées, la teneur en P total de la partie aérienne est fortement corrélée à la disponibilité en P. Chez le pois carencé, Jakobsen (1985) a observé une augmentation de la teneur en P total de la partie aérienne dès le 1<sup>er</sup> jour d'un apport supplémentaire de P alors qu'il faut attendre le 3<sup>ème</sup> jour pour que la biomasse, la teneur en P et l'activité réductrice d'acétylène des nodosités soient augmentées. Mais chez le soja carencé, un apport supplémentaire de P se traduit par un rétablissement synchrone, en deux jours, de la teneur optimale en P dans les feuilles et les nodosités, tandis que l'augmentation de la vitesse de croissance n'est mesurable que deux semaines plus tard (Israel, 1993). Ces auteurs ont conclu que l'augmentation de la production des photosynthétats précède ou coïncide avec la stimulation de la fixation de N<sub>2</sub>.

Parmi les légumineuses à graines, le haricot reste encore un mauvais fixateur de N<sub>2</sub> (LaRue et

Patterson, 1981; Hardarson, 1993), caractère parfois attribué à sa courte phase végétative, ce qui augmente sensiblement ses exigences en azote. L'irrégularité de la nodulation en conditions de culture au champ est l'une des causes principales de la réduction de l'efficacité de la fixation de  $N_2$  chez le haricot (Graham, 1981; Piha et Munns, 1987). Dans ce contexte, Graham (1981) a déjà montré que, sous déficit en P, le haricot a une faible capacité de nodulation et donc une faible fixation symbiotique de  $N_2$ .

Pereira et Bliss (1989) avaient suggéré d'améliorer en même temps la fixation de  $N_2$  et l'efficacité d'utilisation du P, en sélectionnant des lignées de haricot capables de bien fixer l' $N_2$  même sous de faibles concentrations en P. Plusieurs travaux indiquent que l'application de P augmente le contenu de l'azote dans les graines de légumineuses, comme la luzerne et le soja (Drevon et Hartwing, 1997). Dans le même sens, Olivera et al. (2004) ont trouvé que 1.5 mM en P est la concentration optimale pour le développement et la croissance de la symbiose haricot - rhizobia. Ainsi, l'activité spécifique nitrogénase varie selon les traitements en P, elle augmente de 10 à 20 fois dans les nodules des plantes cultivées respectivement avec 1.5 mM et 2 mM de P en comparaison avec celle des plantes cultivées sans P.

#### *- Effet de la déficience en P sur la nodulation*

Une des spécificités des légumineuses fixatrices de  $N_2$  est l'importance particulière de leur nutrition phosphatée (Vance et al., 2000). Les exigences de la nodulation et la croissance nodulaire pour le P ont été élucidées chez plusieurs symbioses rhizobiennes. Il a été bien établi que la biomasse nodulaire est fortement corrélée à la disponibilité du P chez le trèfle (Hellsten et Huss-danell, 2001). Les nodosités constituent des puits importants pour le P et leur teneur en P est deux fois plus élevée que dans la partie aérienne de la plante (Tang et al., 2001). Par rapport à la croissance de la plante hôte, la nodulation est fortement réduite sous déficience en P (Gunawardena et al., 1992); cette réduction est très remarquable au niveau de la taille et le nombre des nodosités (Ribet et Drevon, 1995b). Ces résultats sont en accord avec ceux de Tang et al. (2001), Schulze et Drevon (2005), qui ont rapporté que l'adaptation des plantes de luzerne vis à vis d'une déficience en P se traduit par des nodosités de volume réduit alors que leurs nombres restent intacts. En revanche, d'autres auteurs (Singleton et al., 1985; Mullen et al., 1988) ont rapporté que cette carence diminue le nombre des nodosités par plante et/ou la masse individuelle des nodosités (Jakobsen, 1985; Gunawardena et al., 1992), ainsi que la masse des bactéroïdes chez le soja.

### *- Effet de la déficience en P sur la perméabilité nodulaire à l'oxygène*

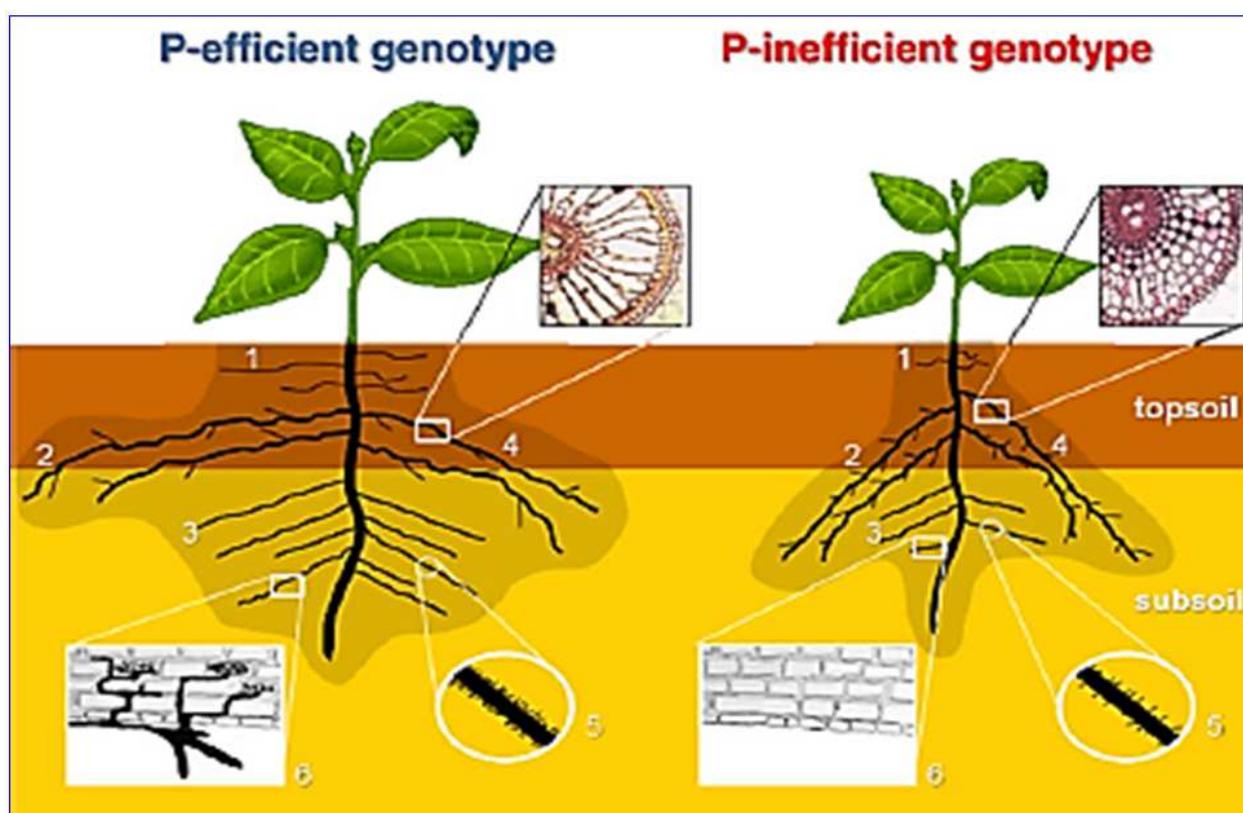
Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude de la diffusion de l'O<sub>2</sub> à travers le cortex nodulaire et ont montré que ce phénomène est influencé par plusieurs contraintes environnementales. Ainsi, la salinité, la sécheresse (Weisz et al., 1987), la déficience en P (Jebara et al., 2005) et l'augmentation de la pression externe de l'O<sub>2</sub> (Vadez et al., 1996) conduisent à la diminution de la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> et à d'autres gaz. La diminution de la pression d'O<sub>2</sub> à l'intérieur des nodules peut protéger la nitrogénase contre son inactivation. En plus, les nodosités sont capables d'adapter à long terme leur conductance à une variation du milieu comme la déficience en P. Ces adaptations correspondent à des modifications dans le développement structural dans le cortex de la nodosité. Jebara et Drevon (2001) ont expliqué la corrélation entre la variabilité génotypique de la tolérance au déficit en P et la conductance nodulaire sous déficience en P. En effet, ces auteurs ont travaillé sur des génotypes de haricot contrastant par leurs réponses au déficit en P et ont montré que l'élévation de la pression en O<sub>2</sub> induit une augmentation considérable de la respiration nodulaire. Ceci varie avec les génotypes et le niveau du P appliqué. Cette respiration était significativement basse sous déficit en P pour toute pression d'O<sub>2</sub> appliquée et pour la plupart des génotypes testés.

En outre, Ribet et Drevon (1995a), ont montré que chez le soja, la déficience en P stimule la respiration nodulaire, en augmentant la conductance du cortex nodulaire à la diffusion de l'O<sub>2</sub>. Cette forte diminution dans la consommation nodulaire en O<sub>2</sub> et sa conductance élevée dans le cortex nodulaire seraient régulées par des cellules spécifiques (Serraj et al., 1995). Ainsi, la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> est osmoréglée par des contractions réversibles des cellules spécifiques du cortex nodulaire déterminant la conductance des nodosités à la diffusion en O<sub>2</sub>, qui augmente sous déficience en P (Ribet et Drevon, 1995a ; Vadez et al., 1996). Cette constatation est déjà expliquée en rapportant que les variations de la conductance nodulaire de la diffusion en O<sub>2</sub> seraient liées à des déformations réversibles des cellules du cortex interne nodulaire (Serraj et al., 1995). Ces auteurs ont également rapporté, chez le soja, une diminution rapide de la conductance nodulaire à l'O<sub>2</sub> en réponse à un stress salin.

#### **4.4. Mécanismes de réponses à la déficience en phosphore**

Comme indiqué précédemment, le P est présent sous de nombreuses formes dans le sol mais seul l'ion orthophosphate peut être directement absorbé par les plantes. Sa faible concentration dans les sols (Hinsinger, 2001) et sa faible diffusion (Schachtman et al., 1998) font que la biodisponibilité de cet ion est un facteur limitant pour la production des agro-écosystèmes. En

réponse à la déficience en P, les plantes mettent en œuvre deux stratégies (Föhse et al., 1988). La première consiste à développer un système d'acquisition plus efficace du P en augmentant la surface d'échange racinaire (Anuradha et Narayanan, 1991) ou en secrétant des acides organiques (Ohwaki et Hirata, 1992) et des phosphatases (Hawkesford et Belcher, 1991) dont le rôle est de dissoudre le P insoluble du sol, phénomènes accrues par la symbiose avec des champignons mycorhiziens. Cette stratégie concerne l'exigence externe en P de la plante, c'est-à-dire la concentration minimale en P de la solution du sol pour une croissance optimale de la plante. La seconde stratégie consiste à optimiser l'efficacité métabolique d'utilisation du P en produisant plus de biomasse ou en fixant plus de N par unité de P consommée (Siddiqi et Glass, 1981 ; Israel et Ruffy, 1988).



**Figure I.5.** Les mécanismes d'adaptation des plantes à la faible disponibilité du P (Lynch et Brown, 2006). (1) Racines adventives plus longues; (2) Racines basales orientées plus horizontalement; (3) Ramification de la racine pivotante; (4) Dispersion des racines latérales supérieures; (5) Production des poils racinaires; (6) Association avec les mycorhizes.

#### 4.4.1. Morphologie et le dynamisme du système racinaire

##### - Architecture racinaire

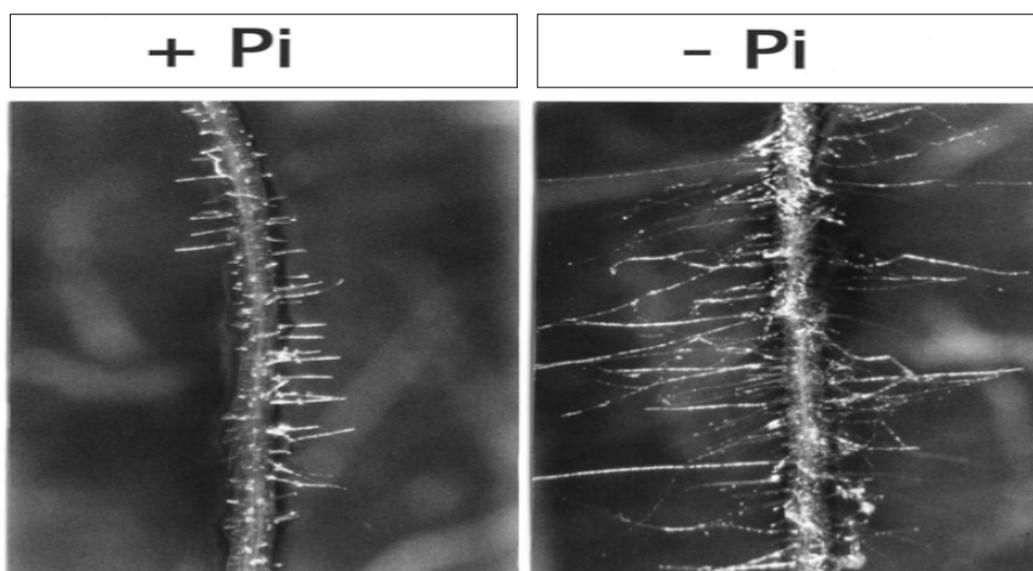
L'architecture du système racinaire résulte de la croissance de la racine primaire, de la vitesse d'émission des racines secondaires et de leur vitesse d'allongement, ainsi que de la durée de ces

différentes phases (Beemster et Baskin, 1998). Étant donné l'immobilité relative de P dans le sol, la configuration spatiale et la vitesse de croissance du système racinaire sont essentielles pour avoir accès continuellement à des nouveaux pools de P disséminés dans les différents horizons du sol. Dans ce contexte, de nombreuses études ont pu mettre en évidence des changements nets à la fois sur la croissance et l'architecture racinaire en réponse à une déficience en Pi (Lynch, 1995). Des sols à faible disponibilité en P modifient la croissance et l'architecture du système racinaire types (Hodge, 2009). En conditions de déficience en P, 90% du Pi total acquis par les plantes est mobilisé par les poils racinaires. Les poils absorbants ont un diamètre plus petit et se développent perpendiculairement à l'axe des racines, qui leur permettent une meilleure exploration du sol et une bonne absorption de Pi.

Les travaux de Jackson et al. (1990) montrent les effets d'une répartition localisée du P dans le sol sur la prolifération et la croissance du système racinaire au niveau de ces points de nutrition chez plusieurs espèces pérennes d'Amérique du nord. De la même façon, des études ont été réalisées sur le haricot commun afin de sélectionner des génotypes dont les traits architecturaux permettaient une meilleure adaptation aux sols appauvris en P (Lynch et Brown, 2001). Parmi ces traits architecturaux, la trajectoire gravitropique des racines basales, l'enracinement accidentel, la dispersion des racines latérales et la plasticité de ces processus en réponse aux variations de disponibilité en P contribuent à l'efficacité d'absorption de P chez cette espèce. De même, Jackson et al. (1990) ont montré une forte croissance des racines dans les horizons du sol riches en matière organique.

La disponibilité de P exerce un effet très marqué à la fois sur l'évolution architecturale et la dynamique de croissance du système racinaire. En effet, Lopez-Bucio et al. (2003) ; Pérez-Torres et al. (2008) ; Akthar et al. (2008) ont montré que chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et chez différents cultivars de colza cultivés sous faible disponibilité en P, une réduction de la croissance de la racine primaire et une augmentation du nombre et de la longueur des racines latérales.

Un tel profil de croissance permet une meilleure exploration par les racines latérales des couches superficielles du sol. Toutefois, une forte biodisponibilité du P dans le milieu extérieur induit également des modifications de l'architecture racinaire. Ainsi, dans les parcelles naturelles où des pratiques de fertilisation annuelle et répétitive se mettent en place, on peut observer des changements significatifs de la biomasse racinaire, du diamètre racinaire et de la taille des racines fines comparés à des parcelles non fertilisées (Bakker et al., 2009).



**Figure 1.6.** La déficience en Pi entraîne des changements morphologiques des poils absorbants. Racines d'*Arabidopsis* après 10 jours de croissance en boîte pétri avec 5mM (+Pi) ou 5μM (-Pi) (Poirier et Bucher, 2002).

#### - Production de poils racinaires

Les poils racinaires sont des cellules différenciées d'une assise subcellulaire des cellules épidermiques qui sont importants dans l'acquisition des éléments nutritifs relativement immobiles tels que le P (Peterson et Farquhar, 1996 ; Gilroy et Jones, 2000 ; Jungk, 2001). Plusieurs éléments de preuve indiquent que les poils racinaires contribuent à l'acquisition de P. La formation et la croissance des poils racinaires sont régulées principalement par l'apport de nutriments minéraux, en particulier le  $\text{NO}_3^-$  et le P (Gilroy et Jones, 2000 ; Jungk, 2001). Chez les légumineuses, la déficience en P augmente la densité et la longueur des poils racinaires (Jungk et al., 1990). La longueur moyenne des poils racinaires d'*Arabidopsis* déficient en P a été trois fois plus élevée par rapport celle des plantes suffisantes en P. Grierson et al. (2001) indiquent qu'au moins 40 gènes chez *Arabidopsis* affectent l'initiation et le développement des poils racinaires en réponse à la déficience en P.

Tout d'abord, la modélisation mathématique indique que les poils racinaires accroissent l'acquisition de Pi de la solution du sol, en élargissant l'aire de surface d'absorption de la racine et l'exploration d'un plus grand volume de sol. Des preuves indirectes d'autoradiographie démontrent que les poils racinaires augmentent la taille de la zone de déplétion au  $^{32}\text{P}$  autour des racines (Bhat et Nye, 1974). Plus récemment, la preuve directe a été fournie pour l'absorption de P par les poils racinaires (Gahoonia et Nielsen, 1997). Les poils racinaires aident également à la dispersion des exsudats racinaires tels que les acides organiques dans la rhizosphère, qui

améliorent la biodisponibilité de P dans de nombreux sols (Hinsinger, 2001 ; Ryan et al., 2001).

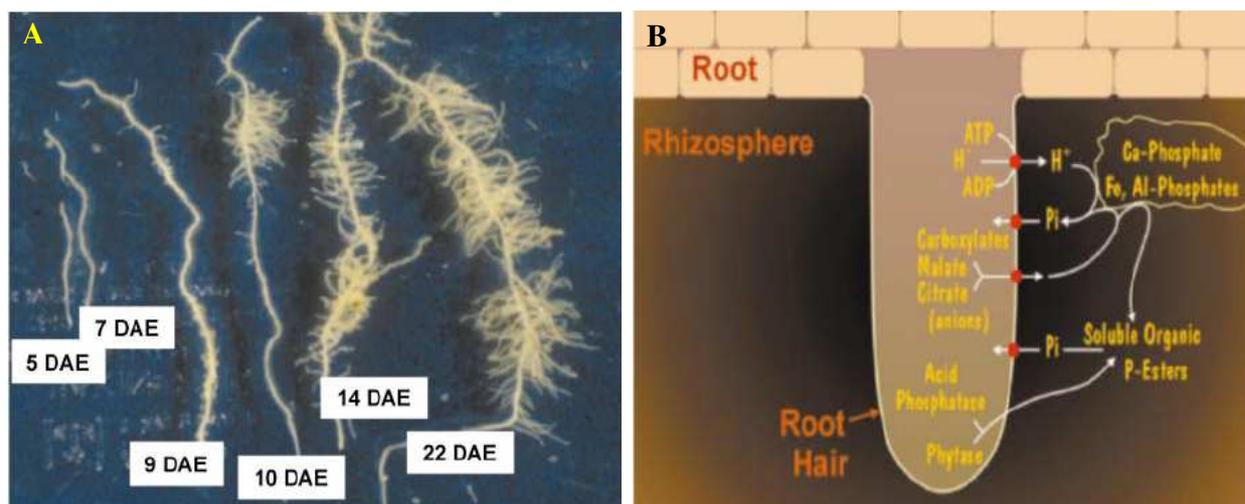
Des mutants d'*Arabidopsis* et d'orge manquant de poils racinaires sont sévèrement altérés par l'absorption de P (Bates et Lynch, 2000 ; Gahoonia et Nielsen, 2003). De la même façon la longueur des poils racinaires et leur densité sont très contrôlées par la biodisponibilité du P. La modélisation géométrique indique que les réponses des poils racinaires à la disponibilité en P interagissent en synergie pour améliorer l'acquisition de P (Ma et al., 2001). La variation entre les espèces en longueur des poils racinaires est corrélée avec l'acquisition de P (Föhse et al., 1991 ; Gahoonia et al., 1999). La même corrélation est observée avec la variation intraspécifique entre les génotypes de trèfle blanc (Caradus, 1981), l'orge (Gahoonia et Nielsen, 1997) et le haricot commun (Yan et al., 2002).

#### - *Formation de racines protéoïdes*

Les racines protéoïdes sont des structures racinaires particulières que l'on retrouve majoritairement chez les plantes de la famille des Protéacées et dans plusieurs autres familles végétales telles que Betulaceae, Casuarinaceae, Cucurbitaceae, Cyperaceae, Eleagnaceae, Leguminosae, Moraceae, Myricaceae et Restionaceae (Neumann et Martinoia, 2002 ; Lamont, 2003 ; Shane et Lambers, 2005 ; Lambers et al., 2006). Ces structures sont constituées d'un regroupement très compact de plusieurs radicelles latérales de quelques millimètres de longueur sur une section de la racine permettant ainsi d'augmenter considérablement la surface d'absorption de la racine. Les espèces végétales qui forment des racines protéoïdes ne font pas généralement des associations mycorhiziennes (Skene, 1998).

Les racines protéoïdes représentent un mécanisme unique pour l'acquisition de P dans les environnements extrêmement pauvres en P. La formation de ces structures racinaires est stimulée par la déficience en P dans la majorité des espèces et qui s'accompagne par la sécrétion des acides organiques, les ions H<sup>+</sup> et les acides phosphatases (Skene, 2001; Neumann et Martinoia, 2002 ; Lamont, 2003 ; Vance et al., 2003).

En effet, les valeurs de surface d'absorption et de volume d'exploration du sol par une racine présentant une structure en forme protéoïde chez *Leucadendron laurosum* étaient respectivement 140 et 300 fois plus élevées comparées à celles d'une même longueur racinaire ne présentant pas cette structure (Lamont, 1983).



**Figure 1.7.** Les racines protéoïdes de lupin blanc et les mécanismes biochimiques déroulent dans ces racines pour améliorer la disponibilité du P dans le sol. (A) Les différents stades de développement des racines protéoïdes ; (B) Les adaptations biochimiques qui se produisent dans les racines protéoïdes impliquent l'excrétion des protons, des acides organiques et des enzymes dans la rhizosphère en réponse à la déficience en P (Johnson et al., 1996).

#### 4.4.2. Exsudats racinaires

Beaucoup de plantes, en particulier celles qui sont adaptées à la déficience en P, ont développé des mécanismes biochimiques pour solubiliser le P inorganique. Elles produisent et sécrètent des acides organiques dans la rhizosphère (Shane et Lambers, 2005). Il existe de nombreuses formes d'acides organiques (citrique, malonique, oxalique, formique...) et les formes sécrétées sont en fonctions de l'espèce de la plante, de son âge mais aussi des conditions physico-chimiques de l'environnement (Jones, 1998). Des espèces telles que le sarrasin, le colza et les légumineuses sont très efficaces dans l'utilisation du P en tant que source de Pi en libérant des acides organiques (Hinsinger, 2001). Ce phénomène a été étudié en détail chez les Proteaceae et de lupin blanc qui sont capables de former des racines protéoïdes (Johnson et al., 1996 ; Vance et al., 2003 ; Shane and Lambers, 2005). En général les dicotylédones, en particulier les légumineuses, sont plus efficaces que les monocotylédones dans la production et l'excrétion des acides organiques dans la rhizosphère en réponse à la déficience en P.

La production et la sécrétion des acides organiques par les racines protéoïdes concordent avec la production de phosphatases, la libération de protons, et l'expression des transporteurs à haute affinité en Pi (Yan et al., 2002 ; Vance et al., 2003).

Ainsi, de nombreuses études montrent une forte corrélation entre l'augmentation de la concentration en acides organiques sécrétée dans le milieu extérieur et l'amélioration de la

nutrition en P chez la plante en présence de P minéral (Neumann et Römheld, 1999 ; Shu et al., 2007). En culture hydroponique, Hoffland (1992) a montré chez le colza que la sécrétion de citrate et de malate s'accompagne de la solubilisation d'un phosphate naturel, la phosphorite. La zone d'excrétion des acides organiques est normalement située 1-2 cm derrière l'extrémité de la racine, et la zone la plus intéressante de l'excrétion est la région de la racine qui est directement en contact avec la roche phosphatée (Hoffland, 1992).

#### 4.4.3. Sécrétion des phosphatases et phytases

L'activité des phosphatases acides (APases) intracellulaires ou extracellulaires semble être une réponse vis-à-vis de la faible disponibilité en P et jouent un rôle important dans la production, le transport et la remobilisation du Pi (Turner et Plaxton, 2001). Les APases extracellulaire présentent généralement une large spécificité au substrat, alors que les APases intracellulaire sont beaucoup plus spécifiques dans leur fonction (Duff et al., 1994). Les APases sont largement distribuées dans les cellules de la plante, principalement dans les vacuoles, l'apoplasme (Li et Tadano, 1996), le cytoplasme et les plastes (Turner et Plaxton, 2001). Ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons esters phosphoriques et d'anhydrides des composés organiques libérant ainsi du Pi au voisinage de la racine. Ainsi, il est estimé que 70 à 80% des APases sécrétées dans la rhizosphère sont d'origine bactérienne (Plante, 2005). En règle générale, les APases acides prédominent dans les sols acides, alors que les APases alcalines sont plus abondantes dans les sols neutres et calcaires (Juma et Tabatabai, 1988 ; Renella et al., 2006).

Plusieurs études ont démontré que l'augmentation de l'activité APase autour de la racine entraînait la formation d'une zone de déplétion en P organique traduisant ainsi l'efficacité de ces enzymes à libérer du Pi à partir du P organique au profit de la racine (Tarafdar et Jungk, 1987 ; George et al., 2006). Toutefois, Tarafdar et Jungk (1987) ont montré que cette zone de déplétion s'effectuait à une distance proche de la racine, soit 0,8 mm pour le trèfle et 1,5 mm pour le blé, impliquant que le volume de sol exploré autour de la racine par les enzymes reste limité.

L'augmentation de l'activité APase sous déficience en P apparaît être corrélée avec une augmentation de l'expression des gènes codant pour des APases acides (Wasaki et al., 1999 ; Baldwin et al., 2001 ; Miller et al., 2001). Une famille de 29 gènes partagée dans 44 domaines conservés des APases acides pourpres a été identifiée dans le génome d'*Arabidopsis*. Deux membres de cette famille (*AtPAP11* et *12*) ont été induits dans des conditions de déficience en P (Li et al., 2002). Certains des APases induites en déficit de P peuvent également être impliquées

dans la déphosphorylation de protéines, un élément important de la transduction du signal. Dans ce contexte, un des gènes de la tomate (*LePS2*) induit en réponse à la déficience en P peut représenter cette catégorie des APases (Baldwin et al., 2001).

Ainsi, les phytases constituent une famille particulière des APases hydrolysant l'acide phytique qui constitue la principale forme de réserve en P chez les plantes (Raboy, 2003) et peut donc être présent en grande quantité dans les sols (Turner et al., 2003). En se basant sur les similarités de ses séquences d'acides aminés et les mécanismes catalytiques, au moins quatre familles de phytases ont été distinguées, incluant phosphatase histidine acide (HAP), phosphatase acide pourpre (PAP),  $\beta$ -propeller phytase (BPP) et phosphatases cystéine (Ma et al., 2009).

Au niveau de la symbiose rhizobienne, des études récentes ont permis de mettre en évidence l'importance de ces enzymes sous contraintes abiotiques telle que la déficience des sols en P. Dans ce contexte et sous limitation en P, Kouas et al. (2008) et Lazali et al. (2013) ont noté une augmentation importante de l'activité APase et phytase nodulaires chez le haricot. D'une façon générale, l'activité phytase est plus faible que l'activité APase et n'en présente qu'environ 5% (Kouas et al. 2008). Dans le même sens, Araújo et al. (2008) ont montré que sous suffisance en P, l'activité phytase ne constituait que 3% de l'activité APase, tandis que sous déficience en P, cette proportion atteint 5%. Ceci suggère que les phytases représentent un groupe des APases et que l'augmentation de leurs activités enzymatiques dans les nodosités de haricot, soumises au déficit en P, constituerait un mécanisme adaptatif pour l'adaptation au déficit en P chez les légumineuses fixatrices de  $N_2$  (Lazali et al., 2013).

#### **4.4.4. Expression accrue des transporteurs de Pi à haute affinité**

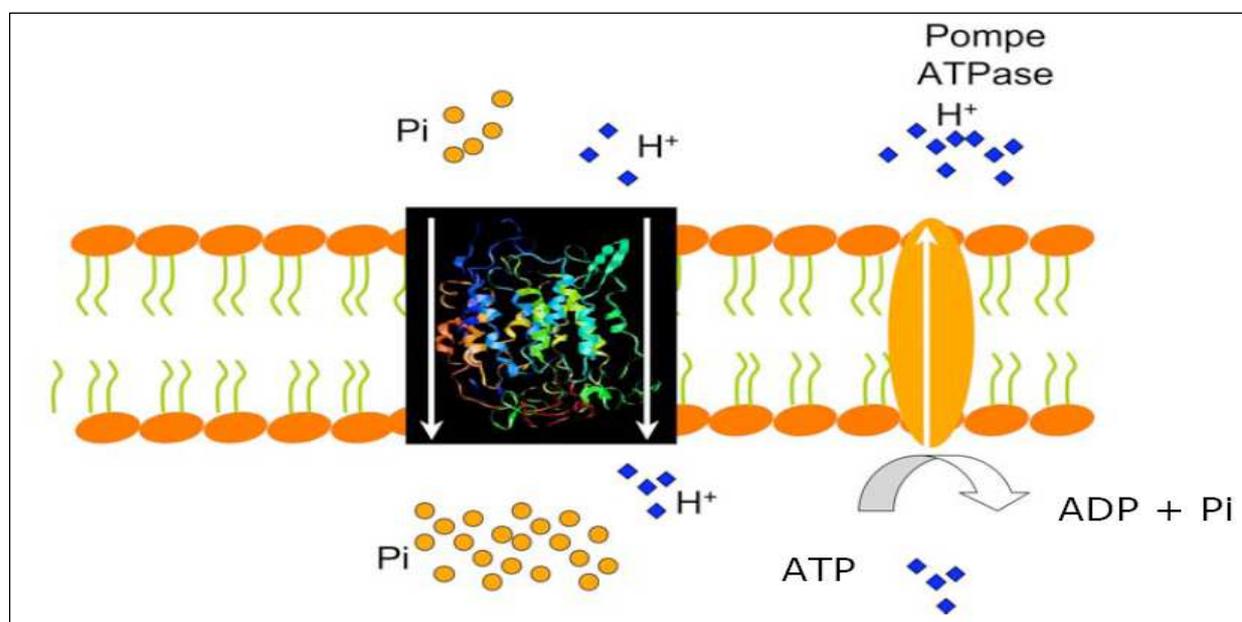
La concentration de P dans les cellules de la racine peut être jusqu'à 1000 fois plus élevée que sa concentration dans la solution du sol. Dans le but d'acquérir le P contre ce gradient de concentration, le transport du P à travers l'interface sol-racine a besoin d'un système de transport spécialisé. Chez les plantes, deux systèmes d'absorption de P ont été identifiés, un système de haute affinité qui est soit augmenté ou réprimé sous déficience en P et un système de faible affinité qui est exprimé de façon constitutive (Rausch et Bucher, 2002). Il est admis que la majorité des transporteurs de Pi impliqués dans l'absorption du P au niveau de l'interface racine-sol sont à haute affinité tandis que ceux responsables de la mobilisation du Pi interne de la plante sont à basse affinité (Daram et al., 1999).

Les transporteurs de Pi sont des protéines localisées dans la membrane plasmique responsables de l'absorption du Pi circulant dans la solution du sol. Les plantes peuvent posséder plusieurs

transporteurs de  $P_i$  pour chaque système. Par exemple, neuf gènes de transporteurs ont été clonés chez *Arabidopsis*, au moins cinq de pommes de terre et jusqu'à huit à partir d'orge. Tous les gènes clonés sont membres de la famille des transporteurs *PhT1* et sont hautement conservés (Rausch et Bucher, 2002).

Plusieurs études ont montré l'expression des gènes *PhT1* sous déficience en P dans différents organes, y compris la racine, les tissus aériens et les organes de reproduction, mais la haute expression se trouve dans les poils racinaires (Mudge et al., 2002). De plus, ce profil d'expression a été rapporté pour plusieurs autres gènes codant pour un transporteur de  $P_i$  à haute affinité comme *PIT1* chez *Catharanthus roseus* (Kai et al., 1997) et *StPT1* chez *Solanum tuberosum* (Leggewie et al., 1997) indiquant leur implication potentielle dans la translocation du  $P_i$  interne.

Ainsi l'adaptation d'une plante à un sol présentant de fortes variabilités de concentrations en  $P_i$  nécessite obligatoirement une capacité à réguler l'expression et la fonctionnalité des gènes codant pour des transporteurs de  $P_i$  à haute affinité au niveau de la racine. La hausse de l'expression de ces gènes permet une optimisation de l'absorption du  $P_i$  dans la solution du sol en conditions de déficience en P (Daram et al., 1998 ; Raghothama, 2000). A l'inverse, la répression de l'expression de ces gènes permet d'éviter une exposition à la toxicité dans des sols riches en P (Shane et al., 2004 ; Lambers et al., 2008).

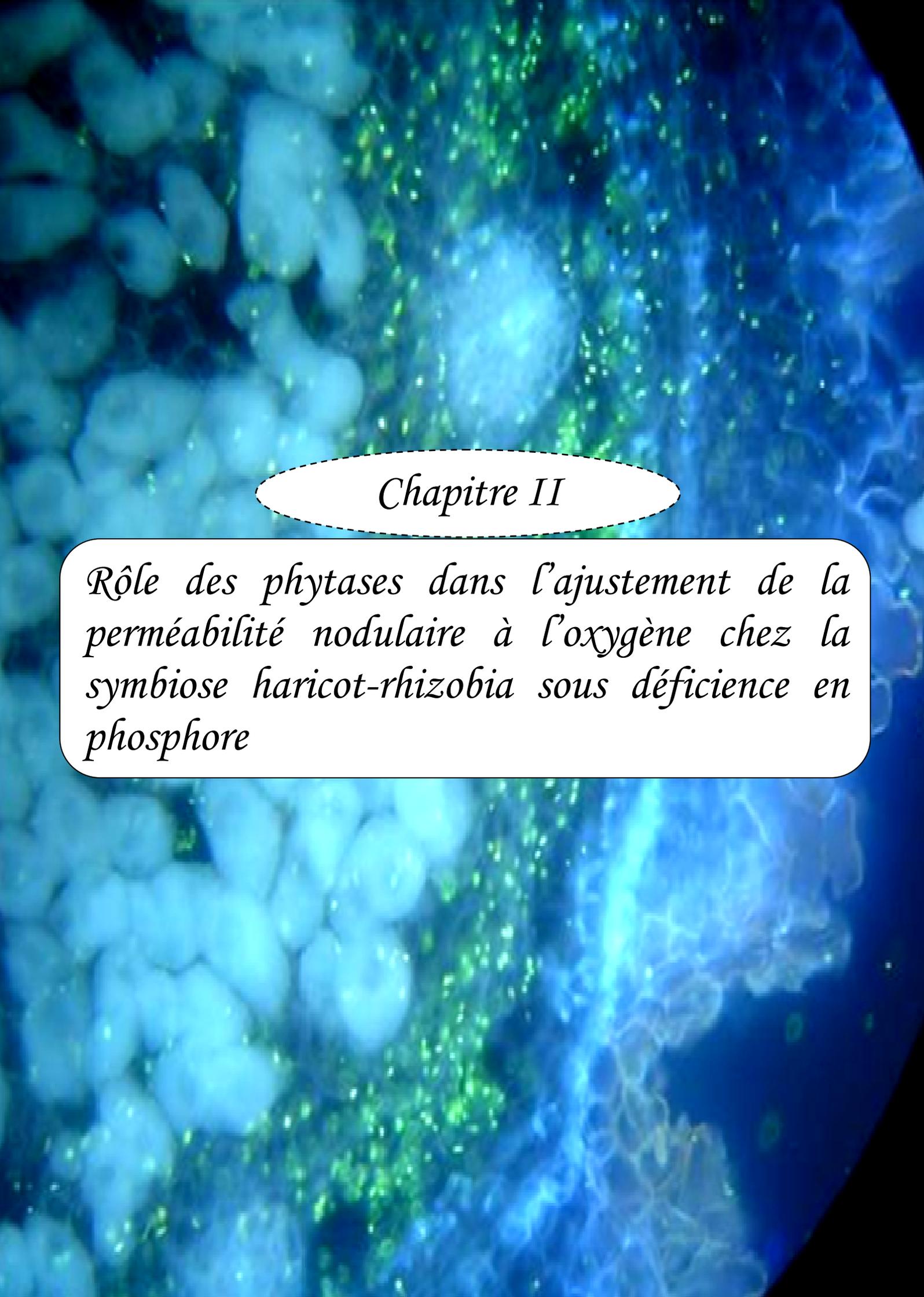


**Figure I.8.** Représentation d'un transporteur de  $P_i$  de la famille *PhT1* au sein d'une membrane plasmique. L'énergie nécessaire au système actif, est obtenue par une pompe *ATPase* qui engendre un gradient de protons. Les protons sont transportés dans la même direction que le  $P_i$  à travers le transporteur (Poirier et Bucher, 2002).

## **5. Conclusion**

Cette synthèse bibliographique souligne l'importance du haricot en tant que légumineuse à graines très consommée dans le monde, mais aussi pour son extrême diversité en terme de variabilité morphologique et génétique conférant une souplesse de son utilisation et sa culture au sein des environnements auxquels elle est adaptée. Quoique cette espèce est connue par sa faible capacité de fixation d'azote, Hardarson et al. (1993) ont montré que certaines lignées présentent un bon potentiel de fixation d'azote même sous contraintes environnementales. Généralement, du fait de sa production sous des contraintes environnementales sévères (sécheresse, salinité, faible disponibilité en P et en N), les rendements de cette culture sont en dessous de son potentiel. Cette situation est largement expliquée par l'irrégularité de la nodulation chez cette légumineuse malgré la grande diversité des rhizobia qui peuvent la noduler. La limitation de son rendement semble aussi être due à l'insuffisance de sa FSN pour la croissance et la production, d'où la nécessité de sélectionner des symbioses haricot-rhizobia performantes sous conditions de culture difficiles.

Dans le cadre d'une agriculture durable, le développement de cultivars tolérants et particulièrement des symbioses rhizobiennes performantes est l'une des approches les plus envisageables pour réduire les effets délétères de diverses contraintes biotiques et abiotiques dont la déficience en P. A travers cette étude bibliographique, l'adaptation à la déficience en P est un phénomène complexe qui intègre aussi bien des modifications morphologiques que des ajustements physiologiques et biochimiques dont les phosphatases, par exemple, représentent une approche largement étudiée par la communauté scientifique. L'identification des symbioses efficaces sous contraintes environnementales, principalement, en conditions réelles au champ pourrait contribuer à garantir un rendement convenable.

The background of the slide is a microscopic image of plant cells, showing a grid of cells with distinct cell walls. The image is tinted with a blue and green color scheme. A white oval with a dashed border is centered in the upper half of the slide, containing the chapter title. Below it, a white rounded rectangle with a solid border contains the main title of the chapter.

## *Chapitre II*

*Rôle des phytases dans l'ajustement de la perméabilité nodulaire à l'oxygène chez la symbiose haricot-rhizobia sous déficience en phosphore*

---

## *Rôle des phytases dans l'ajustement de la perméabilité nodulaire à l'oxygène chez la symbiose haricot-rhizobia sous déficience en phosphore*

---

### **1. Introduction**

Il est reconnu que la fixation symbiotique d'azote (FSN) par les légumineuses joue un rôle primordial dans le maintien de la productivité des cultures et l'amélioration de la fertilité des sols. Toutefois, cette phénoménale caractéristique des légumineuses est particulièrement sensible à certaines contraintes environnementales telles que la faible disponibilité des sols en phosphore (P) (Serraj et Adu-Gyamfi, 2004) qui affecte 33% des surfaces cultivées dans le monde (Graham et Vance, 2003). Cette contrainte affecte spécialement la FSN par limitation de la croissance et la survie des rhizobia (O'Hara et al., 1988), la formation des nodosités (Drevon et Hartwig, 1997) et leur fonctionnement (Tang et al., 2001) et la croissance de la plante hôte (Tsvetkova et Georgiev, 2003).

Les légumineuses ont mis au point un certain nombre de mécanismes d'adaptation à la déficience en P, y compris le maintien de concentrations élevées de P aussi bien dans les nodosités que dans les autres organes de la plante (Pereira and Bliss, 1989), une augmentation de la fixation de N<sub>2</sub> par unité de masse nodulaire afin de compenser la faible nodulation (Almeida et al., 2000) et une augmentation importante de l'activité des phosphatases (APases) et phytases nodulaires (Araujo et al., 2008). L'activité des phosphatases intracellulaires ou secrétées semble être une réponse vis-à-vis de la faible disponibilité en P et joue un rôle important dans la production, le transport et la remobilisation du P inorganique (Pi) (Turner et Plaxton., 2001).

Les phytases constituent une famille particulière de phosphatases hydrolysant l'acide phytique qui constitue la principale forme de réserve en P chez les plantes (Raboy, 2003). Il peut donc être présent en grande quantité dans le sol (Turner et al., 2003). Des études récentes ont permis de mettre en évidence l'importance de ces enzymes sous contraintes abiotiques telle que la déficience des sols en P. Dans ce contexte et sous limitation en P, Kouas et al. (2008) et Mandri et al. (2012) ont noté une augmentation importante de l'activité APase et phytase nodulaires chez le haricot. Ceci suggère que l'augmentation de ces activités enzymatiques dans les nodosités de haricot, soumises au déficit en P, constituerait un mécanisme adaptatif pour la tolérance des légumineuses fixatrices de N<sub>2</sub> au déficit en P (Lazali et al., 2013).

Dans la symbiose rhizobienne, la nodosité constitue un environnement microaérobie favorable à la nitrogénase, enzyme bactérienne catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac. Cependant, les quantités d'ATP nécessaires à l'activité nitrogénase sont si élevées que la fixation de  $N_2$  apparaît limitée par le flux diffusif d' $O_2$  intranodulaire (Drevon et al., 1988 ; King et Layzell, 1991). En conséquence, un paramètre essentiel du fonctionnement de la symbiose, ainsi que son adaptation aux variations environnementales serait la régulation de la concentration intranodulaire d' $O_2$  (Hunt et Layzell, 1993). Cette régulation dépend en partie de la très faible perméabilité des nodosités à l' $O_2$  (Minchin, 1997) qui est très sensible à des facteurs du milieu tels que la salinité (Serraj et al., 1994) et la teneur en P assimilable (Ribet et Drevon, 1995b). Ainsi, la FSN exige plus de  $P_i$  pour une activité nodulaire optimale par rapport à une croissance soutenue par l'assimilation directe des nitrates. Ces exigences énergétiques eu égard à la réduction de  $N_2$  par le système nitrogénase indique le rôle crucial du  $P_i$  dans le fonctionnement des nodosités et sa régulation par la perméabilité nodulaire à l' $O_2$  (Rotaru et Sinclair, 2009 ; Schulze et Drevon, 2005). Cette dernière s'est montrée importante chez les plantes de soja (Ribet et Drevon, 1995a) et de haricot (Vadez et al., 1996) soumises au déficit en P. Aussi, les plantes de luzerne se sont adaptées au déficit en P en formant des nodosités de petite taille dont la perméabilité à l' $O_2$  est élevée, supportant une augmentation de la consommation nodulaire en  $O_2$  par unité de  $N_2$  fixé (Schulze et Drevon, 2005). Egalement, la perméabilité nodulaire à la diffusion de l' $O_2$  est associée à l'ajustement de la taille des cellules corticales nodulaires dont la régulation est assurée par des réactions d'osmorégulation (Serraj et al., 1994; Drevon et al., 1998) qui semblent constituer le site principal d'ajustement de la perméabilité nodulaire à la diffusion des gaz (Hunt et Layzell, 1993; Galvez et al., 2000).

Ainsi, bien que des études récentes aient adressé l'effet de la déficience en P sur la perméabilité nodulaire en  $O_2$ , très peu d'informations sont disponibles concernant la relation entre l'induction de l'activité phytase et la perméabilité des nodosités à la diffusion en  $O_2$ . Notre démarche se base sur l'aptitude des nodosités à emmagasiner des teneurs importantes en  $P_i$  libérées par la phytase sous déficience en P (Araujo et al., 2008 ; Lazali et al., 2013) prouvant, en partie, le rôle présumé important de cet élément dans le fonctionnement nodulaire y compris la perméabilité nodulaire en  $O_2$  (Schulze et Drevon, 2005) qui est, parmi d'autres, un régulateur déterminant de la FSN (Schulze, 2004). En outre, cette étude constitue une continuité des travaux antérieurs de Bargaz et al. (2013b) qui ont signalé une variabilité génotypique dans les activités phytases nodulaire et qui semblent jouer un rôle intéressant dans l'adaptation de la symbiose rhizobienne à la déficience en P.

## 2. Matériel et méthodes

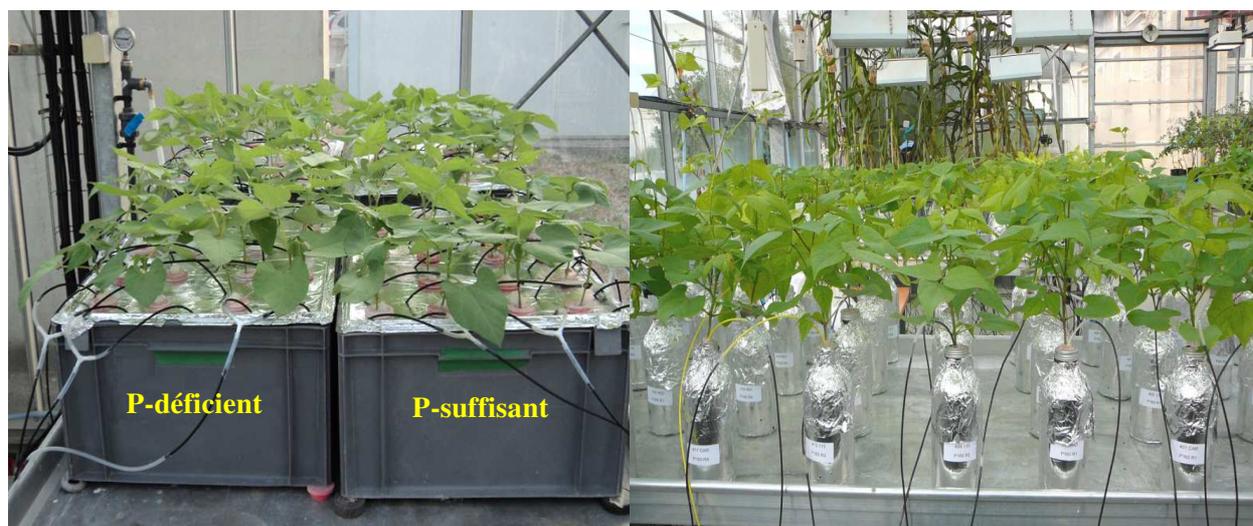
### 2.1. Culture de la symbiose rhizobienne

L'expérimentation est conduite en culture hydroaéroponique sous serre à une température moyenne autour de 30°/25°C (jour/nuit), 16 h de photopériode et une humidité relative journalière de 70%. Ces conditions permettent l'expression optimale du potentiel génétique de la FSN tout en contrôlant d'une manière assez étroite la nutrition minérale principalement pour N et P mais aussi pour les autres éléments (Vadez et al., 1996).

Six lignées recombinantes i.e. RILs 147, 115, 104, 83, 34 et 29 de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) sont utilisées dans cette étude. Elles ont été caractérisées comme des génotypes P-éfficients (RILs 115, 104 et 34) et P-inefficient (RILs 147, 83 et 29) (Drevon et al., 2011). Ces lignées contrastantes ont été sélectionnées dans l'objectif de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation du haricot à la déficience des sols en P.

Les graines des six lignées sont stérilisées avec de l'hypochlorite de calcium à 3% durant 10 minutes puis rincées cinq fois avec l'eau distillée. Ensuite, les graines stérilisées sont pré-germées sur un papier filtre enroulé, humidifié puis déposé dans un bac légèrement incliné dans une étuve réglée à une température de 28°C et humidifiée. Après 5 jours, les graines germées sont inoculées par incubation pendant 10 min dans 100 ml de *Rhizobium tropici* CIAT899 contenant  $10^9$  bactéries  $\text{ml}^{-1}$ . Elles sont ensuite soigneusement transférées dans des bacs contenant la solution nutritive suivante : 1.65 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.7 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 8.5  $\mu\text{M}$  Fe de séquestrene, 6  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Vadez et Drevon., 2001). Les bacs reçoivent 10 g de  $\text{CaCO}_3$  afin d'ajuster le pH autour de 7. Chaque bac correspond à un niveau de nutrition phosphatée i.e. déficient ( $75 \mu\text{mol semaine}^{-1}\text{plante}^{-1}$ ) et suffisant en P ( $250 \mu\text{mol semaine}^{-1}\text{plante}^{-1}$ ) (Vadez et Drevon., 2001). La baisse du niveau de la solution due à la transpiration durant cette période est compensée par des apports d'eau distillée permettant d'éviter une concentration toxique des éléments minéraux. L'urée 2 mM est ajoutée pendant la transplantation puis 1 mM d'urée est rajouté après 2 semaines lors du premier changement de la solution nutritive. Ces apports servent à pallier la carence azotée qui se produirait entre l'épuisement des réserves cotylédonaires et l'établissement de la symbiose. Il n'inhibe pas la nodulation, à l'inverse du nitrate ou de l'ammonium aux mêmes concentrations (Hernandez et Drevon, 1991). Après la troisième semaine, chaque plante est individuellement transférée dans une bouteille-sérum de 1 litre recouverte de papier aluminium afin d'assurer l'obscurité où la solution nutritive est renouvelée

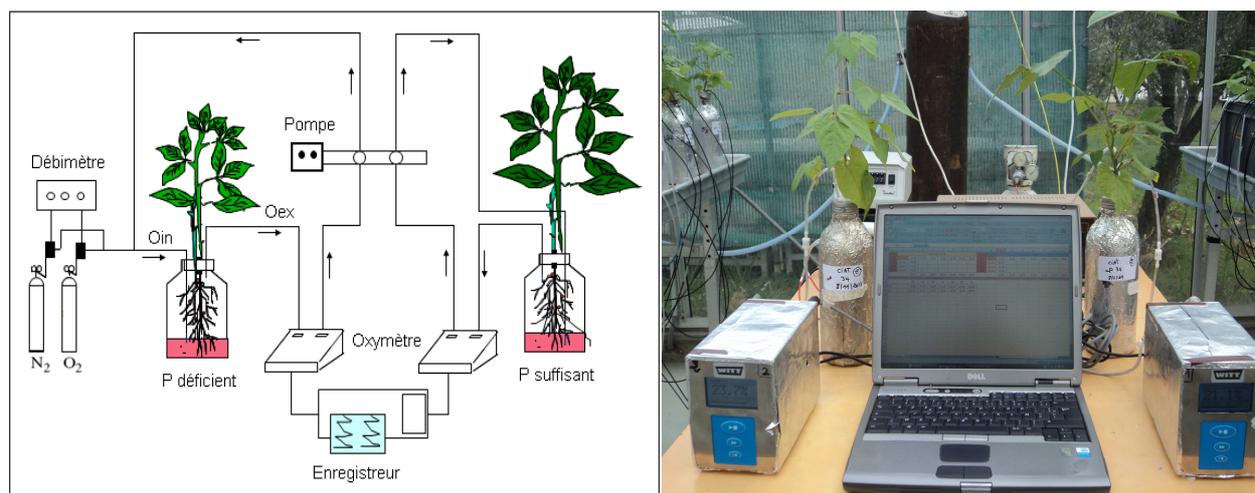
chaque semaine sans apport d'urée (figure II.1). L'oxygénation de la solution de culture est assurée par un flux continu de  $400 \text{ ml min}^{-1}$  de l'air comprimé.



*Figure II.1. Dispositif expérimental de la culture hydroaéroponique du haricot sous serre.*

## 2.2. Consommation nodulaire en oxygène

Le principe de cette mesure in situ consiste à suivre l'évolution de la concentration en  $\text{O}_2$  dans un incubateur étanche, de volume connu et contenant le matériel végétal à tester. Ce système permet d'effectuer simultanément des mesures sur deux plantes grâce à un oxymètre. A la veille de chaque mesure, le volume de la solution nutritive est réduit au tiers du volume total du flacon de culture. Ainsi l'ensemble des nodosités sont en contact avec la phase gazeuse et sont directement exposées à la concentration d'oxygène externe appliquée au début de chaque mesure. Ensuite, les flacons contenant le système racinaire sont étanchéifiés au niveau du collet, les bouchons étant hermétiquement fermés avec un polymère (Rhodorsyl) qui ne présente aucune toxicité pour la plante. Il est apporté initialement à l'état liquide et se solidifie par la suite autour de la tige au niveau du bouchon. Une telle manipulation in situ permet d'éviter toute perturbation à court terme du métabolisme nodulaire, par des chocs mécaniques ou par des modifications de la concentration en  $\text{O}_2$  avant toute mesure. La mesure de la consommation des racines nodulées en  $\text{O}_2$  (Conr) est réalisée à l'aide d'un oxymètre Witt Logger à deux voies (figure II.2). Ce dernier est relié à différents instruments. Une pompe péristaltique assure, d'une part, la circulation de la phase gazeuse entre l'incubateur et l'oxymètre à un débit d'environ  $400 \text{ ml min}^{-1}$ , et d'autre part, elle permet l'homogénéisation de la phase gazeuse.



**Figure II.2.** Dispositif expérimental pour la mesure de la consommation en oxygène par les racines nodulées.

La diminution de la pression d'O<sub>2</sub> durant la phase de confinement est mesurée par l'oxymètre. Chaque valeur enregistrée représente la consommation des racines nodulées par minute tout en notant que, pour chaque concentration en O<sub>2</sub>, la durée allouée à chaque mesure est 30 min. Après chaque 30 min d'exposition à la pression en O<sub>2</sub>, le système est de nouveau balayé par un mélange gazeux (N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>) au moyen d'un débitmètre massique permettant d'établir la pression en O<sub>2</sub> correspondante. Des pressions rhizosphériques en O<sub>2</sub> de 21, 25, 30, 35, 40, 45 et 50 % d'O<sub>2</sub> ont été appliquées pendant l'expérience. Durant chaque phase de confinement, la consommation en O<sub>2</sub> des racines nodulées est calculée toutes les 30 min selon la formule suivante :  $Conr = [(initiale - finale) pO_2] [V/24.2] [60/t]$  exprimée en  $\mu\text{mol O}_2 \text{ consommé h}^{-1} \text{ plante}^{-1}$  avec  $pO_2$  : pression de l'oxygène (%), V : volume de la solution nutritive existante dans le flacon (litre), 24.2 : volume d'une mole de gaz pur dans les conditions expérimentales et t: temps en min, durée de la période de confinement ou encore la durée qui sépare la mesure initiale de la mesure finale.

### 2.3. Mesure de l'activité phytase

L'extraction des phytases est effectuée sur des échantillons de nodosités fraîches d'un diamètre de 3 mm et d'un poids de 60 mg et qui sont soigneusement détachés de racines à 42 jours après la transplantation. Chaque échantillon est broyé séparément dans 900  $\mu\text{l}$  du tampon d'extraction d'acétate de Na (50 mM ; pH 5.5) contenant 5 mM de dithiotriéthol (Aroujo et al., 2008 ; Lazali et al., 2013). L'activité phytase est déterminée dans le surnageant en utilisant comme substrat, l'acide phytique (10 mM ; pH 5.5) provenant du maïs. L'hydrolyse du phytate conduit à la libération d'orthophosphate et d'intermédiaire de phosphate d'inositol. 100  $\mu\text{l}$  d'extrait de

nodosités est incubé pendant 90 min à 37°C avec un mélange de 300 ul de tampon d'acétate de sodium (0.2 M ; pH 5.5) et 100 ul de substrat. La réaction est arrêtée par l'addition de 0.5 ml d'acide trichloracétique à 10%, et le mélange est centrifugé à 20 000 g pendant 6 min. Le blanc est préparé en ajoutant 100 ul d'extrait de nodosités au mélange réactionnel préalablement arrêté au TCA (10%) sans incubation et le mélange est centrifugé. La concentration de Pi libérée est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm en utilisant le vert de malachite. Une gamme étalon est préparée avec des concentrations en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  allant de 0 à 20 mg l<sup>-1</sup>. L'activité phytase est ensuite exprimée en nmol de Pi libéré par min par g de matière fraîche.

#### **2.4. Détermination de la biomasse aérienne, racinaire et nodulaire**

Les plantes sont récoltées au stade début de la formation des gousses après mesure de la consommation nodulaire en O<sub>2</sub>. A la récolte, les parties aériennes et racinaires sont séparées au niveau du nœud cotylédonaire et les nodosités sont détachées des racines et comptées. Chaque partie de la plante est séchée à l'étuve à 60°C pendant 72 heures et pesée. Juste avant le séchage des nodosités, la surface nodulaire est mesurée à l'aide d'un scanner muni d'un logiciel d'analyse automatique d'image WinRhizo. Cette mesure sert pour calculer la conductance à la diffusion nodulaire de l'O<sub>2</sub>, définie comme étant le rapport entre la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> par unité de surface nodulaire. La perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> (mm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>) est déterminée en étant la pente de la régression linéaire établie entre la Conr (μmol O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>) en fonction de la pO<sub>2</sub> (μmol O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>) (Schulze et Drevon, 2005).

#### **2.5. Efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne**

L'efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) est estimée par la pente du modèle de régression de la biomasse des plantes sur la biomasse nodulaire. Dans l'équation de la droite de régression  $y = ax + b$ , **a** représente l'impact de la nodulation sur la biomasse des plantes et **b** est une constante de la biomasse des plantes non liée aux nodosités (Drevon et al., 2011).

#### **2.6. Analyse statistique**

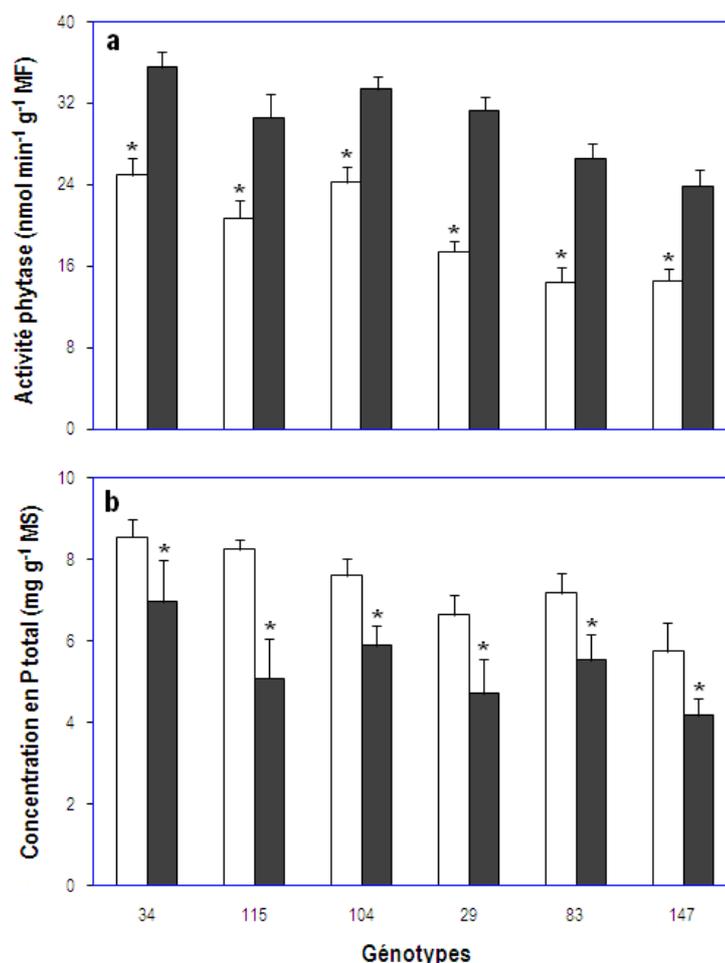
L'analyse des données est réalisée par ANOVA à deux facteurs. La comparaison entre les différentes moyennes est effectuée par le test de Tukey HSD à 5% de probabilité. Les valeurs des paramètres de croissance et ceux liées à la nodulation représentent les moyennes de sept répétitions. Les relations entre les différents paramètres sont testées par analyse de régression linéaire.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Activité phytase et concentration en P total dans les nodosités**

Les résultats illustrés dans la figure II.3a indiquent une augmentation significative de la teneur des nodosités en phytase chez tous les géotypes testés sous déficience en P. L'activité phytase dans les nodosités varie entre 36 et 24 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>MF respectivement, chez la lignée tolérante 115 et sensible 147. Ainsi, de fortes diminutions de 46, 44 et 39% sont notées, respectivement chez les lignées sensibles 147, 29 et 83.

Quant à la teneur nodulaire en P total, des différences évidentes sont notées entre les géotypes et les traitements dans lesquels ils sont cultivés (figure II.3b). Les résultats montrent que ce paramètre diminue significativement chez tous les géotypes cultivés en déficience P. Cette contrainte diminue fortement la concentration des nodosités en P total chez le lignée 115 qui montre une réduction de 38%. Toutefois, la réduction de la concentration des nodosités en P total des lignées 147 et 29 est sensiblement comparable (28%). Egalement, l'ensemble des données indiquent que la concentration moyenne des nodosités en P total diminue de 7.33 mg g<sup>-1</sup> MS sous suffisance en P à 5.56 mg g<sup>-1</sup> MS sous déficience en P.

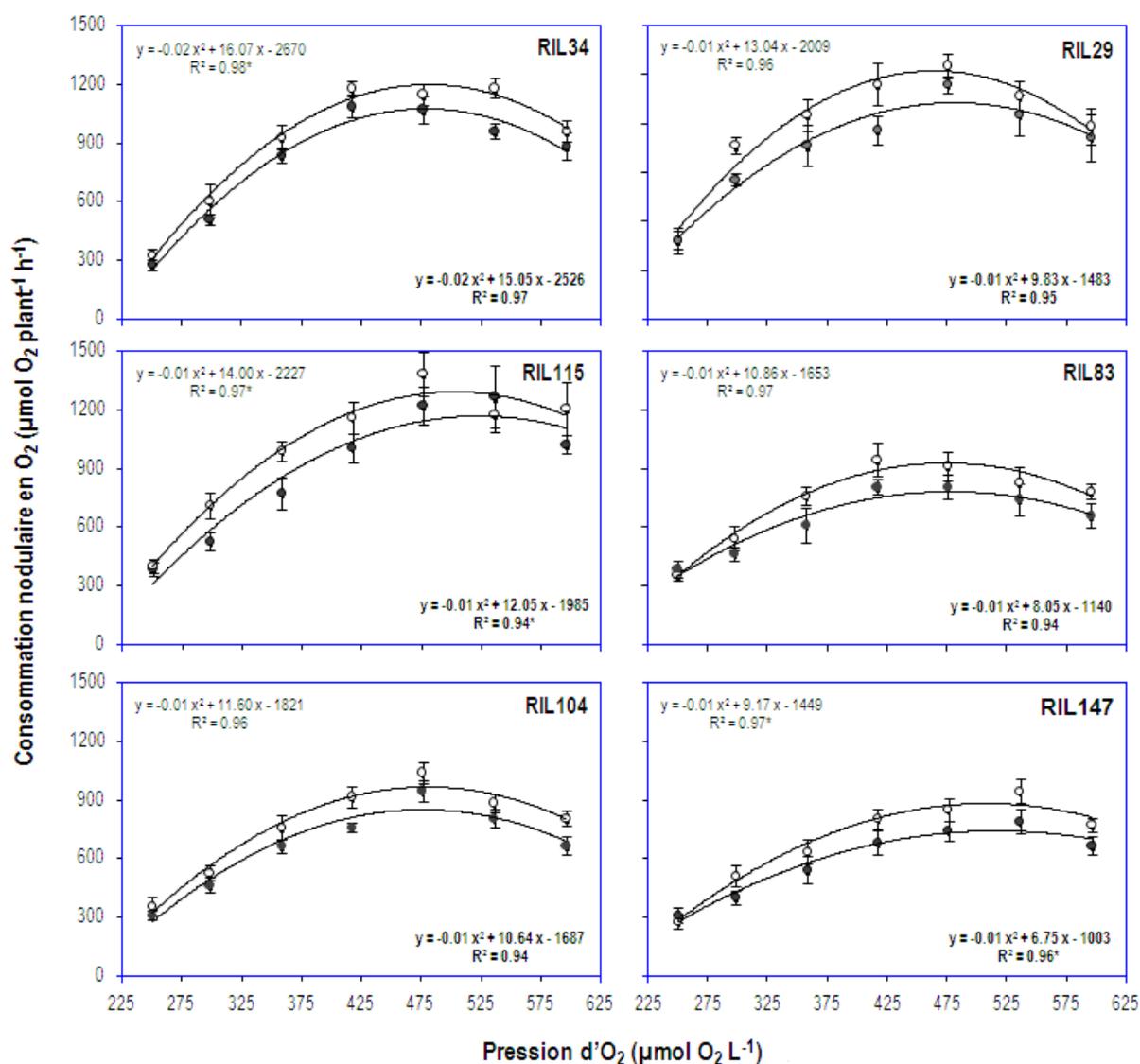


**Figure II.3.** Activité phytase (a) et concentration en P total (b) dans les nodosités de six lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### 3.2. Consommation et perméabilité nodulaire à l'oxygène

La réponse des racines nodulées en termes de la  $C_{onr}$  et la perméabilité nodulaire à l' $O_2$  sous des  $pO_2$  rhizosphériques croissantes est mesurée sous déficience en P (figure II.4). Les résultats montrent que l'élévation de la  $pO_2$  induit une augmentation significative de la respiration nodulaire. Cette  $C_{onr}$  diminue en atteignant la pression critique en  $O_2$  ( $PCO$ ) qui est calculée en étant la première dérivée de la régression curviligne de  $C_{onr}$  en fonction de la  $pO_2$  appliquée. Indépendamment du niveau du P appliqué, les lignées 104, 83 et 29 enregistrent une  $PCO$  comparable de l'ordre de  $476 \mu\text{mol } O_2 \text{ l}^{-1}$ . Cependant, ce paramètre augmente chez les lignées 147 et 34 avec des  $PCO$  plus élevées ( $536 \mu\text{mol } O_2 \text{ l}^{-1}$ ) que celles obtenues pour les autres lignées. En revanche, la lignée tolérante 115 enregistre la même  $PCO$  ( $536 \mu\text{mol } O_2 \text{ l}^{-1}$ ) sous déficit en P, tandis que, sous suffisance en P, elle enregistre la même  $PCO$  que celle obtenue par

les lignées 104, 83 et 29. La déficience en P induit une diminution importante de la Conr des lignées 147 et 34 quelque soit la pO<sub>2</sub> appliquée. Aussi, sous les mêmes conditions, ce paramètre diminue légèrement chez les lignées 115, 83 et 29 et que cette réduction devienne significative quand leurs nodosités se trouvent soumises à des pO<sub>2</sub> comprises entre 298 et 417 μmol l<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>. En parallèle, la Conr de la lignée tolérante 104 ne montre aucune différence significative entre les deux traitements en P. En outre, sous pO<sub>2</sub> ambiante (250 μmol l<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>), la Conr varie légèrement entre les lignées et les niveaux du P appliqués. Ainsi, elle diminue considérablement chez les lignées 147, 83 et 34 en comparaison avec les lignées tolérantes 115 et 104 soumises au déficit en P tandis qu'aucune différence n'est observée pour la lignée 29.

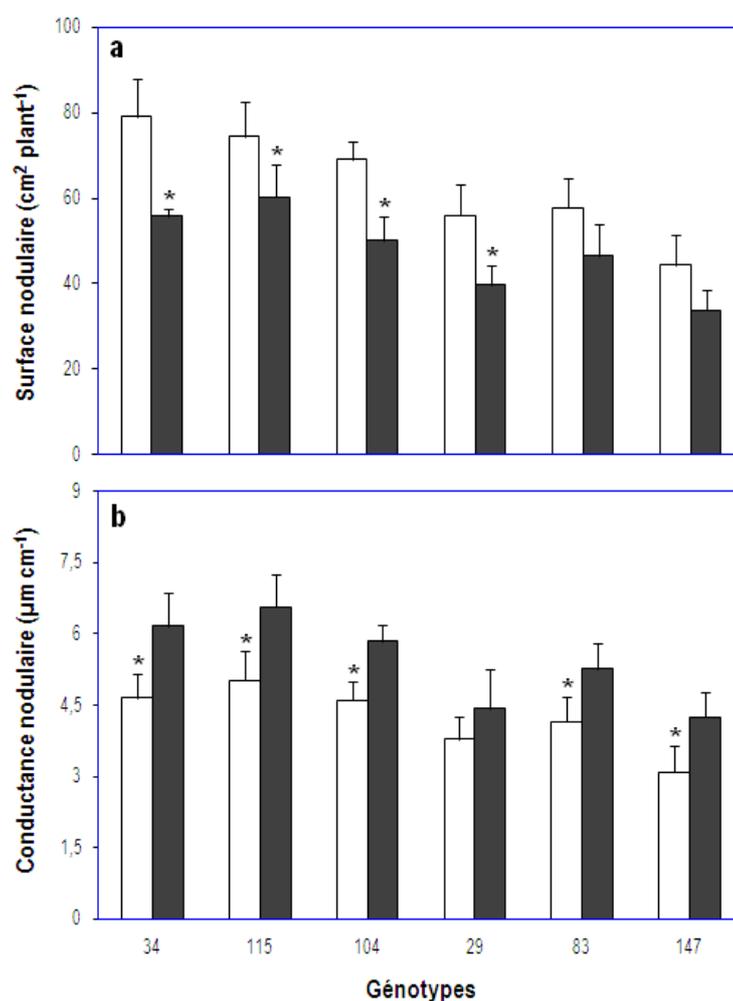


**Figure II.4.** Consommation nodulaire en oxygène de six lignées recombiantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions.

### 3.3. Conductance nodulaire à la diffusion de l'oxygène

Les résultats illustrés dans la figure II.5a montrent que sous déficience en P, la surface nodulaire diminue pour l'ensemble des lignées testées et cette diminution (25%) n'est significative que pour les lignées 115, 104, 34 et la lignée sensible 29. Cependant, quelque soit le niveau du P appliqué, la surface nodulaire est relativement faible pour la lignée sensible 147 en comparaison avec les autres lignées.

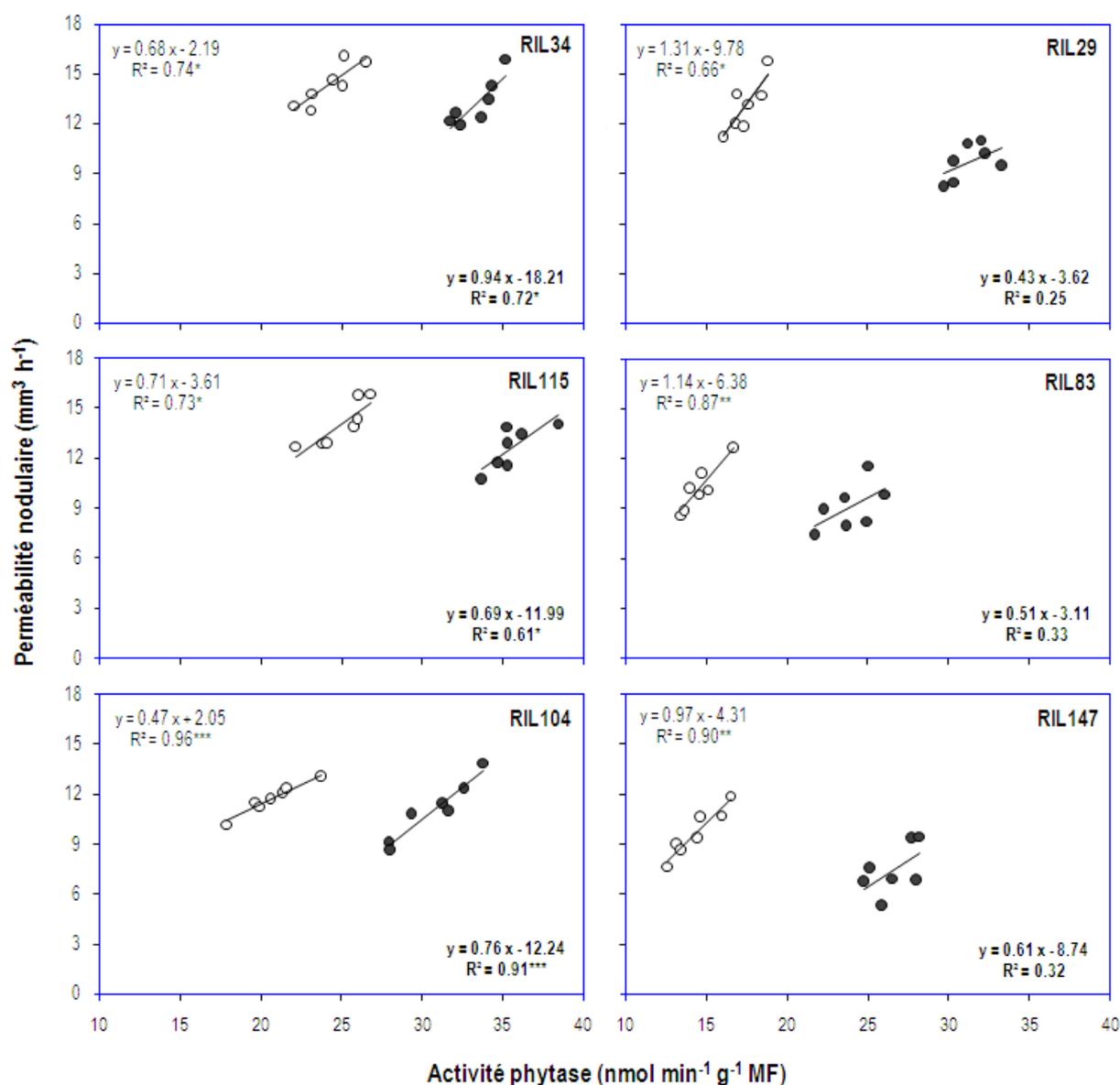
La conductance à la diffusion nodulaire de l'O<sub>2</sub> (rapport entre la perméabilité nodulaire et unité de surface nodulaire), augmente significativement chez toutes les lignées cultivées sous déficit en P à l'exception de la lignée sensible 29 (figure II.5b). Les nodosités des lignées sensibles 147, 83 et 29 enregistrent la plus faible conductance quelque soit l'apport en P.



**Figure II.5.** Surface nodulaire (a) et conductance à la diffusion nodulaire de l'oxygène (b) de six lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### **3.4. Relation entre l'activité phytase et perméabilité nodulaire à l'oxygène**

L'analyse des régressions linéaires illustrées dans la figure II.6 révèle une relation positive entre l'activité phytase des nodosités et leur perméabilité à l'O<sub>2</sub>. En effet, les données révèlent des différences évidentes aussi bien entre les génotypes qu'entre les traitements en P. Par ailleurs, sous conditions suffisantes en P, l'activité phytase et la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> montrent une corrélation hautement significative ( $R^2=0.91^{**}$ ) chez les lignées 104, 147 et 83 et qui devient légèrement faible ( $R^2=0.70^*$ ) chez les lignées tolérantes 115, 34 et la lignée sensible 29 (figure II.6). Par contre, sous déficience en P, les résultats obtenus montrent que l'activité phytase nodulaire augmente avec l'augmentation de la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> chez tous les génotypes soumis à la déficience en P, mais la tendance de cette augmentation n'est statistiquement significative que pour les lignées tolérantes 115 ( $R^2=0.61^*$ ), 104 ( $R^2=0.91^{***}$ ) et 34 ( $R^2=0.72^*$ ).



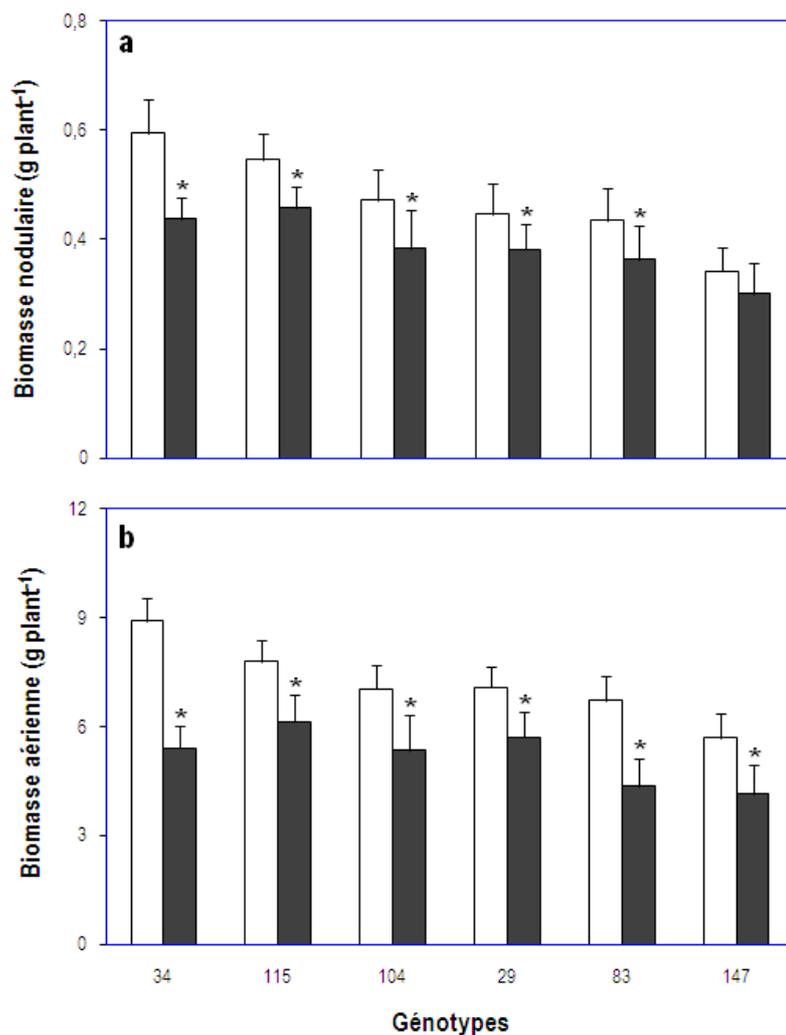
**Figure II.6.** Relation entre l'activité phytase des nodosités et la perméabilité nodulaire à l'oxygène de six lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions.

### 3.5. Croissance des plantes et nodulation

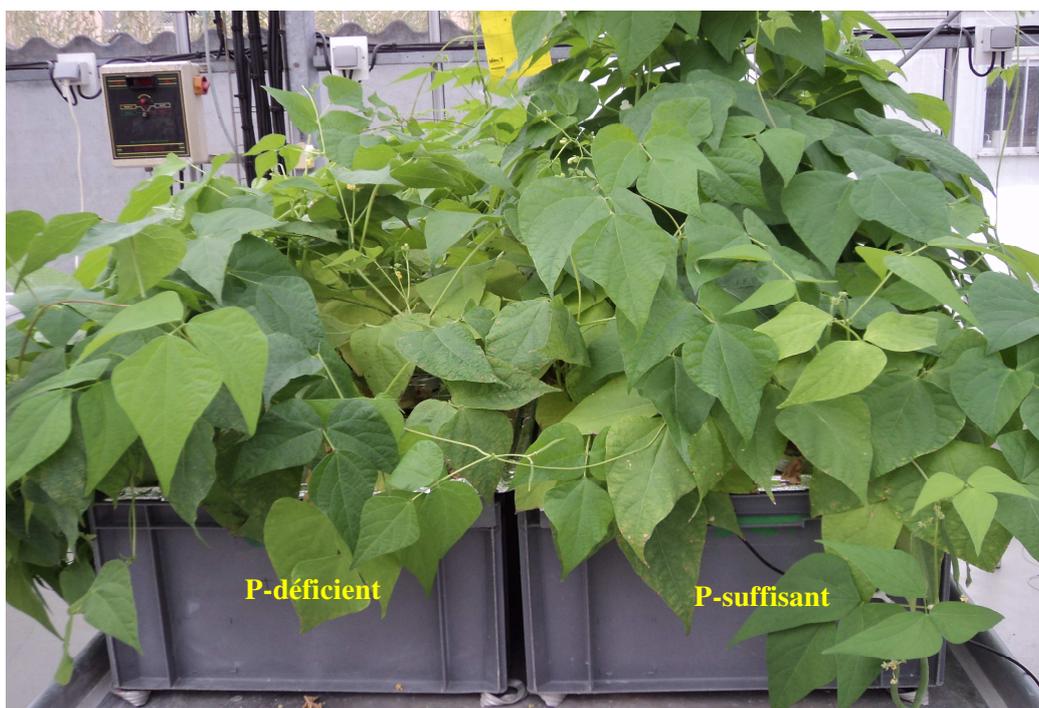
Le niveau du P appliqué dans cette expérience induit une réduction significative des biomasses nodulaires et aériennes des différents génotypes testés (figure II.7a). Quant à la biomasse des nodosités, des différences génotypiques importantes, en réponse au déficit en P, sont décelées chez les six lignées en comparaison avec leurs témoins respectifs. Sous déficience en P, des diminutions significatives sont observées et plus prononcées chez les lignées tolérantes 34 (26%) et 104 (18%) que chez les lignées sensibles 147 et 83 pour lesquelles cette réduction s'est légèrement atténuée. Similairement aux variations de la nodulation, la biomasse aérienne des

plantes déficientes en P diminue significativement pour la totalité des géotypes étudiés (figure II.7b).

Sous suffisance en P, bien que la lignée tolérante 34 enregistre la biomasse aérienne la plus élevée (8.90 g MS plant<sup>-1</sup>), elle montre aussi une forte réduction de la biomasse aérienne (39%) sous déficience en P. Pour les autres géotypes, la biomasse aérienne diminue de 20 à 30% sous déficience en P.



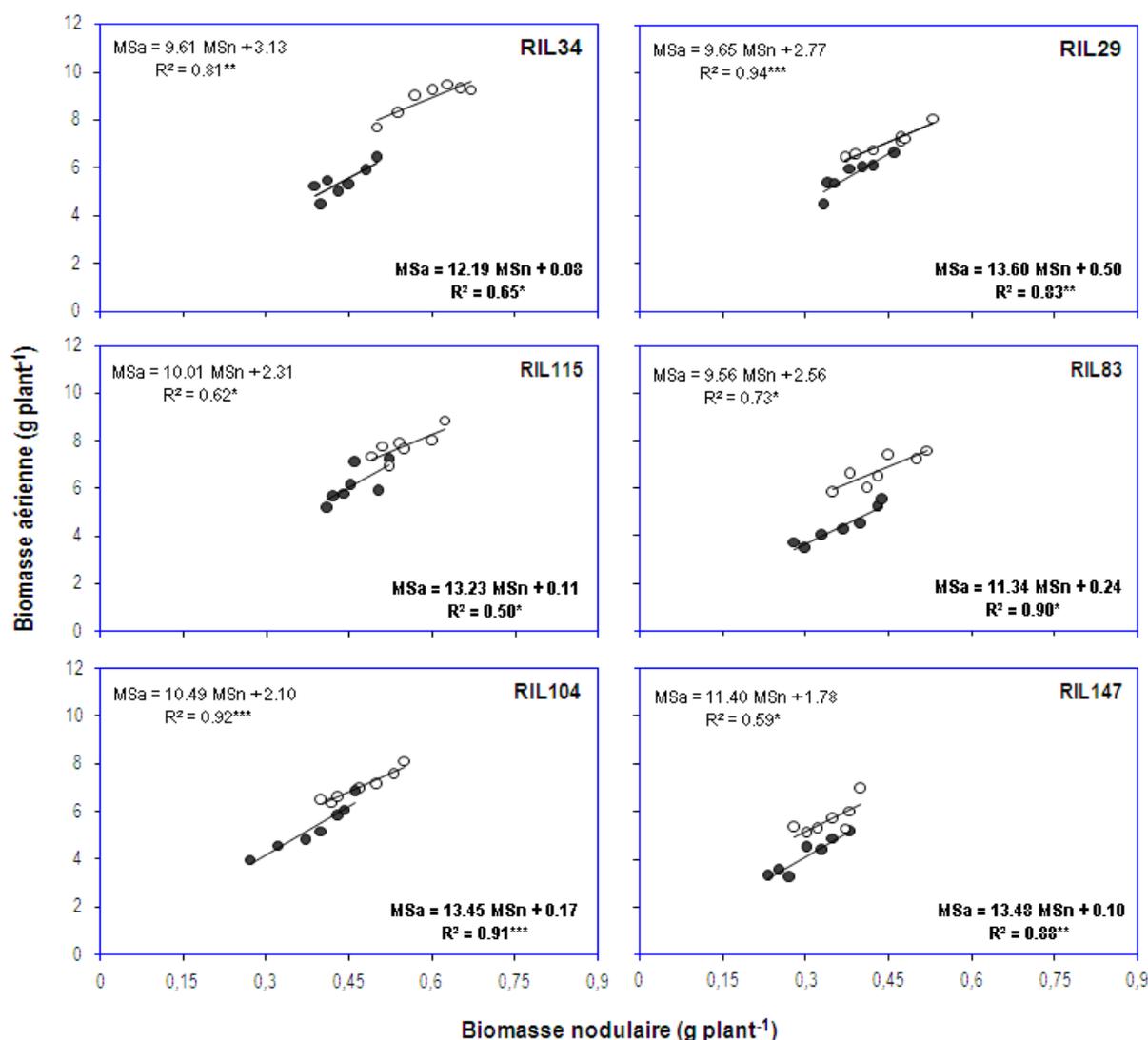
**Figure II.7.** Biomasse nodulaire (a) et aérienne (b) de six lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.



**Figure II.8.** Effet de la déficience en P sur la croissance des lignées de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées en hydroaéroponie sous serre.

### 3.6. Efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne

L'efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) est évaluée en analysant la pente de la régression linéaire entre les biomasses aériennes et nodulaires (figure II.9). En effet, les données obtenues révèlent des différences entre les génotypes et entre les traitements en P. Ainsi, pour les deux niveaux du P appliqués, les biomasses aériennes et nodulaires de toutes les lignées sont significativement corrélées ( $R^2$  supérieur à 0.50). En outre, l'EUSR est de 29, 24, 22 et 21% plus faible sous suffisance que sous déficience en P, respectivement pour les lignées 29, 115, 104 et 34. L'EUSR propre aux lignées sensibles 147 et 83 augmente d'une manière similaire (15%) sous déficience en P.



**Figure II.9.** Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne de six lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

#### 4. Discussion

Dans cette étude, l'augmentation observée au niveau de l'activité phytase des nodosités de différentes lignées de haricot est associée à une augmentation de la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> (figure II.5) et constitue une première description de la relation pouvant exister entre l'activité phytase dans les nodosités et leur perméabilité à la diffusion de l'O<sub>2</sub> à travers les cellules corticales. La perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> est considérée comme une hypothèse largement admise pour expliquer que la diffusion de l'O<sub>2</sub> à travers le cortex nodulaire est rigoureusement régulée, constituant ainsi un facteur principal de régulation de la FSN (Schulze, 2004). Ainsi la régulation de l'O<sub>2</sub> intranodulaire est un élément essentiel du fonctionnement nodulaire. Cette

régulation fait intervenir les leghemoglobines, les chaînes respiratoires alternatives avec parfois une synthèse d'ions superoxydes, et une limitation à l'entrée d'O<sub>2</sub> dans les nodosités (Minchin et al., 2008). Bien que la nature d'une telle limitation ne soit pas encore connue, son existence est confirmée par l'observation d'une très faible concentration d'O<sub>2</sub> intranodulaire à l'intérieur du parenchyme cortical entourant la zone infectée de la nodosité (Tjepkema et Yocum, 1974). Dans cette expérience, l'activité phytase a augmenté d'une manière assez remarquable sous déficience en P dans les nodosités des lignées tolérantes et elle est associée à une élévation significative de leur conductance nodulaire à la diffusion en O<sub>2</sub> (figures II.3a, II.6b). Cependant, les lignées tolérantes ont présenté une faible diminution de la teneur nodulaire en Pi qui semble être alloué aux nodosités dont la conductance nodulaire à la diffusion de l'O<sub>2</sub> s'est augmentée (figure II.6b). Dans ce contexte, il a été démontré par des études utilisant <sup>31</sup>P-RMN que le Pi s'accumule dans le cortex nodulaire pendant la croissance des plantes (Rolin et al., 1989). De même que le Pi nodulaire pourrait être impliqué dans l'osmorégulation contrôlant la variation de la taille des cellules corticales (Schulze et Drevon, 2005) qui est elle-même associée à des variations de la conductance nodulaire (Jebara et al., 2005). Dans les nodosités, le Pi libéré par les phytases est nécessaire pour assurer les réactions de couplage de la respiration nodulaire en O<sub>2</sub> et la production d'ATP dont au moins 16 molécules sont consommées pour chaque molécule de N<sub>2</sub> réduite (Salsac et al., 1984). Mais les quantités d'ATP nécessaires à la réduction de N<sub>2</sub> par la nitrogénase sont tellement élevées que la faible disponibilité de l'O<sub>2</sub> intranodulaire semble être l'élément limitant majeur de la fixation nodulaire de N<sub>2</sub> (Drevon et al., 1988 ; King et Layzell, 1991). En effet, la nodosité présente ce paradoxe d'être le siège d'une respiration intense pour fournir l'ATP nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase, mais en revanche elle maintient une teneur en O<sub>2</sub> extrêmement faible dans l'environnement de cette enzyme qui est facilement inactivée par l'O<sub>2</sub>. Pour surmonter cette contrainte, les nodosités auraient mis en place un système de régulation de la diffusion de l'O<sub>2</sub> permettant de modifier la perméabilité de leur cortex interne. Or, il a été montré que la déficience en P augmente la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> et augmente aussi le coût en carbone de l'activité de nitrogénase chez la luzerne (Schulze et Drevon, 2005).

Cependant, les différences de perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> observées entre les géotypes (figure II.4) semblent dépendre de la surface nodulaire et la distribution du Pi dans les nodosités puisque des corrélations significatives ont été établies entre la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> et l'activité phytase des nodosités des plantes de haricots inoculées avec la souche *R. tropici* CIAT899 (figure II.5). Des études menées sur le haricot cultivé sous déficit en P ont rapporté que des

activités élevées des phytases nodulaires sont positivement corrélées à l'efficacité de la fixation de N<sub>2</sub> (Araujo et al., 2008 ; Lazali et al., 2013).

Dans cette étude, la biomasse des plantes et des nodosités des lignées sensibles sont particulièrement affectées sous déficience en P avec une diminution de la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub>. En dépit de la faible croissance notée chez ces génotypes, la nodulation représente environ 8% de la biomasse totale des plantes déficientes en P. Ce taux de nodulation est bien comparable à celui obtenu chez le haricot (Tang et al., 2001; Kouas et al., 2005). En outre, nous avons décelé l'existence d'une éventuelle relation entre le rendement en biomasse, la nodulation, et l'activité phytase dans les nodosités. Les variations de cette dernière ont été associées à une augmentation de l'EUSR (figure II.8). Cette augmentation, sous déficience en P, pourrait contribuer à une forte demande de la respiration nodulaire pour la fixation de N<sub>2</sub> notamment pour les lignées 34, 115 et 104 en comparaison avec les lignées 147, 83 et 29. En effet, l'augmentation de l'EUSR sous déficit en P chez les lignées tolérantes par rapport aux génotypes restants, pourrait constituer une sorte d'adaptation impliquant des mécanismes ajustant la croissance pondérale de la plante et sa biomasse nodulaire. Ainsi, sous déficience en P, les nodosités des lignées sensibles exigeraient plus de respiration que celles des lignées tolérantes, mais aussi, il est plausible que les lignées tolérantes, soient moins exigeantes en terme de respiration nodulaire par rapport aux lignées sensibles.

## **5. Conclusion**

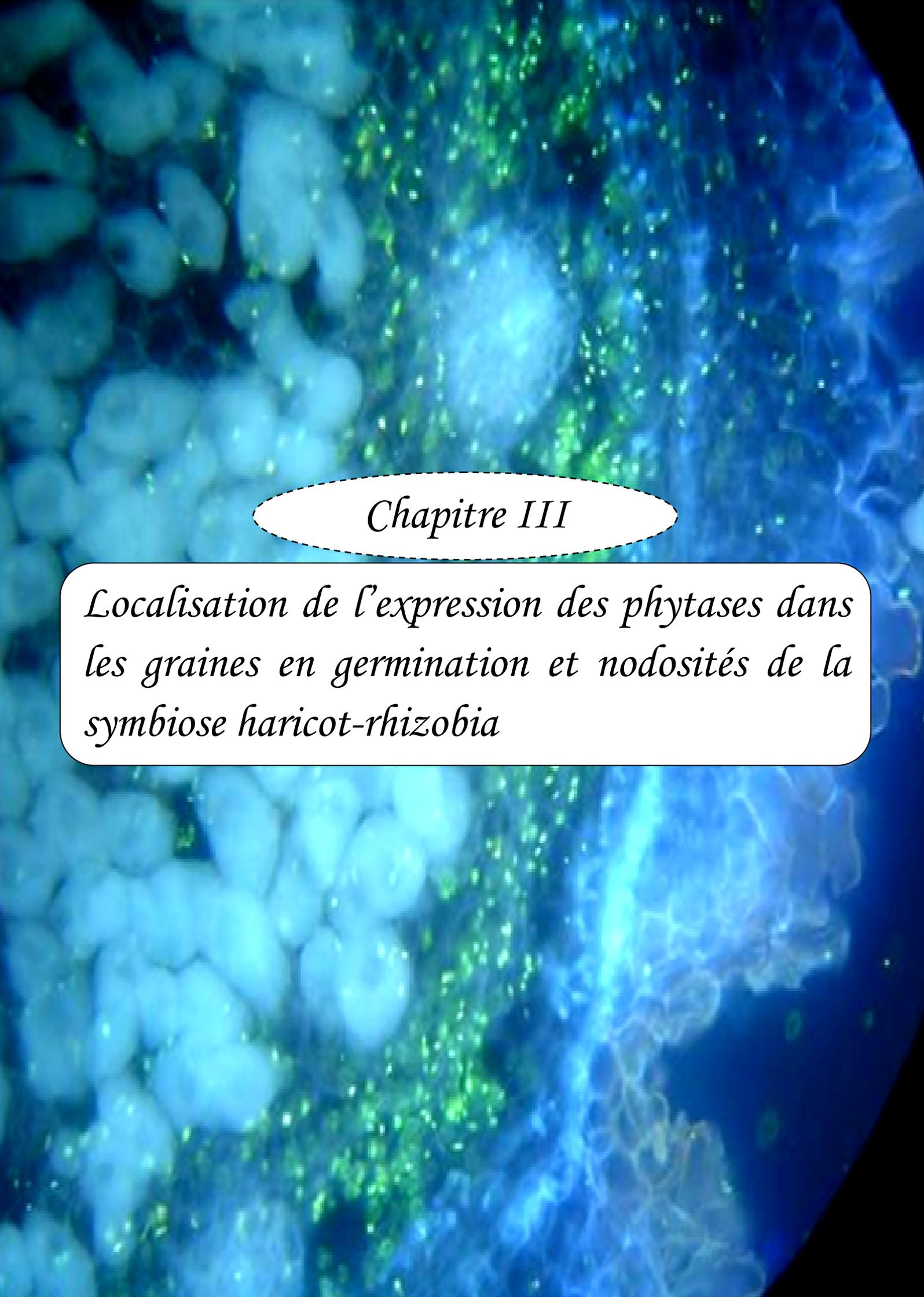
A la lumière des résultats obtenus, nous concluons que la phytase nodulaire est positivement régulé sous déficience en P et semble être impliqué dans l'efficacité de la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> et joue un rôle essentiel dans la respiration nodulaire. Le métabolisme énergétique associé à la fixation de N<sub>2</sub> chez les légumineuses serait régulé par des ajustements de conductance des nodosités à la diffusion d'O<sub>2</sub>. Ces ajustements étant déterminés par des déformations osmorégulées des cellules du cortex interne nodulaire. Les différences observées dans l'allocation en Pi libéré par l'hydrolyse de phytate dans les nodosités des génotypes étudiés nécessitent des études approfondies afin de déceler dans quel sens cette répartition pourrait intervenir dans la régulation de la conductance nodulaire à la diffusion de l'O<sub>2</sub> dont le processus de la fixation de N<sub>2</sub> en dépend fortement (Minchin, 1997; Schulze, 2004). La caractérisation moléculaire de telles symbioses pourrait permettre d'identifier des gènes impliqués dans le contrôle de la diffusion nodulaire d'O<sub>2</sub>, et fournir parallèlement des marqueurs utiles pour la sélection d'autres symbioses tolérantes à la déficience en P.

## Plant, Cell &amp; Environment



**The nodule conductance to O<sub>2</sub> diffusion increases with  
phytase activity in N<sub>2</sub>-fixing Phaseolus vulgaris L.**

Journal:	<i>Plant, Cell &amp; Environment</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lazali, Mohamed; Institut Nationale de la Recherche Agronomique, UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, ; Université de Khemis Miliana, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie & des Sciences de la Terre Drevon, Jean-Jacques; Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro,
Environment Keywords:	symbiosis, nutrients/nitrogen
Physiology Keywords:	respiration, growth
Other Keywords:	Plant nutrition, Phosphorus use efficiency, legume, symbiotic nitrogen fixation
Abstract:	To understand the relationship between phosphorus use efficiency (PUE) and respiration for symbiotic nitrogen fixation (SNF) in legume nodules, six recombinant inbred lines of common bean (RIL Phaseolus vulgaris L.), contrasting in PUE for SNF, were inoculated with Rhizobium tropici CIAT 899, and grown under hydroaerobic culture with sufficient versus deficient P supply (250 vs 75 $\mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$ ). At the flowering stage, the biomass of plants and phytase activity in nodules were analyzed after measuring O <sub>2</sub> uptake by nodulated roots. Our results show that the P-deficiency increased significantly the phytase activity in nodules of all RILs thought with highest extent for RILs 147, 29 and 83 (ca 45%). This increase in phytase activity was associated with an increase in nodule respiration (ca 22%) and in use of the rhizobial symbiosis (ca 21%). A significant correlation was found under P-deficiency between nodule O <sub>2</sub> permeability and phytase activity in nodules for RILs 104 ( $R^2=0.91^{***}$ ), 34 ( $R^2=0.72^*$ ) and 115 ( $R^2=0.61^*$ ). It is concluded that the variation of phytase activity in nodules can increase the internal utilization of P and may be involved in the regulation of nodule permeability for the respiration linked with SNF and the adaptation to P-deficiency.

A microscopic image of plant cells, likely from a bean seed, showing green fluorescence. The cells are arranged in a grid-like pattern, and the fluorescence is concentrated in the central region of the image. The overall color is a deep blue, with the green fluorescence providing a stark contrast.

### *Chapitre III*

*Localisation de l'expression des phytases dans les graines en germination et nodosités de la symbiose haricot-rhizobia*

---

*Localisation de l'expression des phytases dans les graines en germination et nodosités de la symbiose haricot-rhizobia*

---

## **1. Introduction**

Dans le chapitre précédent, nous avons suggéré que l'accumulation du phosphore inorganique (Pi) provenant de l'hydrolyse des phytates au niveau des nodosités serait responsable de l'augmentation de la conductance nodulaire en O<sub>2</sub>. Bien que des études récentes aient suggéré que l'augmentation de l'activité phytase dans les nodosités exposées à la déficience en P constituait un mécanisme d'adaptation de la symbiose rhizobienne à cette contrainte (Mandri et al., 2012 ; Bargaz et al., 2012 ; Lazali et al., 2013), très peu d'informations sont disponibles concernant la localisation de l'expression de phytase au niveau de cet organe.

Le phytate (myo-inositol hexakisphosphate) est la forme de réserve prédominante du phosphate chez les plantes. Il représente jusqu'à 65-90% du P total dans les céréales, les légumineuses et les graines d'oléagineux (Lott et al., 2000 ; Raboy, 2003) et se localise principalement dans l'embryon ou l'endosperme (Canini et al., 2001 ; Moraghan et al., 2006). Il est considéré comme une substance de réserve la plus importante pour la germination des graines et la croissance ultérieure de la plante. Le phytate est présent dans la nature sous deux principales formes en fonction de deux paramètres du milieu : le pH et la teneur en cations divalents (Duff et al., 1994 ; Steiner et al., 2007). En pH acide, les groupements phosphates restent sous leur forme protonique. L'acide phytique reste alors sous sa forme libre (non complexée). En pH neutre à alcalin par contre, l'ionisation des groupements phosphates par la perte des protons augmente leur affinité envers les cations divalents avec lesquels ils forment des complexes « phytate-métal » très stables et peu solubles. La dégradation de ces différentes formes du phytate en fonction du pH fait appel à différentes enzymes spécialisées (Wyss et al., 1999). A pH acide, le phytate, sous sa forme non complexée est déphosphorylé par les phytases acides dont le groupe le plus connu est celui des Histidine Acid Phosphatases ou HAP (Van Etten et al., 1991). A l'inverse, en condition de pH alcalin, ce sont des complexes calcium-phytate qui se forment et sont hydrolysables par les phytases alcalines ( $\beta$ -Propeller Phytase) ou BPP (Ha et al., 1999). Toutefois, les HAPs se trouvent généralement chez les plantes tandis que les BPPs semblent exclusivement exister chez les bactéries (Mullaney et Ullah, 2003).

Chez les plantes, différents gènes codant pour des enzymes de la phytase ont été identifiés (Maugenest et al., 1997 ; Hegeman et Grabau, 2001; Xiao et al., 2005). Cependant, la structure et le mécanisme de déphosphorylation de phytate diffèrent d'une enzyme à une autre (Mullaney et Ullah, 2003).

Ce troisième chapitre s'intéresse à la caractérisation et la localisation in situ de l'expression de phytase au niveau des graines en germination et nodosités du haricot dans le but de mieux comprendre le rôle clé de cette enzyme dans le métabolisme interne du P et sa contribution à la fois dans l'efficacité d'utilisation du P et la fixation de N<sub>2</sub>.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Matériel végétal et conduite des cultures**

La procédure expérimentale conçue pour cette étude réalisée à l'INRA de Montpellier est similaire à celle préalablement décrite dans le chapitre II. Il s'agit de tester, sous déficit en P, deux lignées recombinantes contrastantes à l'efficacité de l'utilisation de P pour la fixation symbiotique de l'azote ; RIL115 (tolérante à la déficience en P) et RIL147 (sensible à la déficience en P).

Sous des conditions aseptiques, les graines des deux génotypes sont mises à germer sur papier filtre dans une étuve à 28°C pendant cinq jours. L'inoculation est réalisée en boîte de pétri en immergeant les racines dans l'inoculum bactérien liquide contenant la souche *Rhizobium tropici* CIAT899 préalablement multipliée pendant 48 h à 28°C dans le milieu YEM liquide (Vincent, 1970). Cette souche originaire du Centre International d'Agriculture Tropicale est souvent utilisée comme référence pour l'inoculation du haricot. Les plantes sont cultivées pendant six semaines sous serre en système hydroaéroponique sous deux niveaux de nutrition phosphatée i.e. déficient (75  $\mu\text{mol P plante}^{-1} \text{ semaine}^{-1}$ ) versus suffisant en P (250  $\mu\text{mol P plante}^{-1} \text{ semaine}^{-1}$ ).

### **2.2. Extraction des acides nucléiques et vérification des séquences amplifiées**

L'extraction d'ARNm est réalisée avec le kit RNaseasy mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) à partir de 100 mg de nodosités et graines en germination des deux lignées 115 et 147 (annexe I). La reverse transcription est réalisée avec l'enzyme M-MLV de Promega (Madison, USA) en conditions normales d'utilisations recommandées par le fournisseur mais avec 5  $\mu\text{l}$  d'extrait d'ARNm et l'amorce reverse spécifique du gène étudié. La PCR est réalisée en conditions préconisées par le fournisseur de la Go-Taq (Promega, Madison, USA) avec 1  $\mu\text{l}$  de réaction de

reverse transcription et les amorces spécifiques du gène étudié. Le cycle PCR réalisé est le suivant : 95°C : 2 min ; [95°C : 45s ; 60°C : 1 min puis la température descend de 1°C par cycle ; 72°C : 1 min] 15 cycles ; [72°C : 2 min puis 60°C : 1 min ; 72°C : 1 min] 25 cycles ; 72°C : 10 min ; 4°C : 10 min. Les produits de PCR sont visualisés sur gels d'agarose 1.5% dans du TAE avec une migration de 40 minutes à 100 V puis coloré au bromure d'éthidium.

La ligation est réalisée dans le vecteur pGEM-T avec le kit pGEM-T Easy Vector systems (Promega, Madison, USA) en conditions normales d'utilisation recommandées par le fournisseur. Le clonage est réalisé dans des cellules compétentes JM109. Une PCR sur clones dite « de vérification des inserts » est réalisée avec les primers spécifiques des gènes étudiés (95°C : 2 min ; [95°C : 45 s ; 60°C : 30 s ; 72°C : 30s] 30 cycles ; 72°C : 10 min). La migration est effectuée sur gel d'agarose 2% pendant 1 h 30 min à 100 V.

### **2.3. Hybridation in situ du transcrit de phytase**

Pour la RT-PCR in situ, des échantillons des graines en germination ainsi que des nodosités de 3 mm de diamètre sont récoltées après 3 jours et 5 semaines de culture, respectivement. Après leur lavage dans l'eau traitée au pyro-carbonate di-éthylique (DEPC), ces échantillons sont immédiatement fixés dans un fixateur composé de Paraformaldéhyde 8%, éthanol 45% et acide acétique 5% pendant 2 heures sous vide à température ambiante (Van Aarle et al., 2007) puis conservés toute la nuit à 4°C. Par la suite, ils sont lavés 2 fois 5 minutes puis 2 fois 10 minutes dans de l'eau traitée au DEPC avant d'être inclus dans l'agarose 9% (Cellier et al., 2004). Des sections de 50 µm sont réalisées avec un vibratome. Elles sont lavées 3 fois avec PBS à 65°C et conservées dans 20 µl eau DEPC à température ambiante.

La transcription inverse est réalisée avec les amorces spécifiques du gène étudié (Molina et al., 2011). Il est ajouté aux 20 µl contenant les sections de nodosités ou graines en germination, 19 µl de mélange de transcriptase inverse réalisé avec le buffer de la M-MLV transcriptase inverse de Promega, l'amorce reverse (5'-TTCACCTCTAGAATCCCAT-3') et des dNTP selon les recommandations du fournisseur. Ces 39 µl sont incubés 5 minutes à 65°C. La transcriptase reverse M-MLV est ajoutée après que les tubes aient été incubés 2 minutes dans la glace. Les tubes sont incubés 1 heure à 42°C dans le thermocycleur. Les coupes sont lavées 3 fois avec 100 µl du PBS en agitation puis conservées dans 20 µl d'eau PCR.

Un mélange PCR avec amorce reverse (5'-TTCACCTCTAGAATCCCAT-3'), amorce dir (5'-GGACATGTTTCATGCCTATGAG-3'), des dNTP, DIG-dUTP et la Taq polymérase sont ajoutés aux 20 µl des sections. Un cycle PCR (30 cycles) est réalisé ; 95°C pendant 30 s ; 55°C pendant

30 s; 72°C pendant 45 s, 72°C pendant 2 minutes. Un contrôle négatif est réalisé sans transcriptase reverse. Après la PCR, les sections de nodosités et graines en germination sont rincées 3 fois avec 100 µl du PBS sous agitation puis incubées 30 minutes sous agitation dans 100 µl de tampon de blocage (PBS additionné de BSA 2%, triton 0.3%). La solution de blocage est remplacée par 100 µl de tampon AP (BSA 2%, anti-Dig ( $75 \cdot 10^{-5} \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ )). Les sections sont incubées dans le tampon AP durant 1 h 30 minutes à l'obscurité à température ambiante puis rincées 3 fois avec du PBS.

Le kit de détection ELF-97 endogenous phosphatase détection kit (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) est utilisé pour détecter la phosphatase alcaline conjuguée à l'anti-Dig. Cette méthode est mise au point pour avoir une sensibilité élevée de la détection des phosphatases en comparaison avec des méthodes basés sur les sels de tétrazolium et leurs précipités (Van Aarle et al., 2007). Le substrat dilué et filtré est ajouté aux sections à raison de 40 µl par tube. Les sections sont par la suite incubées 20 minutes à l'obscurité puis lavées 3 fois 10 minutes avec du tampon d'arrêt (PBS, EDTA 25 mmol l<sup>-1</sup>, Lévamisol 5 mmol l<sup>-1</sup>; pH 8) avant d'être montés sur lames pour microscope à épifluorescence d'une lampe à mercure. Le filtre utilisé permet de visualiser des longueurs d'ondes d'excitation à 360 nm et d'émission à 420 nm. Les images sont prises avec la caméra noir et blanc puis traitées par le logiciel de traitement d'images Zen Soft Imaging system.

#### **2.4. Mesure de l'activité phytase**

La méthode de dosage de l'activité phytase est décrite dans le deuxième chapitre (section 2.3).

#### **2.5. Détermination des constantes $K_m$ et $V_m$ de la phytase**

La constante de Michaelis est une constante caractérisant une réaction enzymatique. Elle est symbolisée par  $K_m$  et reflète l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus elle est grande, moins bien l'enzyme se fixe sur le substrat, et donc plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible. Au contraire, plus elle est petite, mieux l'enzyme se fixe sur le substrat, et donc plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est forte.

Les  $K_m$  et  $V_m$  sont déterminés à partir du modèle de régression de l'activité phytase sur la concentration de l'acide phytique selon les coordonnées de Lineweaver-Burk (Weinman et Méhul, 2004). Dans l'équation de la droite de régression  $y = ax + b$ ,  $a$  représente  $V_m/K_m$  et  $b$  représente  $1/V_m$ .

## 2.5. Teneur des nodosités et graines en phosphore

Le dosage du P contenu dans les nodosités et graines en germination est effectué selon la méthode normalisée par AFNOR (1969). La méthode consiste à minéraliser l'échantillon végétal, préalablement introduit dans des mini-réacteurs, dans une micro-onde sous l'attaque de l'acide nitrique concentré à des pressions de l'ordre de 110 bars et une température de 180°C pendant 15 minutes. La quantification de l'anhydride phosphorique en solution acide est réalisée par dosage colorimétrique au réactif vanadomolybdique révélant une coloration jaune mesurée à 460 nm.

## 2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique des données est réalisée par le logiciel R (2.14.1). Les valeurs correspondant à l'activité phytase ainsi que les teneurs des nodosités et graines en P sont les moyennes de cinq répétitions. L'analyse de la variance effectuée est à deux facteurs de classification. Les moyennes sont comparées à l'aide du test de Tukey HSD dans un seuil de probabilité de 5%.

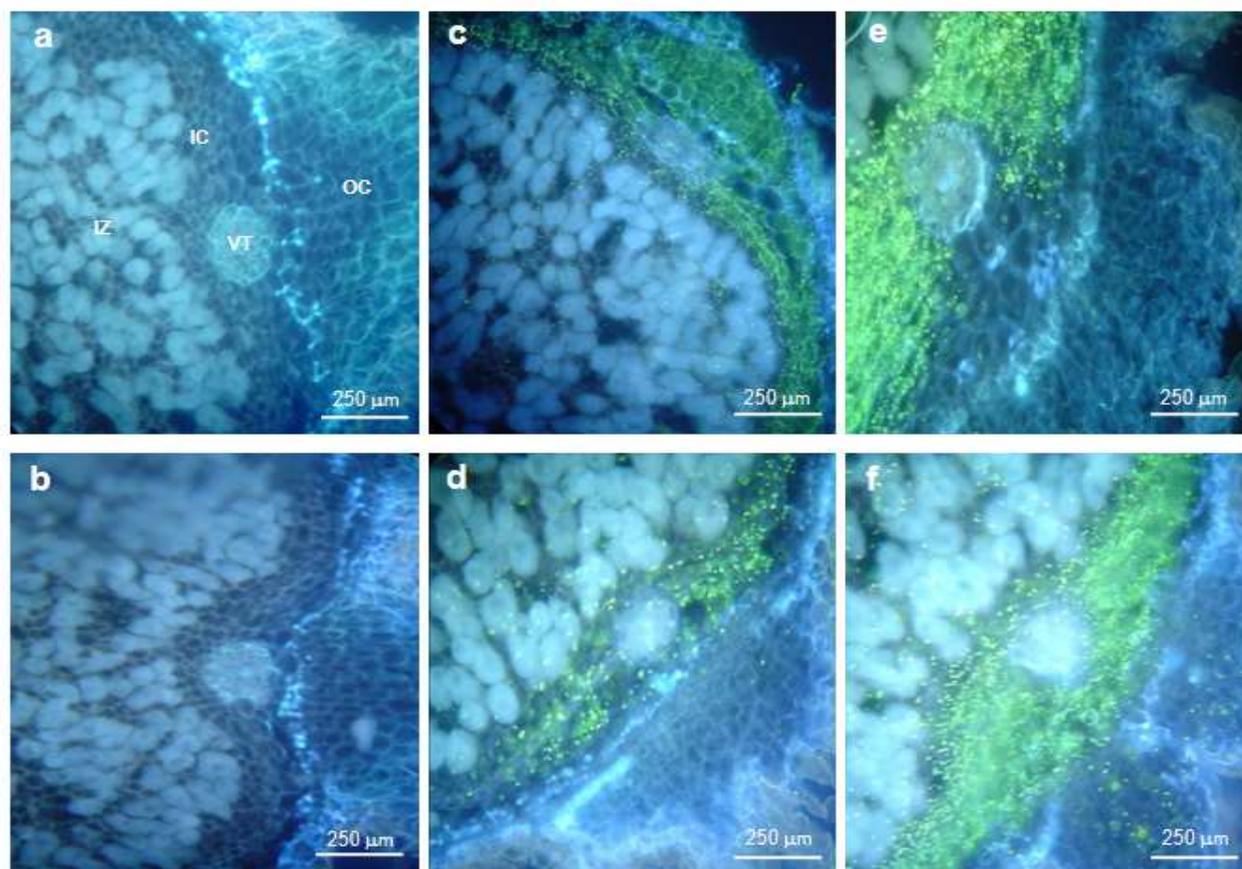
## 3. Résultats

### 3.1. Localisation de l'expression de la phytase au niveau des nodosités

La localisation in situ RT-PCR de l'expression du gène phytase au sein de l'organe symbiotique entre *Phaseolus vulgaris* et *Rhizobium tropici* CIAT899 est révélé par l'hydrolyse d'un substrat artificiel, l'ELF qui précipite sous forme cristalline. Le cristal obtenu émet une couleur verte (420nm) à des longueurs d'ondes d'excitation entre 360 et 370 nm alors que les tissus symbiotiques émettent une couleur bleue. La nodosité est composée de différents tissus (Figures 1a, b) : la zone infectée par les rhizobia (ZI) et le cortex. La zone infectée contient les cellules infectées par les bactéroïdes et les cellules de la zone de distribution. Le cortex est subdivisé en allant de l'extérieur vers l'intérieur en cortex externe (CE), cortex moyen (CM) et cortex interne (CI). Le cortex moyen et le cortex interne entourent les traces vasculaires (TV) qui sont des communications directes avec les parties aériennes de la plante.

Les résultats illustrés dans la figure III.1 montrent que les transcrits ADNc codant pour le gène phytase sont abondants dans le cortex moyen des nodosités de la lignée tolérante 115 ainsi que la lignée sensible 147. Nous avons noté, en comparaison avec le témoin sans transcriptase reverse, que ces transcrits sont aussi détectés dans les cellules non infectées avoisinant le cortex de

l'ensemble des nodosités testées. En outre, les figures III.1e,f montrent clairement que, sous déficience en P, un niveau élevé de l'expression de phytase est observé dans le cortex moyen par rapport à celui des nodosités cultivées sous suffisance en P (figures III.1c,d). Cependant, la déficience en P a fortement induit l'expression de la phytase dans le cortex des nodosités de la lignée tolérante 115 (figure III.1e) en comparaison avec la lignée sensible 147 (figure III.1f).

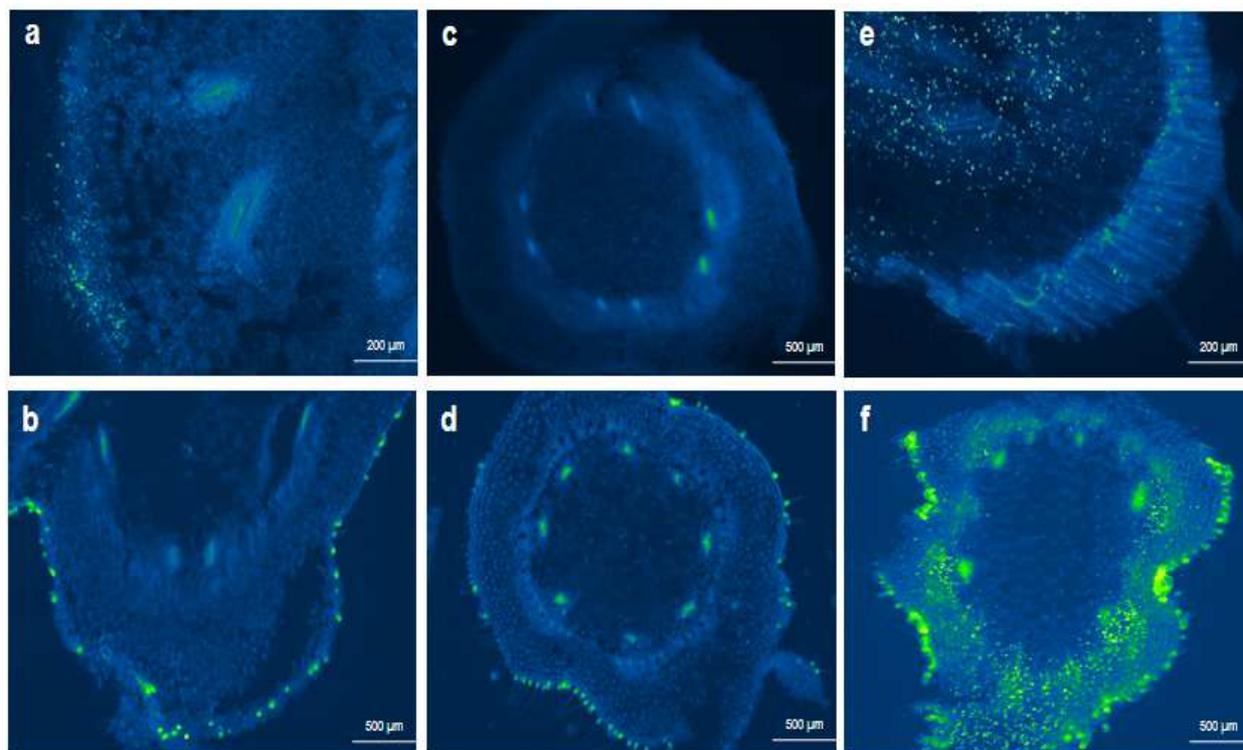


**Figure III.1.** Localisation in situ RT-PCR de l'expression de la phytase sur sections transversales de nodosités de deux lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899. (a) et (b) témoins négatifs sans transcription reverse. (c) et (d) sections de nodosités respectivement, pour les lignées 115 et 147 sous P suffisant. (e) et (f) sections de nodosités respectivement, pour les lignées 115 et 147 sous P déficient.

### 3.2. Localisation de l'expression de la phytase au niveau des graines en germination

Selon les résultats présentés dans la figure III.2, l'expression de la phytase est localisée principalement dans les cellules de l'épiderme, dans les traces vasculaires et dans les cellules parenchymateuses. Elle est forte au niveau des tissus de la lignée 147 (figures III.2b,d,f) en comparaison avec la lignée 115 (figures III.2a,c,e). Néanmoins, il s'avère que le marquage de l'expression de la phytase varie selon le type de tissu quelque soit le génotype. Un niveau très

élevé d'expression de la phytase est observé dans les cellules parenchymateuses de l'embryon en comparaison avec les cellules épidermiques des cotylédons et les traces vasculaires des racicules.

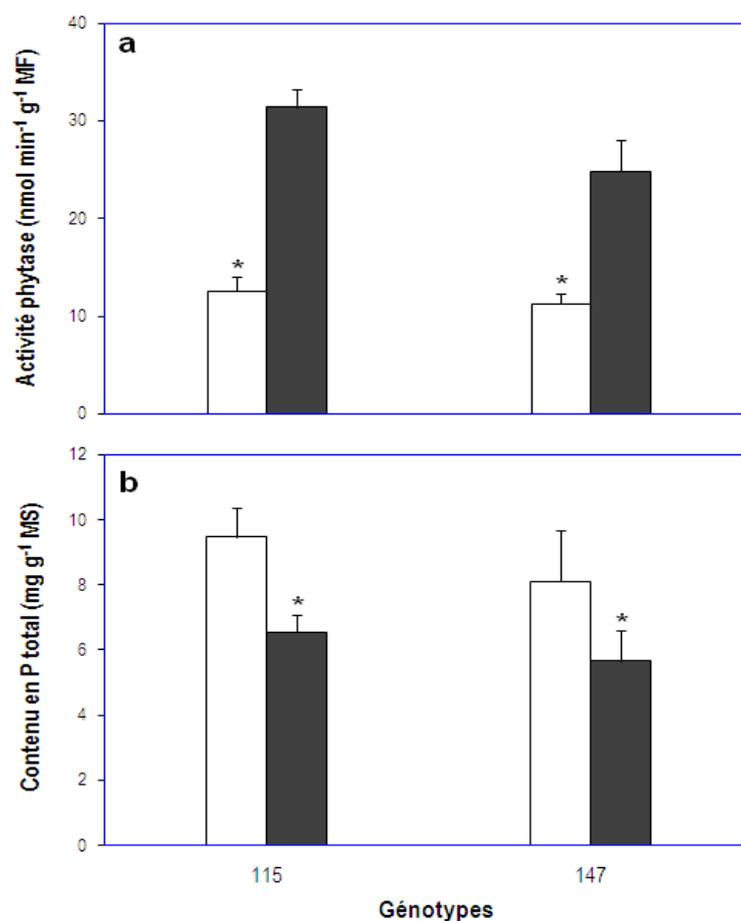


**Figure III.2.** Localisation *in situ* RT-PCR de l'expression de la phytase sur sections longitudinales de graines en germination de deux lignées recombinantes contrastantes de haricot. (a) et (b) sections de cotylédons respectivement, pour les lignées 115 et 147. (c) et (d) sections de racicules respectivement, pour les lignées 115 et 147. (e) et (f) sections des embryons respectivement, pour les lignées 115 et 147.

### 3.3. Activité phytase des nodosités

Les résultats représentés dans la figure III.3 montrent que les génotypes testés diffèrent non seulement par leurs activités phytase mais aussi par leur concentration nodulaire en P inorganique (Pi) et total. Sous déficience en P, l'activité phytase nodulaire augmente significativement chez les deux lignées 115 et 147 (figure III.3a). En particulier, les nodosités de la lignée tolérante 115 enregistrent la plus forte activité ( $32 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) en comparaison avec la lignée sensible 147 ( $24 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ).

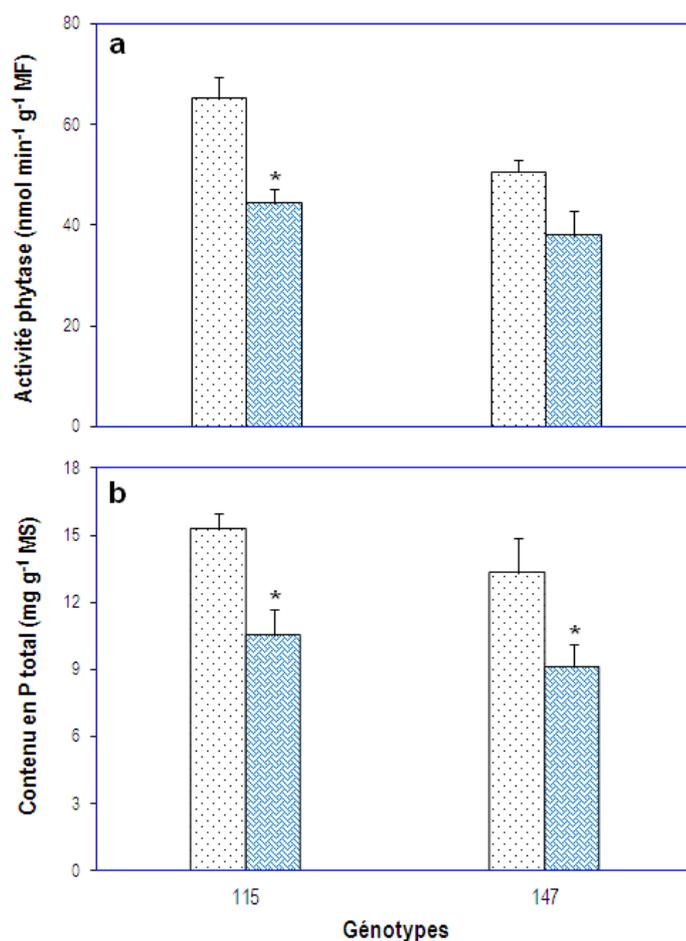
Les plantes cultivées en conditions de déficience en P présentent une diminution de leur teneur en P total dont l'importance varie selon les génotypes. En effet, la concentration en P total nodulaire diminue significativement sous déficience en P pour les deux génotypes testés (figure III.3b). Cependant, quelque soit le niveau de P, la lignée tolérante 115 accumule plus de P total dans ses nodosités en comparaison avec la lignée 147.



**Figure III.3.** Activité phytase (a) et concentration en P total (b) dans les nodosités de deux lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de cinq répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### 3.4. Activité phytase des graines

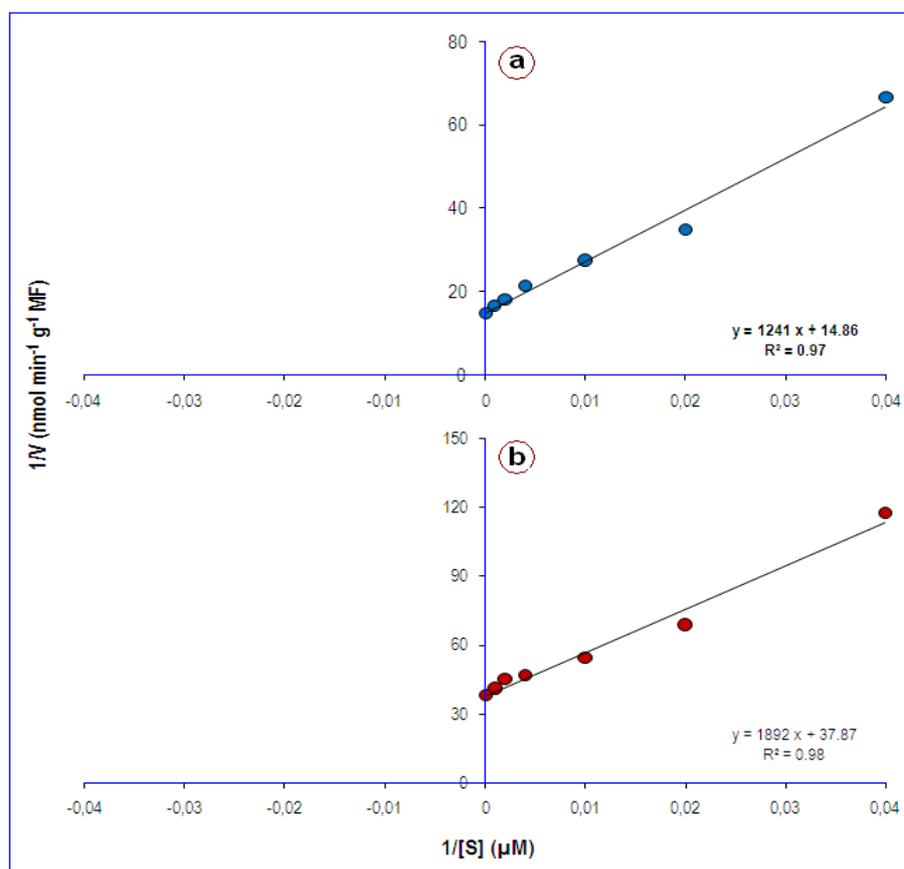
L'activité phytase des graines ainsi que leur concentration en Pi et P total sont déterminés aussi bien dans les cotylédons que dans les racicules des deux lignées testées (figure III.4). Les résultats obtenus révèlent que les cotylédons et les racicules présentent des niveaux différents des activités phytase (figure III.4a). Toutefois, l'activité phytase diminue significativement dans les racicules de la lignée tolérante 115 (38%) alors que les différences de cette activité entre les cotylédons et les racicules de la lignée 147 demeurent non significatives. La concentration en P total radiculaire diminue chez les deux lignées étudiées (figure III.4b). La plus forte concentration en P total est notée chez la lignée tolérante 115, tandis que la lignée sensible 147 ne présente qu'une faible concentration en P total quelque soit le type de tissu.



**Figure III.4.** *Activité phytase (a) et concentration en P total (b) dans les cotylédons (blanc) et radicules (bleu) de deux lignées recombinantes contrastantes de haricot. Les données représentent les moyennes de cinq répétitions récoltées à 72 heures après la germination.*

### 3.5. Propriétés catalytiques de la phytase

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire quantitativement les propriétés catalytiques de l'enzyme et les mécanismes de sa régulation. En effet, il existe une relation entre la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme et la concentration ou la disponibilité du substrat (Weinman et Méhul, 2004). Ainsi, l'activité phytase est significativement liée avec la concentration des phytates dans les cotylédons (figure III.5a) et dans les nodosités (figure III.5b). Les cotylédons enregistrent une activité maximale ( $V_m$ ) de l'ordre de  $67 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$  tandis que les nodosités n'enregistrent qu'une  $V_m$  de l'ordre de  $26 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ . De même, la constante de Michaelis ( $K_m$ ) est plus élevée dans les cotylédons ( $84 \mu\text{M}$ ) que dans les nodosités ( $50 \mu\text{M}$ ).



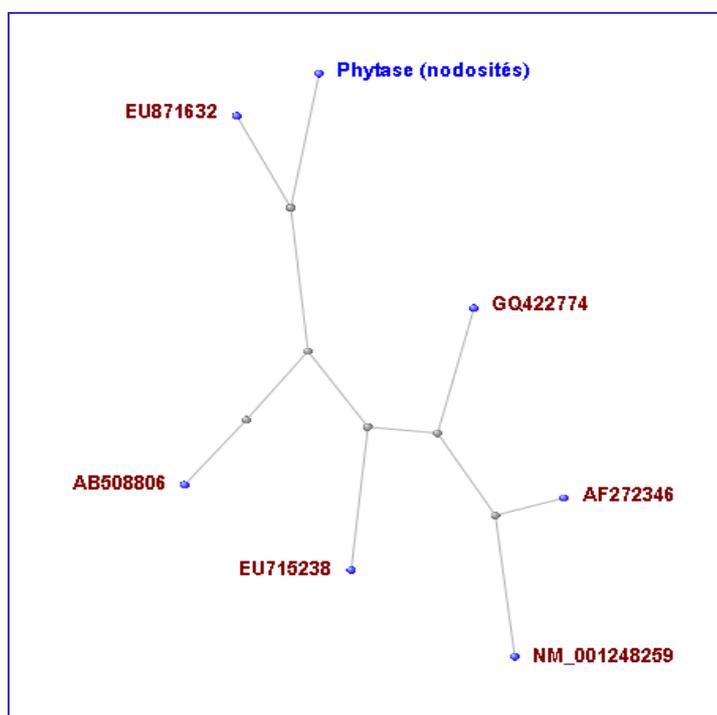
**Figure III.5.** Les constantes cinétiques de phytase des cotylédons (a) et nodosités (b) de la lignée recombinante contrastante 147 du haricot. Les données représentent les moyennes de cinq répétitions récoltées à 72 heures après la germination et à 42 jours après la transplantation respectivement pour les cotylédons et nodosités.

### 3.6. Analyse des séquences de la phytase

Les résultats de la recherche du degré de similitude de nos séquences phytase par rapport à celles de séquences déposées auprès de NCBI permet de rapprocher nos séquences à 2 classes différentes. En effet, la séquence phytase des cotylédons appartient à la classe des phytases PAPs et présente un degré de similitude de 90% avec la séquence phytase de *Glycine max* (figure III.6). En revanche, la séquence phytase des nodosités appartient à la classe des phytases HAPs et présente un degré de similitude de 94% avec la séquence phytase de *G. max* de cette classe (figure III.7).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Glycine max uncharacterized protein LOC100815749 (LOC100815749), mRNA	394	394	95%	3e-106	90%	<a href="#">XM_003524555.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Glycine max thiamine-repressible acid phosphatase pho4-like (LOC100812135), mRNA	390	390	93%	3e-105	90%	<a href="#">XM_003552188.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max purple acid phosphatase (PAP02) mRNA, complete cds	390	390	93%	3e-105	90%	<a href="#">EU526808.1</a>
<input type="checkbox"/> Medicago truncatula Multiple inositol polyphosphate phosphatase (MTR_3q071580) mRNA, complete cds	333	333	93%	6e-88	87%	<a href="#">XM_003600923.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cicer arietinum multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like (LOC101507608), transcript variant X2, mRNA	322	322	95%	1e-84	85%	<a href="#">XM_004500458.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cicer arietinum multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like (LOC101507608), transcript variant X1, mRNA	322	322	95%	1e-84	85%	<a href="#">XM_004500457.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max clone GM_WBc0096D17, complete sequence	230	342	82%	8e-57	90%	<a href="#">AC236219.2</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Fragaria vesca subsp. vesca multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like, transcript variant 2 (LOC101314222), mRNA	154	154	68%	5e-34	79%	<a href="#">XM_004307636.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Fragaria vesca subsp. vesca multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like, transcript variant 1 (LOC101314222), mRNA	154	154	68%	5e-34	79%	<a href="#">XM_004307635.1</a>

**Figure III.6.** Degré de similitude de la séquence phytase des cotylédons par rapport à celle des séquences phytase NCBI.



**Figure III.7.** Arbre génétique généré par l'analyse de la séquence phytase des nodosités par rapport à celle des séquences phytase NCBI.

L'alignement de la séquence phytase des cotylédons avec celle des nodosités à l'aide de BLAST (figure III.8) révèle que ces séquences ne présentent que 49% degré de similarité et ce en accord avec les conclusions précédemment tirées lors de l'analyse des propriétés catalytiques.

<b>Cotélydons</b>	1	GAATTCAGTGTGATTGAAGGAGCTTTCGATGTTTCGCAAACACCTCTCCACTGTCTCCAG	60
<b>Nodosités</b>	1	GAATTCAGTGTGATTTTC--ACCTCTAGAA--TCCCATAGCCAAAAGCTAGTTTCTCT-G	55
<b>Cotélydons</b>	61	ATATGGTGCCTGAAAAGACATTTCTGACAATAACTTCATTTCCTTCTAAAAATCCGGAGGG	120
<b>Nodosités</b>	56	AAA----GCACTGTAA-----TCTGGCTGG----TGATCCCAACAAAACCTCACTC----	97
<b>Cotélydons</b>	121	ATGTGTTCCGATCCATTTGAATCTTGTGGCAAGGCATGGAACCTCGATCTCCACGAAGAA	180
<b>Nodosités</b>	98	-TCTGGACCAA---ATGTAAAAATTGTTGCA---CA---AAAGCCACC-CATATAAGGAT	146
<b>Cotélydons</b>	181	AAGGA-----TAAAGGAGTTAGATAAATTTGGCTGCTCGTCTGGAAGTT-----CT	225
<b>Nodosités</b>	147	CAGGAGTACTTAATGGATCAGGACAATGACCAGGCTCGTCTGCAAAATTTGATTGCCATCT	206
<b>Cotélydons</b>	226	TGTGAGGGA-AGCAAAAAGAGCGAAGTTTGCCTT-TGGAGAGGGTTCCCTTCGTGG--CTAA	281
<b>Nodosités</b>	207	TCTCTGTGTACCCCATCCCAACT--GCAATATGGACAGGA--CCA-CATGGATCTAA	261
<b>Cotélydons</b>	282	A-TGGA--TGAAAATCTCCTTGG--CAGGGAAAAG-CGTAAGGGTGGTGAA	325
<b>Nodosités</b>	262	ACTGTAATTGTAAACCCGATTGGACCTCTCATAGGCATGAACATGTCC	309

**Figure III.8.** L'alignement des séquences (ADNc) de phytase des cotélydons et nodosités du haricot récoltées respectivement à 72 heures après la germination et 42 jours après la transplantation.

#### 4. Discussion

Le présent travail est le premier en son genre analysant la visualisation par in situ RT-PCR de l'expression de la phytase au niveau des graines en germination et nodosités de la symbiose rhizobienne chez le haricot cultivé sous déficience en P. La précision de la fluorescence, marquée par une enzyme de signalisation de produits PCR est illustrée par une localisation du signal de la phytase dans l'enveloppe de la graine en germination (figure III.2) comme dans les trois couches cellulaires du cortex interne entre la zone infectée et les traces vasculaires dans les nodosités (figure III.1). Une telle précision de la localisation de la transcription au niveau des tissus contribuerait à une meilleure compréhension de l'expression de la phytase dans les graines et les nodosités, ou d'autres organes, y compris d'autres espèces que les légumineuses.

Cependant, dans les nodosités, la forte expression de la phytase dans les cellules du cortex interne pourrait être associée à la régulation de la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub>. En effet, cette dernière est importante chez le haricot soumis à la déficience en P (Vadez et al., 1996, Jebara et al., 2005, Bargaz et al., 2011). Un des mécanismes essentiels dont disposent les nodosités pour contrôler la concentration intranodulaire d'O<sub>2</sub> est localisé dans une zone corticale de faible perméabilité à la diffusion de l'O<sub>2</sub> (Minchin, 1997). Des observations des tailles cellulaires (Serraj et al., 1995) et des mesures de conductance nodulaire (Drevon et Hartwig, 1997) ont conduit Drevon et al. (1998) à l'hypothèse d'une osmorégulation de la fixation nodulaire de N<sub>2</sub> par des contractions réversibles des cellules du parenchyme interne du cortex des nodosités. Le

niveau de contraction de ces cellules déterminerait le flux alloué à la respiration soutenant l'activité nitrogénase (Drevon et Hartwig, 1997). De plus, la respiration nodulaire exige un fort métabolisme énergétique car elle est présumée dépendre d'une osmorégulation forte (Shultze et Drevon, 2005). La demande en ATP pourrait être à l'origine de l'hydrolyse de P organique pour fournir du Pi au métabolisme énergétique (Salsac et al., 1984 ; Vance, 2008). Le Pi ainsi libéré pourrait être utilisé dans les cellules du cortex interne et/ou diffuserait par voie symplasmique vers la zone infectée (Serraj et al., 1995). Notre étude a montré que l'augmentation de l'expression de la phytase dans les nodosités sous déficience en P, s'est associée à une augmentation de leurs activités phytases mais aussi à une préférence dans l'allocation de Pi aux nodosités. L'accumulation du Pi dans les nodosités se trouve aussi associer à une stimulation de l'activité phytase chez certains génotypes de haricot sous déficience en P (Araujo et al., 2008 ; Kouas et al., 2009 ; Lazali et al., 2013). Des études antérieures ont indiqué que la déficience en P a entraîné une augmentation importante de l'activité phytase dans les exsudats racinaires de tabac (Lung and Lim, 2006 ; Lung et al., 2008). Un mécanisme universel de réponse des plantes à la déficience en P est l'augmentation de la sécrétion de phosphatases extracellulaires et intracellulaires. Certaines espèces excrètent des phytases mais la plupart des plantes sont vraiment limitées dans leur capacité à accéder au phytate (Raghothama, 1999 ; Richardson et al., 2001).

Dans notre travail, la technique *in situ* RT-PCR a permis la visualisation de l'expression de la phytase dans les cotylédons, les racicules et les embryons des graines de haricot en germination (figure III.2). Cependant, le signal plus intense des phytases dans l'embryon que dans les cotylédons et racicules (figures III.2e, f) est corrélé avec la grande quantité de phytates accumulées dans les graines de haricot commun. Les graines ont la capacité de stocker d'importantes quantités de P, de cations et de myo-inositol dans un seul et même composé de réserve, la phytate. Les phytases constituent une classe spéciale de phosphatases qui permettent la remobilisation des différentes composantes de la phytate lors de la germination. Cet outil moléculaire a permis de montrer que l'ARNm codant pour la phytase était absent dans la graine sèche et que son accumulation était induite pendant les premiers jours de la germination. En outre, l'activité phytase est préférentiellement stimulée dans les différents tissus des graines en germination. Pendant la germination des graines, une augmentation de l'activité phytase (figure III.4a) est observée d'une façon concomitante à une baisse de P total (figure III.4b), permettant ainsi de produire le Pi et de libérer les éléments minéraux complexés. Il a été également suggéré que le myo-inositol libéré par l'hydrolyse des phytates pendant le stade précoce de la

germination pourrait agir comme un précurseur de la biosynthèse de la paroi cellulaire (Loewus et Loewus, 1983). En outre, la remobilisation de Pi par l'hydrolyse de la phytate faciliterait l'établissement de la symbiose rhizobienne (Valverde et Wall, 1999 ; Valverde et al., 2000).

De ces résultats, nous remarquons que la lignée tolérante 115 enregistre de fortes activités phytases accompagnées d'une forte libération de Pi, par rapport à la lignée sensible 147. Ces variations génotypiques pourraient être attribuées à l'efficacité d'utilisation du P, son acquisition à partir de la rhizosphère et sa mobilisation interne dans toutes les parties de la plante. Leur importance serait liée principalement à l'interaction génotype/milieu qui constitue la source majeure des variations influençant l'approvisionnement des graines en éléments nutritifs (Li et al., 2008). En outre, il a été signalé qu'une proportion importante des réserves en P du haricot sont allouées au développement des graines (Yan et al., 1995). Cela suggère que la translocation du P au grain pourrait être fortement associée à l'efficacité d'absorption du P et de son utilisation par la plante de haricot. Les mécanismes physiologiques mis en œuvre pour une meilleure utilisation du P peuvent varier selon la source de cet élément, la plante légumineuse, les caractéristiques du sol particulièrement l'acidification de la rhizosphère (Hinsinger et al., 2003) et l'importance de l'activité phosphatases (Li et al., 2003). Egalement, les nodosités ont été décrites comme des puits accumulant énormément du P par rapport aux teneurs des racines et des parties aériennes (Schulze et Drevon, 2005).

Dans cette étude, la constante de Michaelis de l'activité phytase dans les graines en germination (figure III.5a) est en accord avec des travaux antérieurs menés sur l'orge (Greiner et al., 2000), le maïs (Laboure et al., 1993), la fève (Greiner et al., 2001) et le lupin (Silva et Trugo, 1996). Ainsi, la différence de  $K_m$  des graines par rapport à celle des nodosités (figure III.5b) suggère que la phytase des graines et nodosités appartient à deux classes d'enzymes différentes. Cela est d'ailleurs corroboré par les différences constatées entre les séquences d'ADNc de la phytase des graines et celle des nodosités (figure III.8). En effet, la séquence des acides aminés déduite de l'ADNc phytase des graines est apparue très différente de celle de l'ADNc codant pour la phytase des nodosités. Le terme générique phytase regroupe une grande variété d'enzymes différentes à plusieurs points de vue. La classification qu'on peut tirer des diverses études traitant de ces enzymes (Mullaney et Ullah, 2003) est faite sur la base de l'homologie des séquences protéiques des phytases de diverses origines, en adéquation avec la structure tridimensionnelle, les propriétés biochimiques et catalytiques (Lim et al., 2007). Elle répartit globalement les phytases en deux principales classes: la classe I qui est celle des phytases acides qui se résume principalement aux HAPs, opposée à la classe II, celle des phytases alcalines, dont la plus

connue est la phytase  $\beta$ -propeller phytase (BPP) (Mullaney et Ullah, 2003). A côté de ces deux principales classes, il existe des phosphatases acides particulières dotées de capacités à hydrolyser l'acide phytique. Il s'agit notamment de certaines phosphatases acides pourpres (PAPs) et de la cystéine phytase (Oh et al., 2004 ; Mullaney et Ullah, 2007 ; Lei et al., 2013).

La déficience en P affecte très peu (Israel, 1987 ; Pereira et Bliss, 1989) ou pas du tout (Adu-Gyamfi et al., 1989 ; Vadez et al., 1996) la teneur en P de la nodosité. Le  $P_i$  tendrait à s'accumuler dans les cellules du cortex nodulaire lors de la maturation de la nodosité de soja (Rollin et al., 1989). Selon Sa et Israel (1991) chez le soja, la déficience en P n'a pas d'effet sur le pool d'ATP et la charge énergétique en adénylates des bactéroïdes où la réduction d'une molécule de  $N_2$  exige l'hydrolyse de 16 ATP. En revanche, le pool d'ATP et la charge énergétique sont diminués dans les cellules non infectées où l'assimilation du  $NH_4^+$  issu de l'activité nitrogénase consomme l'équivalent de 8 à 9 ATP (Layzell et al., 1988). La forte exigence en  $P_i$  des bactéroïdes pour la synthèse de l'ATP nécessaire à l'activité nitrogénase limiterait le métabolisme énergétique des cellules non infectées (Sa et Israel, 1991). La capacité d'ajustement de la concentration en  $P_i$  cytoplasmique des cellules infectées qui sont peu vacuolisées, pourrait alors dépendre de leur approvisionnement en  $P_i$  par les cellules non infectées de la zone centrale ou du cortex.

## **5. Conclusion**

Nous concluons que des différences dans l'expression des phytases qui existent entre les graines en germination et les nodosités révèlent l'existence de deux classes de phytases différentes. Des différences importantes dans l'expression des phytases sont décelées entre les génotypes testés pendant la germination et la fixation de  $N_2$  sous déficience en P. L'expression, plus forte de ce gène sous déficience en P au niveau des nodosités de la lignée tolérante RIL115 comparée à la lignée sensible RIL147, suggère qu'il serait un marqueur d'adaptation à la déficience en P. Une meilleure compréhension du rôle de la phytase dans l'adaptation des légumineuses fixatrices de  $N_2$  nécessite une profonde étude de localisation de ce gène sur un grand nombre de lignées contrastantes afin d'établir s'il intervient dans l'efficacité d'utilisation du P pour la fixation de  $N_2$ . Ainsi, une exploration plus approfondie de la distribution des phytates dans les graines de haricot serait nécessaire pour établir le lien entre la localisation de l'accumulation des phytates et l'activité phytase.

## A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*–rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency

Mohamed Lazali · Mainassara Zaman-Allah · Laurie Amenc · Ghania Ounane · Josiane Abadie · Jean-Jacques Drevon

Received: 10 March 2013 / Accepted: 29 April 2013 / Published online: 16 May 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Phosphorus is an essential nutrient for rhizobial symbioses to convert  $N_2$  into  $NH_4$  usable for N nutrition in legumes and N cycle in ecosystems. This  $N_2$  fixation process occurs in nodules with a high energy cost. Phytase is the major storage form of P and accounts for more than 50 % of the total P in seeds of cereals and legumes. The phytases, a group of enzymes widely distributed in plant and microorganisms, are able to hydrolyze a variety of inositol phosphates. Recently, phytase activity was discovered in nodules. However, the gene expression localization and its role in  $N_2$ -fixing nodules are still unknown. In this work, two recombinant inbred lines (RILs) of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), selected as contrasting for  $N_2$  fixation under P deficiency, namely RILs 115 (P-efficient) and 147 (P-inefficient) were inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT 899, and grown under hydroaeroponic conditions with sufficient versus deficient P

supply. With in situ RT-PCR methodology, we found that phytase transcripts were particularly abundant in the nodule cortex and infected zone of both RILs. Under P deficiency, phytase transcripts were significantly more abundant for RIL115 than for RIL147, and more in the outer cortex than in the infected zone. Additionally, the high expression of phytase among nodule tissues for the P-deficient RIL115 was associated with an increase in phytase (33 %) and phosphatase (49 %) activities and efficiency in use of the rhizobial symbiosis (34 %). It is argued that phytase activity in nodules would contribute to the adaptation of the rhizobia–legume symbiosis to low-P environments.

**Keywords** Phytase · Phosphorus deficiency · Recombinant inbred line · Transcript · Nitrogen · Nodule · Rhizobia · Symbiosis

### Abbreviations

N	Nitrogen
P	Phosphorus
RILs	Recombinant inbred lines
SNF	Symbiotic nitrogen fixation
CIAT	International center of tropical agriculture
DAT	Days after transplantation
EURS	Efficiency in use of the rhizobial symbiosis
APase	Acid phosphatase

M. Lazali (✉) · M. Zaman-Allah · L. Amenc · J. Abadie · J.-J. Drevon (✉)  
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR 1222 Eco&Sols, Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro. Place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France  
e-mail: m.lazali@ensa.dz

J.-J. Drevon  
e-mail: drevonjj@supagro.inra.fr

M. Lazali · G. Ounane  
Département de Phytotechnie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Avenue Hassan Badi, 16200 El Harrach-Alger, Algeria

M. Lazali  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie & des Sciences de la Terre, Université de Khemis Miliana, Route Theniet El Had, Soufay, 44225 Khemis Miliana, Algeria

### Introduction

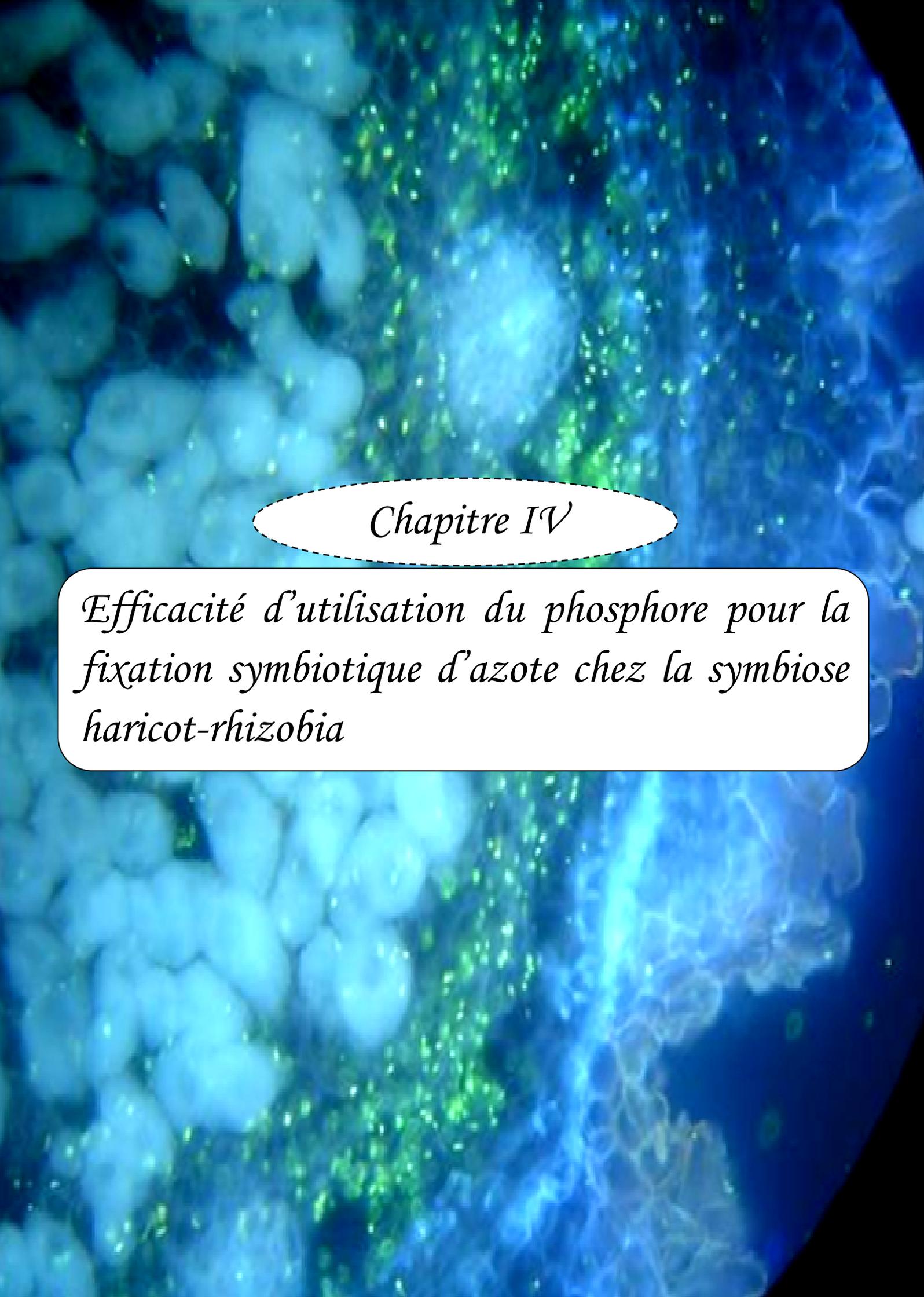
Phosphorus (P) is one of the most important nutrients for plant growth and metabolism. It is the least accessible macronutrient in many soils because it readily forms

**the plant journal**

**Localization of phytase transcripts in germinating seeds of a recombinant *Phaseolus vulgaris* inbred line**

Journal:	<i>The Plant Journal</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lazali, Mohamed; INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, UMR 1222 Eco&Sols, Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, UMR Eco&Sols; Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Phytotechnie Louadi, Lamia; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro Montpellier, France, Ounane, Ghania; Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Avenue Hassan Badi 16200 El Harrach- Alger, Algérie, Abadie, Josiane; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro Montpellier, France, Amenc, Laurie; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro Montpellier, France, Barqaz, Adnane; Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Biosystems and Technology, PO Box 103, SE-230 53, Lullien-Pellerin, Valérie; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR 1208 Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes, Place Pierre Viala, 34060, Drevon, Jean Jacques; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro Montpellier, France,
Key Words:	Phytase, Seed, Transcript, in situ RT-PCR, <i>Phaseolus vulgaris</i> , Nodule, Phosphorus

SCHOLARONE™  
Manuscripts



*Chapitre IV*

*Efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique d'azote chez la symbiose haricot-rhizobia*

## **1. Introduction**

Dans les chapitres précédents, la déficience en P a remarquablement affecté l'ensemble des paramètres considérés. Cependant, des concentrations accrues en P, pourraient aussi provoquer des toxicités sous suffisance en P. Nous avons suggéré que cette accumulation du P serait responsable de l'augmentation de la conductance nodulaire en O<sub>2</sub>. Dans ce chapitre, l'effet de la déficience en P sur le métabolisme oxydatif, pourrait répondre à l'hypothèse précédente mais aussi caractériserait bien entendu et particulièrement le métabolisme oxydatif nodulaire sous traitement suffisant ou déficient en P.

En réponse à la déficience P, les légumineuses nodulées mettent en œuvre deux stratégies adaptatives (Fohse et al., 1988). La première stratégie consiste à développer un système d'acquisition plus efficace du P en augmentant la surface d'échange racinaire (Anuradha et Narayanan, 1991) ou en secrétant des acides organiques (Ohwaki et Hirata, 1992) et des phosphatases (Hawkesford et Belcher, 1991) dont le rôle est de dissoudre le P insoluble du sol. Cette stratégie concerne l'exigence externe en P de la plante, c'est-à-dire la concentration minimale en P de la solution du sol pour une croissance optimale de la plante. La seconde stratégie consiste à optimiser l'efficacité métabolique d'utilisation du P (EUP) pour la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> (FSN) en produisant plus de biomasse ou en fixant plus de N<sub>2</sub> par unité de P consommée. Cette stratégie concerne l'exigence interne en P (Siddiqi et Glass, 1981 ; Israel et Rufty, 1988), c'est-à-dire la teneur minimale en P de la plante pour une croissance optimale. En effet, la sélection des symbioses tolérantes à la déficience en P pourrait porter sur l'EUP pour la fixation de N<sub>2</sub> qui semble spécifique à l'interaction des deux symbiotes (Israel et Rufty, 1988). L'intérêt des légumineuses nodulées à forte EUP pour la FSN concerne prioritairement les zones agricoles où des impératifs sociologiques ou écologiques exigent une gestion plus économe du fertilisant P (Clarkson et Hawkesford, 1993 ; Batten, 1992). Des différences génotypiques d'EUP pour la FSN chez le soja (Israel et Rufty, 1988 ; Gunawardena et al., 1993) et le haricot (Vadez et al., 1999), justifient l'importance d'une sélection variétale basée sur ce critère qui dépendrait en partie de l'allocation du P aux nodosités. Celles-ci contenant jusqu'à 20% du P total de la plante et constituent des puits additionnels pour le P qui limite la proportion de P allouée aux

autres organes, notamment les feuilles dont la teneur en P est par conséquent diminuée (Vadez et Drevon, 2001). Une forte EUP pour la FSN de la symbiose reposerait sur certains mécanismes favorisant l'allocation précoce du P aux nodosités et la remobilisation du P à partir des organes sénescents. Chez *Acacia mangium*, les génotypes les plus tolérants à la déficience en P sont ceux qui ont un taux de N<sub>2</sub> fixé non affecté par la déficience en P (Sun et al., 1992), suggérant que la l'adaptation à la déficience en P est le maintien de l'activité nitrogénase grâce au maintien de la teneur nodulaire en P.

L'objectif de cette étude réalisée sous serre est d'analyser la relation qui pourrait exister entre la stimulation de l'activité fructose 1,6 bisphosphatase (FBPase) sous déficience en P dans les nodosités de quatre génotypes de haricot et l'EUP pour la FSN. Pour cela, l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) et l'allocation des nodosités en P sont analysés en relation avec l'EUP pour la FSN. La quantité de N<sub>2</sub> fixée et l'enrichissement en <sup>15</sup>N sont déterminées dans les plantes et nodosités de l'ensemble des génotypes de haricot testés.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Culture des plantes en hydroaéroponie**

Les lignées contrastantes de haricot RILs 115, 147, 34 et 29 sont choisies pour leur capacités élevées de fixation d'azote en conditions non limitantes et sous déficience en P (Vadez et al., 1999). Les graines sont stérilisées en surface avec 3% d'hypochlorite de calcium, rincées 5 fois avec l'eau distillée puis mises à germer. Après cinq jours, les plantules sont inoculées avec la souche *Rhizobium tropici* CIAT899 et transférées dans des bacs de 40 litres contenant la solution nutritive de Hernandez et Drevon (1991). Elle contient 75 ou 250 µmol de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pour les traitements respectivement déficients et suffisants en phosphore (P). Cette solution nutritive intensément aérée est maintenue à pH 7 par du CaCO<sub>3</sub> et renouvelé chaque semaine après le premier changement à deux semaines de cultures. Un apport initial de 2 µM d'urée stimule la nodulation et préserve la plante d'une carence azotée.

### **2.2. Mesure de l'activité phosphatase et FBPase**

Les phosphatases désignent les enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons ester phosphorique pour libérer l'ortho-phosphate (Pi). Pour leurs extractions, des échantillons de nodosités fraîches correspondant à 60 mg de poids frais sont récoltés à 42 jours après la transplantation des plantes. Chaque échantillon est broyé séparément dans 900 µl du tampon

d'extraction d'acétate de Na (50 mM, pH 5.5) contenant 5 mM de dithiotriéthol (Araujo et al., 2008 ; Kouas et al., 2009).

L'activité phosphatase est déterminée dans le surnageant en utilisant comme substrat, le para-nitrophényl phosphate (pNPP) (5 mM, pH 5.5). La phosphatase réagit avec le pNPP pour libérer une molécule de Pi en produisant le para-nitrophénol (PNP) de coloration jaune. 100 µl d'extrait de cotylédons ou de nodosités sont incubés pendant 20 min à 37°C avec un mélange de 300 µl de tampon acétate (0.2 M, pH 5.5) et 100 µl de pNPP. La réaction est arrêtée en ajoutant dans le milieu réactionnel 500 µl de NaOH (1N). Cette dernière réagit avec le PNP pour donner le paranitrophénolates coloré en jaune. Le blanc est préparé en ajoutant le substrat au mélange réactionnel préalablement arrêté par 500 µl de NaOH. L'activité phosphatase est déterminée par la mesure de la formation de la para-nitrophénolate à 410 nm. L'activité spécifique de la phosphatase est définie comme étant la quantité de protéines hydrolysant 1 nmol de pNPP par minute et par gramme de matière fraîche (Kouas et al., 2009).

Pour le dosage de l'activité FBPase, le substrat utilisé est le fructose 1,6 bisphosphate (10 µM, pH 5.5). L'hydrolyse de ce dernier conduit à la libération d'orthophosphate (Pi) et d'intermédiaire de fructose 6- phosphate. 100 µl d'extrait de nodosités est incubé pendant 20 min à 37°C avec un mélange de 300 µl de tampon d'acétate de sodium (0.2 M, pH 5.5) et 100 µl de substrat. La réaction est arrêtée par l'addition de 0.5 ml d'acide trichloracétique à 10%, et le mélange est centrifugé à 20 000 g pendant 6 min. Le blanc est préparé en ajoutant 100 µl d'extrait de nodosités au mélange réactionnel préalablement arrêté au TCA (10%) sans incubation et le mélange est centrifugé. La concentration de Pi libérée est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm en utilisant le vert de malachite. Une gamme étalon est préparée avec des concentrations en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  allant de 0 à 20 mg l<sup>-1</sup>. L'activité FBPase est ensuite exprimée en nmol de Pi libéré par min par g de matière fraîche (Lazali et al., 2013).

### **2.3. Récolte des plantes et détermination des biomasses**

La récolte des plantes est effectuée à 42 jours après la transplantation coïncidant avec le stade de floraison des plantes de haricot. Les biomasses sèches des parties aériennes, racinaires et des nodosités sont déterminées et leurs teneurs en P sont aussi dosées. L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne est estimée par la pente du modèle de régression de la biomasse des plantes sur la biomasse nodulaire (Drevon et al., 2011).

## 2.4. Dosage de la l'azote total et l'enrichissement en $^{15}\text{N}$

Le dosage de l'azote total et le rapport  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  est réalisé par spectrométrie de masse sur des échantillons de feuilles, racines et nodules finement broyés et préalablement séchés à 60°C pendant 72 heures à l'étuve. Un aliquote de 3 mg pour les feuilles et racines et 2 mg pour les nodules est injecté dans un analyseur élémentaire pour mesurer le  $\delta^{15}\text{N}$ . L'abondance naturelle en  $^{15}\text{N}$  de chaque échantillon est ensuite calculée en utilisant l'équation de Shearer et Kohl (1986) :  $\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ échantillon} - {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ atmosphère}) / {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ atmosphère}] \times 1000$  sachant que le rapport  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  de l'atmosphère égale à 0.3663%.

## 2.5. Estimation de la quantité de $\text{N}_2$ fixée

La quantité de  $\text{N}_2$  fixée est estimée comme étant égal à la différence d'azote total accumulée dans les plantes récoltées au stade floraison (42 jours après la transplantation) et avant la nodulation (15 jours après la transplantation) (Lazali et al., 2014).

## 2.6. Analyse statistique

Le dispositif expérimental adopté est un bloc aléatoire complet. Les valeurs des différents paramètres étudiés représentent les moyennes de sept répétitions. L'analyse des données est réalisée par ANOVA à deux facteurs avec le logiciel R (2.14.1). Les comparaisons entre les différentes moyennes sont effectuées par le test de Tukey HSD à 5% de probabilité. Les relations entre les différents paramètres sont testées par analyse de régressions linéaires.

# 3. Résultats

## 3.1. Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne

L'effet de la déficience en P sur la nodulation et la croissance des plantes est analysé chez quatre lignées de haricot en symbiose avec *R. tropici* CIAT899 (figure IV.3). L'analyse statistique des données montre que des différences significatives sont attribuées aussi bien aux génotypes qu'aux interactions génotype x niveau en P. Cette contrainte induit une diminution significative (de 23 à 38%) de la biomasse nodulaire des lignées testées (figure IV.3a). Les résultats montrent que les lignées 115 et 147 enregistrent respectivement la forte et la faible biomasse nodulaire sous suffisance et sous déficience en P. Egalement, la nodulation est évaluée en analysant le degré de corrélation entre la biomasse des nodosités et leurs teneurs en P total (données non présentées). Il en ressort que, sous déficience en P, la biomasse nodulaire est significativement

corrélée à la teneur en P total ( $R^2 = 0.91^{**}$ ). Cependant, sous suffisance en P, aucune différence significative n'est observée entre ces deux paramètres.



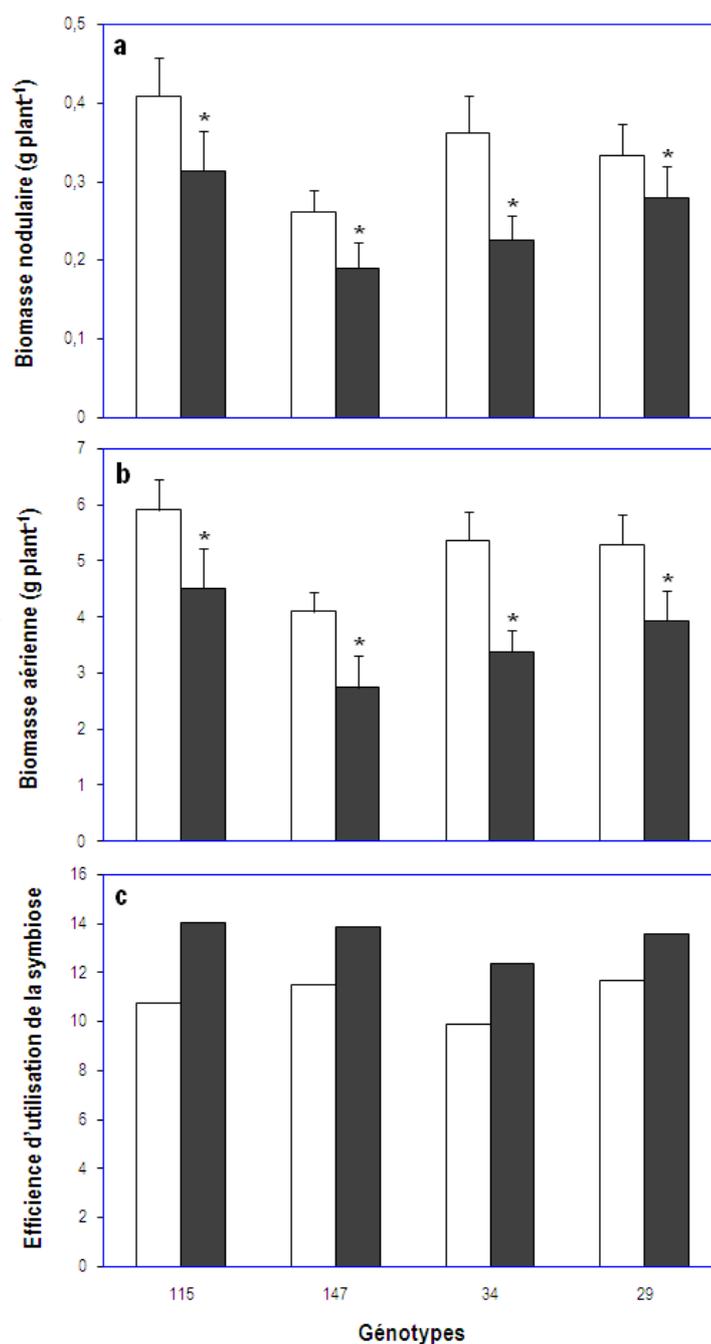
*Figure IV.1. Nodulation de la lignée tolérante 115 inoculée avec *R. tropici* CIAT899 et cultivée sous suffisance en P en hydroaéroponie sous serre.*

En réponse à la déficience en P, une variabilité génotypique évidente est décelée en termes de biomasses des parties aériennes des plantes des différents génotypes étudiés (figure IV.3b). Sous cette contrainte, la biomasse diminue significativement chez l'ensemble des lignées mais de façon plus prononcée chez la lignée 34 (37%) et la lignée 147 (33%).



**Figure IV.2.** Différence d'expression entre deux lignées de haricot les plus contrastantes à la déficience en P inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous déficit en P en hydroaéroponie sous serre.

La fixation symbiotique de  $N_2$  est évaluée par la droite de régression des biomasses aériennes en fonction des biomasses nodulaires. Ainsi, l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) entre les différentes lignées est calculée à partir de la pente de régression. Sous suffisance en P, l'EUSR des lignées sensibles 147 et 29 est significativement le plus élevé, avec plus de 12 g MS aérienne par g MS nodulaire comparées avec celle des lignées tolérantes 115 et 34 (figure IV.3c). Sous déficience en P, l'EUSR est plus élevée chez les lignées tolérantes 115 (23%) et 34 (19%) par rapport à celle des lignées sensibles 147 et 29.



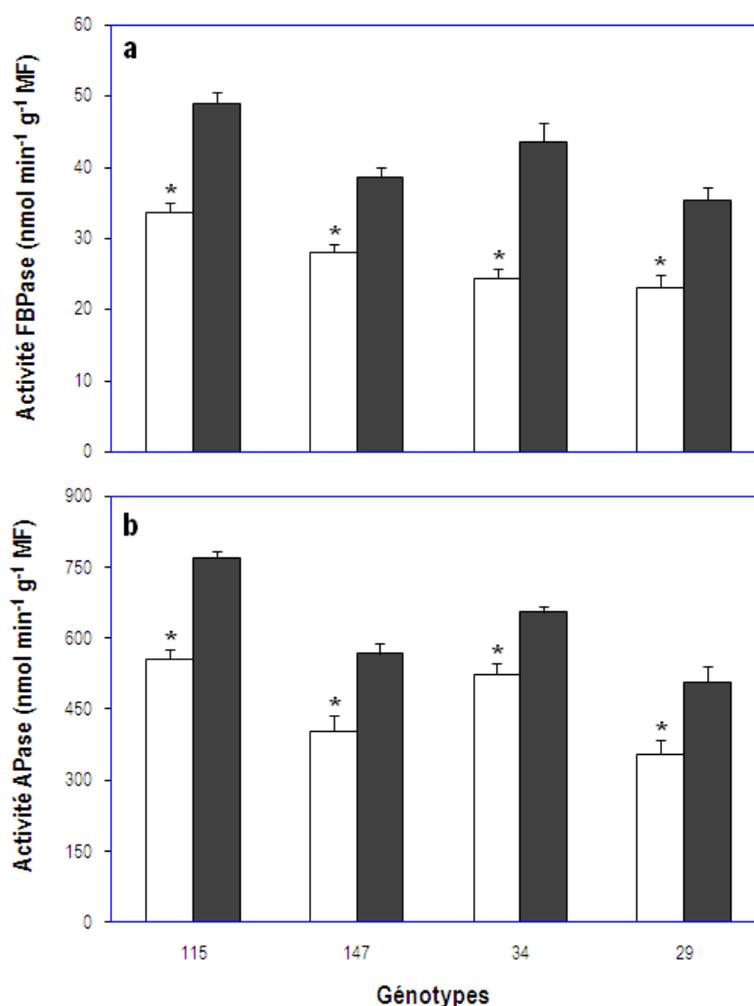
**Figure IV.3.** Nodulation (a), croissance (b) et efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (c) de quatre lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### 3.2. Activités FBPase et phosphatase

Les résultats obtenus sur les activités FBPase et phosphatase nodulaires montrent des variations significatives qui semble dépendre à la fois des génotypes et du niveau du P appliqué (figure V.4). Les nodosités des plantes exposées à la déficience en P présentent des activités FBPase

significativement élevées chez les lignées tolérantes 115 et 34 ( $46 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) que chez les lignées sensibles ( $37 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ). Cette augmentation est plus importante chez la lignée 34 (44%) suivit par la lignée 29 (34%) qui montrent une activité FBPase plus faible sous suffisance en P en comparaison avec la lignée tolérante 115 (figure IV.4a).

Similairement, cette contrainte provoque une augmentation significative de l'activité phosphatase dans les nodosités de toutes les lignées étudiées (figure IV.4b). En réponse à cette contrainte, l'activité phosphatase présente des variations irrégulières selon les génotypes. Cependant, l'activité phosphatase augmente de 28% et 31%, respectivement dans les nodosités des lignées 115 et 29 testées sous déficience en P. En revanche, la lignée 34 fait exception par une faible augmentation de ce paramètre entre les deux traitements en P.

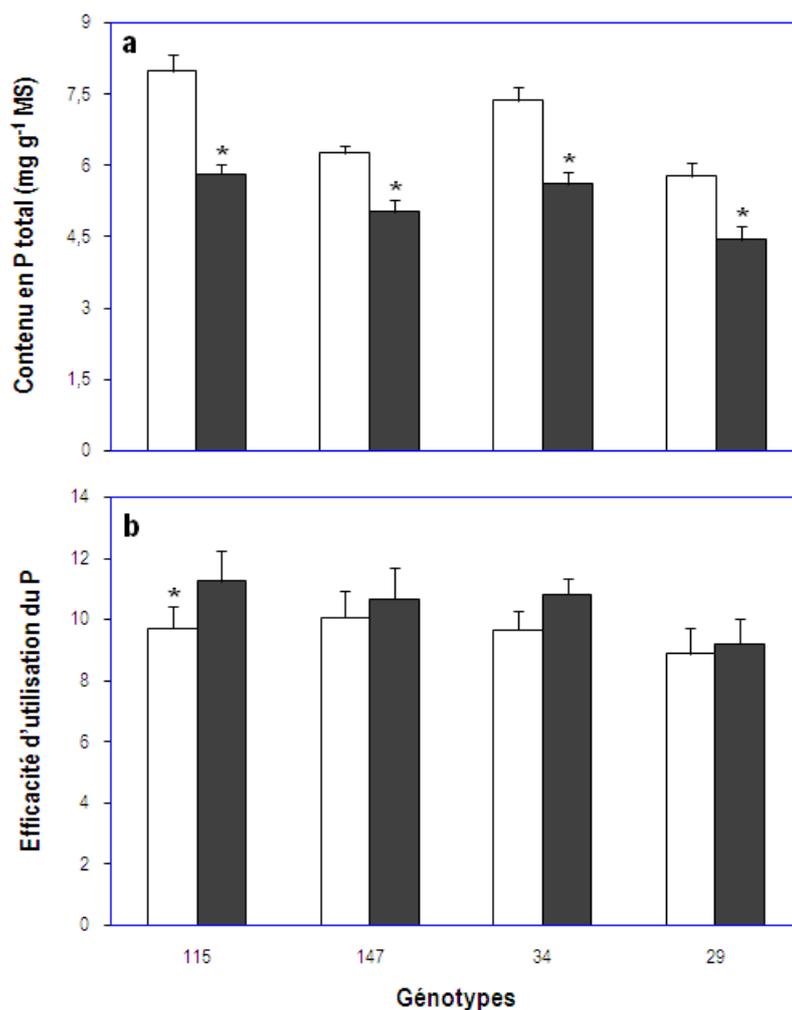


**Figure IV.4.** Activité FBPase (a) et phosphatase (b) dans les nodosités de quatre lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### **3.3. Teneur des nodosités en P et efficacité de son utilisation pour la FSN**

Les résultats indiqués dans la figure IV.5 montrent que la teneur des nodosités en P total et inorganique varie d'une manière significative entre les génotypes testés et le niveau du P appliqué. Sous suffisance en P, les lignées tolérantes 115 et 34 montrent des teneurs moyennes en P total nodulaire élevées par rapport aux lignées sensibles 147 et 29 (figure IV.5a). Par contre, la déficience en P induit une baisse considérable de l'accumulation en P total dans les nodosités des lignées 115 et 34 (25%) mais moins importante dans les nodosités de la lignée sensible 147 (20%).

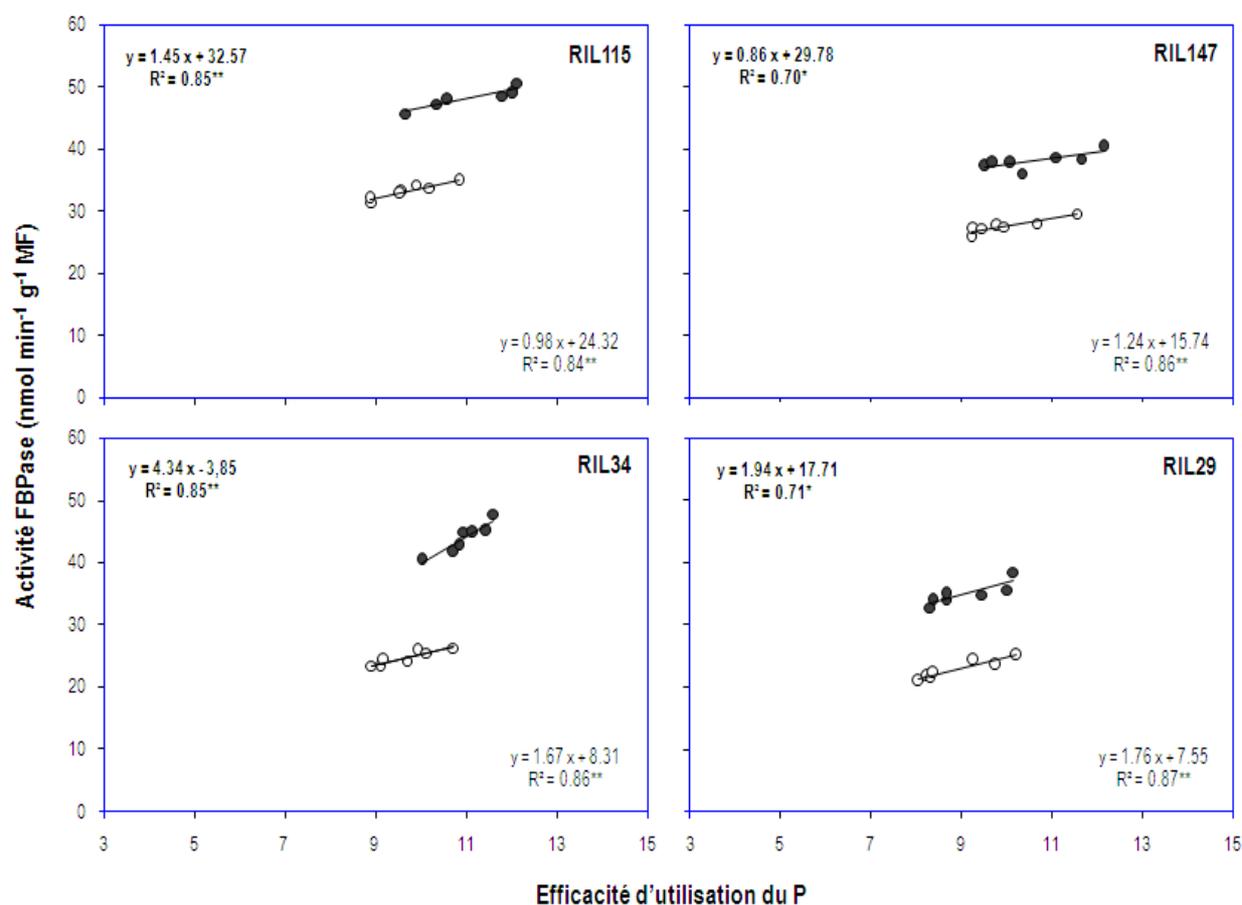
L'EUP pour la FSN des différentes lignées de haricots testées dans cette expérience montre une légère variabilité en réponse à la déficience en P (figure IV.5b). En effet, une augmentation significative de l'EUP pour la FSN (14%) est observée sous déficience en P chez la lignée tolérante 115 ayant la haute valeur en EUP pour la FSN parmi les quatre génotypes évalués. En revanche, les augmentations observées de l'EUP pour la FSN sous déficience en P pour le reste des génotypes ne sont pas statistiquement significatives.



**Figure IV.5.** Teneur des nodosités en P total (a) et l'efficacité de son utilisation (b) de quatre lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### 3.4. Rôle de FBPase dans l'efficacité d'utilisation du P pour la FSN

La remobilisation de P par l'enzyme FBPase pour la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> est évaluée en analysant la relation entre l'EUP et l'hydrolyse de fructose 1,6 bisphosphate par l'enzyme FBPase (figure IV.6). L'analyse des résultats montre que la libération de Pi par l'enzyme FBPase est significativement corrélée avec l'augmentation de l'efficacité d'utilisation de Pi libéré pour la FSN quelque soit le niveau du P appliqué. Indépendamment des géotypes, cette corrélation est plus importante sous déficience ( $R^2=0.79^{**}$ ) que sous suffisance en P ( $R^2=0.68^*$ ).



**Figure IV.6.** Relation entre l'efficacité d'utilisation du P et l'activité FB Pase dans les nodosités de quatre lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### 3.5. Fixation symbiotique de N<sub>2</sub> et discrimination contre le <sup>15</sup>N

Les résultats obtenus en termes de la fixation de N<sub>2</sub> et l'enrichissement des plantes et nodosités en <sup>15</sup>N montrent des variations significatives qui semblent dépendre à la fois du génotype et du niveau du P appliqué (tableau IV.1). Dans les nodosités des plantes soumises à la déficience en P, une diminution significative du rapport <sup>15</sup>N/N-total est notée chez les lignées tolérantes 115 et 34. En revanche, la réduction de ce dernier rapport demeure statistiquement non significative pour les lignées sensibles 147 et 29. Des différences génotypiques du rapport <sup>15</sup>N/N-total dans les feuilles sont observées sous déficience en P. Cette contrainte diminue significativement ce paramètre chez toutes les lignées testées dans cette expérience à l'exception de la lignée sensible 29. Ce dernier génotype enregistre le même rapport <sup>15</sup>N/N-total sous suffisance que sous déficience en P. La variation du ratio <sup>15</sup>N/N-total dans les racines est comparable à celle des

feuilles. Ainsi, sous déficience en P, une diminution significative du ratio  $^{15}\text{N}/\text{N}$ -total est notée chez les lignées tolérantes 115 et 34 alors que chez les autres lignées, cette diminution n'est pas statistiquement significative. En outre, quelque soit le niveau du P appliqué, le ratio moyen  $^{15}\text{N}/\text{N}$ -total nodulaire est plus élevé que celui des parties aériennes et racinaires indiquant une discrimination contre le  $^{15}\text{N}$  dans ces parties de la plante.

Quant à la fixation de  $\text{N}_2$ , des diminutions significatives sont observées et sont plus prononcées chez la lignée sensible 29 (22%) que chez lignées tolérantes 115 et 34 (14%). Sous suffisance en P, la quantité de  $\text{N}_2$  fixée varie de 50 à 78 mg de  $\text{N}_2$  fixé plant<sup>-1</sup> respectivement pour les lignées 29 et 115.

**Tableau IV.1.** Variation du ratio  $^{15}\text{N}/\text{N}$ -total et la quantité de  $\text{N}_2$  fixée par quatre lignées recombinantes contrastantes de haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance versus déficience en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation. Pour chaque paramètre, les valeurs des moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$ .

Lignées	$^{15}\text{N}/\text{N}$ total (%)						$\text{N}_2$ fixée (mg plant <sup>-1</sup> )	
	Nodosités		Feuilles		Racines		P-déficient	P-suffisant
	P-déficient	P-suffisant	P-déficient	P-suffisant	P-déficient	P-suffisant		
115	0.3686 <sup>a</sup>	0.3692 <sup>bc</sup>	0.3649 <sup>a</sup>	0.3658 <sup>c</sup>	0.3656 <sup>a</sup>	0.3661 <sup>cd</sup>	65.24 <sup>a</sup>	76.77 <sup>c</sup>
147	0.3685 <sup>bc</sup>	0.3688 <sup>cd</sup>	0.3644 <sup>bc</sup>	0.3651 <sup>d</sup>	0.3655 <sup>bcd</sup>	0.3657 <sup>cd</sup>	52.69 <sup>b</sup>	62.75 <sup>d</sup>
34	0.3684 <sup>ab</sup>	0.3690 <sup>d</sup>	0.3643 <sup>ab</sup>	0.3655 <sup>d</sup>	0.3653 <sup>ab</sup>	0.3660 <sup>d</sup>	60.58 <sup>cd</sup>	70.80 <sup>e</sup>
29	0.3686 <sup>bc</sup>	0.3688 <sup>cd</sup>	0.3649 <sup>c</sup>	0.3649 <sup>c</sup>	0.3659 <sup>abc</sup>	0.3659 <sup>bc</sup>	39.88 <sup>e</sup>	50.62 <sup>f</sup>

#### 4. Discussion

Dans ce chapitre, l'EUP pour la FSN varie entre les géotypes, et en fonction du niveau du P appliqué (figure IV.5). La déficience en P a entraîné une diminution importante de la nodulation et par conséquent la fixation de  $\text{N}_2$  mais a stimulé certaines activités enzymatiques liés à l'EUP pour la FSN. L'analyse des corrélations significatives entre l'activité FBPase et l'EUP pour la FSN ( $R^2 = 0.79^{**}$ ) au niveau des nodosités déficientes en P laissent supposer que les nodosités pourraient contribuer à l'EUP pour la FSN en étant les premiers organes avec les racines qui se trouvent directement exposées à la déficience en P. Dans cette étude, la compréhension de la physiologie nodulaire fut une opportunité intéressante pour expliquer plausiblement que

l'augmentation de l'EUP pour la FSN serait due à la stimulation de l'activité FBPase dans les nodosités des lignées cultivées sous déficience en P.

Sous déficience en P, les activités FBPase et phosphatase dans les nodosités ont fortement augmenté chez les lignées tolérantes par rapport aux lignées sensibles (figure IV.4). Cette augmentation s'est associée à une augmentation significative de la quantité de N<sub>2</sub> fixée par unité de biomasse nodulaire et a révélé une corrélation positive entre le N<sub>2</sub> fixé et la teneur des nodosités en P (données non présentées). Ces résultats qui ont montré l'importance des exigences en P des nodosités des lignées tolérantes suggèrent que cet élément pourrait exercer un rôle spécifique dans le développement et le fonctionnement nodulaire. Une situation comparable a été analysée chez d'autres génotypes du haricot montrant que la variabilité génotypique était plus importante vis-à-vis des exigences en P que de la teneur des plantes en azote (Vadez et al., 1999). Similairement, Rotaru et Sinclair (2009) avaient trouvé des corrélations positives entre la teneur des plantes de soja en azote, la biomasse des nodosités et leurs teneurs en P. Ces auteurs ont ajouté que l'élévation de la concentration en P dans les nodosités signifie une capacité importante de la fixation de N<sub>2</sub> par unité de masse nodulaire. Dans ce sens, des variations dans les ratios <sup>15</sup>N/N-total sont observées entre les différentes parties des génotypes testés (tableau IV.1). Ce paramètre est significativement réduit chez les lignées tolérantes 115 et 34 par rapport aux lignées sensibles qui n'ont présenté aucune diminution significative sous déficit en P. En revanche, sous suffisance en P, la lignée 115 a enregistré un taux fort en termes de fixation de N<sub>2</sub> par g de biomasse nodulaire. Généralement, cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de certaines interactions significatives entre le ratio <sup>15</sup>N/N-total et la quantité de N<sub>2</sub> fixée et aussi l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne. Il en ressort aussi que le faible taux de fixation de N<sub>2</sub> enregistré pour la lignée sensible 29, indépendamment du niveau du P, pourrait être dû à la faible nodulation et en conséquence à une efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne médiocre. Ainsi, il a été argumenté que la capacité de fixation de N<sub>2</sub> était plus faible chez les plantes de haricot soumises à une déficience en P aussi bien précoce que permanente par rapport aux plantes modérément alimentées en P (Kouas et al., 2005). De plus, de nombreux travaux (Hogberg, 1997; Peoples et al., 2002; Lazali et al., 2014) ont mis en évidence l'existence d'un phénomène interne de fractionnement isotopique de l'azote assimilé par les légumineuses pendant la fixation de N<sub>2</sub>. Ce phénomène entraînant l'appauvrissement en <sup>15</sup>N de la légumineuse, explique les ratios <sup>15</sup>N/N-total plus faibles dans les parties aériennes et racinaires comparativement aux nodosités (tableau IV.1). Il est aussi à l'origine de la valeur B lorsque la légumineuse dépend exclusivement de l'azote atmosphérique. Selon Peoples et al.,

(2002), la valeur B est beaucoup moins dépendante de la variété de la légumineuse, que de la souche rhizobienne impliquée dans le fixation de N<sub>2</sub>.

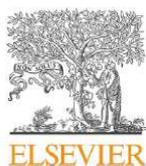
Globalement, ces résultats montrent que les teneurs des nodosités en P et leurs biomasses ont varié différemment sous déficience en P en relation avec la FSN. La tendance de l'évolution de la FSN semble dépendre des génotypes dont la fixation de N<sub>2</sub> est positivement influencée par l'allocation de leurs nodosités en P. Nos interprétations sont en accord avec les travaux de Vadez et al. (1996) et Tang et al. (2001) suggérant que l'approvisionnement en P des nodules pourrait induire une augmentation de l'activité spécifique de la nitrogénase. En effet, les différences génotypiques pour l'accumulation d'azote en fonction de la nutrition en P sont plus prononcées lorsque les plantes dépendent de la FSN. En conséquence, les différences de quantité de N<sub>2</sub> fixée entre les lignées (tableau 1) s'expliqueraient par des différences d'EUP pour la FSN (figure 3b). Cette dernière apparaît donc bien un meilleur paramètre d'estimation de tolérance de la symbiose rhizobienne à la déficience en P, comme l'ont argumenté Siddiqi et Glass (1981). L'EUP pour la FSN est donc un paramètre fiable pour discriminer le besoin optimal en P de génotypes chez les légumineuses dépendant de la fixation de N<sub>2</sub>. En effet, l'allocation de P aux nodosités représente 10 à 20% du P total de la plante, et une plus forte proportion de P est allouée aux nodosités des lignées 115 et 34. Ces résultats sont en accord avec les travaux montrant une variabilité génotypique dans l'allocation de P aux nodosités de la luzerne (Schultze et Drevon, 2005). Les valeurs d'allocation nodulaire du P obtenues dans notre travail sur le haricot sont comparables à celles trouvées chez le soja (Israel, 1987) et le niébé (Alkama et al., 2009). Ceci explique pourquoi des recherches ont été entreprises pour améliorer la fixation de N<sub>2</sub> par la sélection des génotypes nodulant abondamment (Kipe-Nolt et Giller, 1993). Nos résultats suggèrent qu'une masse nodulaire importante peut permettre une importante activité fixatrice seulement si les nodosités sont aussi très efficaces métaboliquement. En effet, la teneur en P des nodosités de la lignée 115 a légèrement diminué sous déficience en P alors que celle de la lignée 147 a fortement diminué. Or, la fraction du P impliqué dans le métabolisme est plus sensible à la déficience en P que la fraction structurale (Bielecki, 1973) et il est donc possible que cette diminution ait affecté la fraction du P impliquée dans le métabolisme. Ces résultats montrent que des génotypes peuvent avoir des potentiels de fixation de N<sub>2</sub> différents avec une masse nodulaire semblable, comme c'est le cas de la lignée 34. Cette différence serait associée à une différence d'EUP pour la FSN dans les nodosités. Nos résultats suggèrent aussi qu'une large proportion du P de la nodosité est structurale. Ceci expliquerait la forte réduction de la masse nodulaire sous

déficience en P (Vadez et Drevon, 2001 ; Alkama et al., 2009 ; Mandri et al., 2012 ; Bargaz et al., 2013a).

Bien que le haricot englobe un grand nombre de génotypes dont une partie s'est montrée contrastant vis-à-vis du déficit en P (Beebe et al., 1997), elles n'ont pas montré des différences importantes dans l'EUP pour la FSN (Lynch et Beebe, 1995). En effet, dans cette étude, l'EUP pour la FSN a montré une variation importante entre les différents génotypes testés. Il apparaît alors que les lignées 115 et 34 sont plus efficaces pour l'utilisation du P que les lignées 147 et 29 (figure IV.5c). Ceci conforte les résultats d'autres travaux justifiant qu'une meilleure fixation de N<sub>2</sub> sous déficience en P est aussi associée à une meilleure EUP pour la FSN (Gunawardena et al., 1993). Nos résultats sont en accord avec ceux de Israel et Ruffy (1988) et Batten (1992) qui montrent qu'il est possible de sélectionner pour l'EUP afin d'améliorer la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>. Une sélection pour l'EUP serait importante en termes de ressource en P du sol puisque l'EUP pour la FSN consiste à fixer davantage de N<sub>2</sub> par unité de P allouée, donc permettant une meilleure gestion des éléments minéraux.

## **5. Conclusion**

En conclusion, nos résultats ont suggéré qu'en réponse à la déficience en P, des différences importantes sont observées entre les génotypes testés pour leurs activités FBPase, leurs demandes nodulaires en P et leurs capacités de FSN. Face au déficit en P, les lignées 115 et 34 sont les plus efficaces pour l'utilisation de P pour la FSN par rapport aux lignées 147 et 29. La performance des génotypes étudiés en termes de fixation de N<sub>2</sub> pourrait dépendre de la corrélation significative ainsi observée entre l'activité FBPase et l'EUP pour la FSN indiquant l'importance de la haute demande des légumineuses nodulées en P. Ces différences dans la physiologie des nodosités du haricot influenceraient la fixation de N<sub>2</sub> qui dépendrait principalement des facteurs génétiques.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jplph](http://www.elsevier.com/locate/jplph)

Physiology

## Discrimination against $^{15}\text{N}$ among recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* L. contrasting in phosphorus use efficiency for nitrogen fixation

Mohamed Lazali<sup>a,b,c,\*</sup>, Adnane Bargaz<sup>d</sup>, Georg Carlsson<sup>d</sup>,  
Sidi Mohamed Ounane<sup>b</sup>, Jean Jacques Drevon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, Place Pierre Viala 34060 Montpellier, France

<sup>b</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Département de phytotechnie, Avenue Hassan Badi, El Harrach 16200 Alger, Algeria

<sup>c</sup> Université de Khemis Miliana, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie & des Sciences de la Terre, Route Theniet El Had, Soufay 44225 Ain Defla, Algeria

<sup>d</sup> Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Department of Biosystems and Technology, Box 103, SE-23053 Alnarp, Sweden



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 March 2013

Received in revised form 19 July 2013

Accepted 22 July 2013

Available online 12 September 2013

## Keywords:

 $^{15}\text{N}$  $\text{N}_2$  fixation*Phaseolus vulgaris*

Phosphorus deficiency

Symbiosis

## ABSTRACT

Although isotopic discrimination processes during nitrogen (N) transformations influence the outcome of  $^{15}\text{N}$  based quantification of  $\text{N}_2$  fixation in legumes, little attention has been given to the effects of genotypic variability and environmental constraints such as phosphorus (P) deficiency, on discrimination against  $^{15}\text{N}$  during  $\text{N}_2$  fixation. In this study, six *Phaseolus vulgaris* recombinant inbred lines (RILs), i.e. RILs 115, 104, 34 (P deficiency tolerant) and 147, 83, 70 (P deficiency sensitive), were inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899, and hydroaerobically grown with P-sufficient ( $250 \mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$ ) versus P-deficient ( $75 \mu\text{mol P plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$ ) supply. Two harvests were done at 15 (before nodule functioning) and 42 (flowering stage) days after transplanting. Nodulation, plant biomass, P and N contents, and the ratios of  $^{15}\text{N}$  over total N content ( $^{15}\text{N}/\text{Nt}$ ) for shoots, roots and nodules were determined. The results showed lower  $^{15}\text{N}/\text{Nt}$  in shoots than in roots, both being much lower than in nodules. P deficiency caused a larger decrease in  $^{15}\text{N}/\text{Nt}$  in shoots ( $-0.18\%$ ) than in nodules ( $-0.11\%$ ) for all of the genotypes, and the decrease in shoots was greatest for RILs 34 ( $-0.33\%$ ) and 104 ( $-0.25\%$ ). Nodule  $^{15}\text{N}/\text{Nt}$  was significantly related to both the quantity of  $\text{N}_2$  fixed ( $R^2 = 0.96^{***}$ ) and the P content of nodules ( $R^2 = 0.66^*$ ). We conclude that the discrimination against  $^{15}\text{N}$  in the legume  $\text{N}_2$ -fixing symbiosis of common bean with *R. tropici* CIAT899 is affected by P nutrition and plant genotype, and that the  $^{15}\text{N}/\text{Nt}$  in nodules may be used to screen for genotypic variation in P use efficiency for  $\text{N}_2$  fixation.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## Introduction

The relative abundance of the stable nitrogen isotope  $^{15}\text{N}$  in the biosphere varies as a result of isotopic discrimination during physical, chemical and biological processes (Hauck, 1973). In legume-rhizobia symbiosis,  $\text{N}_2$ -fixing root-nodules are often

enriched in  $^{15}\text{N}$  as compared to above-ground plants (Shearer and Kohl, 1986). However, the abundance of  $^{15}\text{N}$  may be affected by abiotic and biotic factors. The latter may include the genotypic diversity both of the host and the rhizobial symbiont as well as the corresponding nodule activities such as nodule respiration (Bargaz et al., 2011).

Discrimination against  $^{15}\text{N}$  during  $\text{N}_2$  fixation and export of fixed N from the nodules to the shoots has been observed in perennial *Trifolium* species (Steele et al., 1983; Ledgard, 1989; Carlsson et al., 2006), annual *Lupinus* species (Bergersen et al., 1988) and *Glycine max* (Kohl et al., 1983; Shearer et al., 1984; Bergersen et al., 1986). Differences in the  $^{15}\text{N}$  signature between parts of a single plant have been attributed to preferential acquisition of ammonium or nitrate (Evans, 2001), nitrate reduction in roots or shoots (Pate et al., 1993; Unkovich et al., 2000),  $\text{N}_2$  fixation in nodules (Shearer et al., 1984) and to such abiotic factors as drought (Robinson et al., 2000). These changes in discrimination against  $^{15}\text{N}$  among nodulated-legume

Abbreviations:  $^{15}\text{N}/\text{Nt}$ , ratio of  $^{15}\text{N}$  over total N content; DAT, days after transplanting; EURS, efficiency in use of the rhizobial symbiosis; N, nitrogen; nDW, nodule dry weight; P, phosphorus; PUE, phosphorus use efficiency; RIL, recombinant inbred line; sDW, shoot dry weight; SNF, symbiotic nitrogen fixation.

\* Corresponding authors at: Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, Place Pierre Viala 34060 Montpellier, France.  
Tel.: +33 0 4 99 61 23 32; fax: +33 0 4 99 61 21 19.

E-mail addresses: [m.lazali@yahoo.fr](mailto:m.lazali@yahoo.fr) (M. Lazali), [drevonjj@supagro.inra.fr](mailto:drevonjj@supagro.inra.fr) (J.J. Drevon).

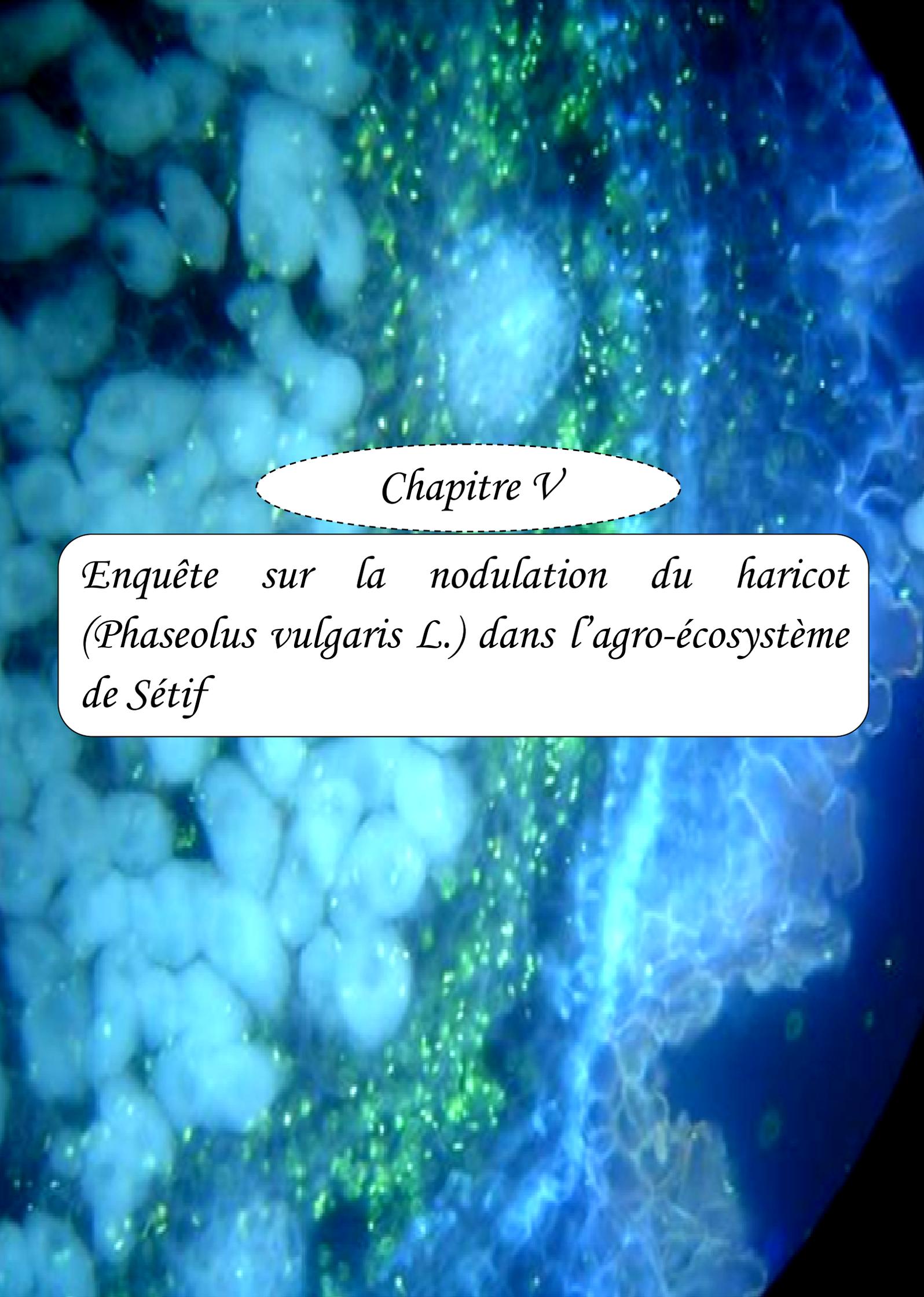
0176-1617/\$ – see front matter © 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.07.009>



**Fluorescent in situ RT-PCR to visualise the expression of fructose-1,6-bisphosphatase gene in nodule cortex of *Phaseolus vulgaris* under P-deficiency**

Journal:	<i>Plant Biotechnology Journal</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lazali, Mohamed; Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Eco&Sols; Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Phytotechnie Amenc, Laurie; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, Ounane, Sidi Mohamed; Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Avenue Hassan Badi 16200 El Harrach, Abadie, Josiane; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, Domergue, Odile; Institut National de la Recherche Agronomique, UMR LSTM, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, INRA-IRD-CIRAD. Campus International de Baillarguet 34398, Pernot, Catherine; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, Drevon, Jean-Jacques; Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro,
Keywords:	Transcript, Phosphorus, Fructose-1,6-bisphosphatase, <i>Phaseolus vulgaris</i> , Nodule, Stmbiosis

SCHOLARONE™  
Manuscripts



*Chapitre V*

*Enquête sur la nodulation du haricot  
(*Phaseolus vulgaris* L.) dans l'agro-écosystème  
de Sétif*

---

## *Enquête sur la nodulation du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) dans l'agro- écosystème de Sétif*

---

### **1. Introduction**

En complément de ce qui est présenté dans les chapitres précédents, sous conditions contrôlées, l'installation et la conduite des essais en plein champ représentent une partie déterminante de cette étude surtout que les sols de la région de Sétif se caractérisent par de nombreuses contraintes abiotiques, en particulier hydriques et édaphiques. La culture des légumineuses est bénéfique pour le maintien de la productivité des agro-écosystèmes (Graham et Vance, 2003) en contribuant à l'amélioration de la fertilité des sols, au contrôle des insectes nuisibles, des maladies et des mauvaises herbes dans les rotations culturales. Le développement d'une agriculture durable, objectif stratégique pour les pays du Maghreb, implique un accroissement et une amélioration de l'utilisation des légumineuses. Ces plantes toutes riches en protéines ont l'importante aptitude d'assurer leur propre approvisionnement en azote, à travers la symbiose avec les rhizobia. La réhabilitation des légumineuses dans le Maghreb permettra de substantielles économies d'engrais azotés épargnant une grosse part de l'énergie fossile et conduisant à une protection de l'environnement et le développement d'une agriculture équilibrée. La fixation symbiotique d'azote atmosphérique (FSN) par les nodosités permet à la plante de pourvoir à une grande partie de ses besoins en azote en réduisant la molécule N<sub>2</sub> (Dilworth et al., 2008).

La culture des légumineuses subit de nombreuses contraintes notamment la déficience des sols en P qui affecte 40% des surfaces cultivables mondiale (Vance, 2001). La majorité du P contenu dans les sols se trouve sous des formes minérales et organiques complexes qui ne sont pas directement utilisables par les légumineuses (Turner et al., 2005). Seule une faible proportion de P est alors présente sous forme assimilable (Pi) en solution et sa concentration est estimée pour la majorité des sols entre 0.1 et 10 µM (Hinsinger, 2001). Cette concentration est insuffisante pour les besoins nutritifs en P des plantes et la biodisponibilité en Pi devient alors rapidement un facteur limitant pour la production de biomasse dans les agro-écosystèmes. Les légumineuses ont des besoins plus importants en P comparativement aux autres espèces (Vance, 2001). Cette exigence est attribuée au coût énergétique élevé de la FSN qui apparaît particulièrement forte chez le haricot. Ce dernier est en effet plus affecté par la déficience en P que d'autres légumineuses (Vadez et al., 1999). La faible disponibilité en P du sol est une contrainte majeure pour la croissance et la FSN chez les légumineuses car les nodules ont des besoins élevés en P et

leur croissance est souvent limitée par cet élément (Vance, 2001, Jemo et al., 2006). La carence en P dans le sol réduit le nombre et la masse des nodules ainsi que l'activité de la nitrogénase des légumineuses (Qiao et al., 2007).

L'amélioration de la FSN chez les légumineuses permet de pallier à la déficience en azote de nombreux sols, de favoriser la disponibilité de certains nutriments du sol tels que P, et par conséquent d'améliorer la production végétale surtout dans les pays à faible utilisation d'intrants (Barron et al., 1999). Par ailleurs, une variabilité entre les cultivars existe pour certains traits liés à la fixation de N<sub>2</sub> (Graham et al., 2004). Dans ce sens, des recherches pour une optimisation de FSN chez différentes espèces de légumineuse ont été entreprises par de nombreux chercheurs (Kumaga, 1994; Kishinevsky et al., 1996; Dakora, 1998; Vadez et al., 1999 ; Massawe et al., 2005; Alkama et al., 2009; Richardson et al., 2009). En effet, la connaissance des aptitudes des légumineuses dans l'utilisation des nutriments sous suffisance ou déficience en P permettrait de mieux adapter ces plantes dans le système de culture paysans afin d'améliorer la productivité et de préserver l'environnement. A cet effet un essai a été mise en place dans plusieurs sites de la région de Sétif. Il a pour objectif l'amélioration de la productivité du haricot à travers un test multilocal installé chez des agriculteurs sans modification de leurs pratiques culturales en utilisant des lignées recombinantes contrastantes (RILs) potentiellement intéressantes. Le génotype local utilisé sert comme référence.

Ces génotypes à haut rendement, sont plus adaptés aux conditions écologiques difficiles (déficit hydrique, stress salin, nutrition minérale, surtout azotée et phosphatée). La comparaison au champ des RILs contrastantes en efficacité d'utilisation du P (EUP) pour la SNF permet de vérifier si la biodisponibilité du P affecte la nodulation et la croissance de la légumineuse. L'expression du contraste entre une lignée efficace pour l'utilisation du P, i.e. tolérante à une déficience de P, et une lignée inefficace, i.e. sensible à une déficience de P, permettrait-elle d'identifier des sols où l'offre de P serait limitante pour la croissance des légumineuses, voire des céréales associées ou en rotation ? Les lignées pourraient alors être utilisées comme outil de diagnostic pour la fertilité P des sols qui est difficilement compréhensible par des dosages chimiques d'extraits de sols. L'objectif final est d'obtenir une variété combinant une bonne adaptation aux contraintes de production, un rendement suffisamment élevé et des grains de qualité, associés à une symbiose rhizobienne efficace pour la nutrition azotée, ainsi qu'une utilisation efficace du P en vue d'économiser la fertilisation minérale et diminuer les risques de pollution qui y sont associés.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Ce travail est réalisé à travers des essais aux champs dans 18 parcelles appartenant à des agriculteurs de Sétif en culture irriguée durant 2 campagnes agricoles consécutives (2010/2011 et 2011/2012). Le réseau des parcelles est choisi en concertation avec les producteurs à partir d'un questionnaire.

Une variété locale Djadida et six autres lignées recombinantes contrastantes de haricot i.e. RILs 115, 147, 104, 34, 83 et 29 sont utilisées dans cette étude (figure V.1). Ces lignées sont issues du croisement de BAT 477 et DOR 364 réalisé par Ribet (1996) dans le cadre d'une coopération CIAT-INRA France. DOR 364 est une variété ayant une bonne adaptation en Amérique latine et aux Caraïbes du fait en particulier, de sa tolérance au virus BGMV, tandis que BAT 477 a été sélectionnée au Mexique pour sa tolérance à la sécheresse, et présente une EUP pour la FSN élevée. La sélection de ces lignées est fondée sur une méthodologie *in vitro* développée initialement sur soja (Drevon et al., 1987), puis adaptée avec succès au haricot (Hernandez et Drevon, 1991), ainsi qu'à d'autres légumineuses à graines comme le niébé, la fève et le pois-chiche (Drevon, communication personnelle).

Ces lignées sont caractérisées comme étant des génotypes P-efficaces (RILs 115, 104 et 34) et P-inefficace (RILs 147, 83 et 29), respectivement (Chapitre II). Djadida est une variété habituellement cultivée dans la région, du fait de sa disponibilité sur le marché, sa bonne productivité, ainsi que sa résistance aux maladies et son adaptation aux conditions du milieu.



Figure V.1. Les génotypes du haricot utilisés dans cette étude.

## 2.2. Tests multiloceaux

Les essais sont réalisés en plein champ dans la région de Sétif sur des parcelles insérées dans celles des producteurs (figure V.2). Les géotypes sont semés avec un espacement de 50 cm entre les rangs et de 10 cm sur le rang, soit 20 graines par m<sup>2</sup>. Chaque géotype est semé sur trois rangs. L'entretien des essais est le même que celui pratiqué par les agriculteurs sur leur culture mais sans apport de fertilisant. L'irrigation par gravité est effectuée deux fois par semaine afin de garantir une bonne croissance et éviter toute éventuelle contrainte liée au déficit en eau. Ce réseau de parcelles se situe à 1080 m d'altitude sous climat semi-aride. La température moyenne est de 5 à 26°C. Les précipitations sont en moyenne de 350 mm avec un maximum de pluviométrie en période hivernale entre Décembre et Mars. La période estivale est caractérisée par des températures excessives et une sécheresse plus ou moins accentuée généralement en Juillet et Août.

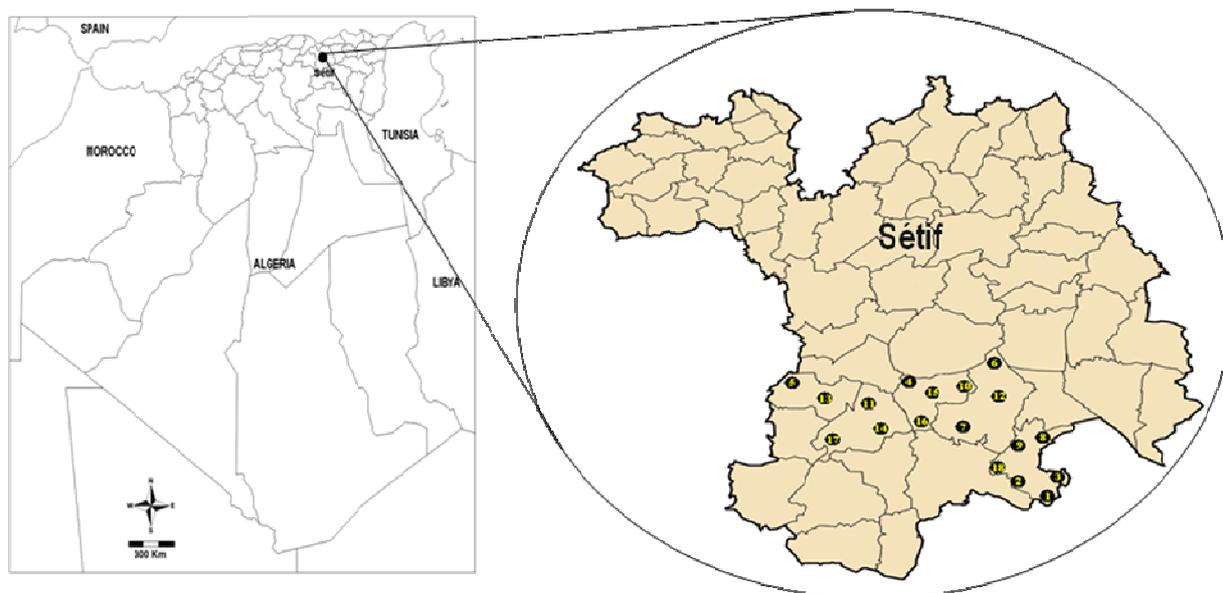


Figure V.2. Localisation des parcelles dans l'agro-écosystème de Sétif.

Ces tests ont pour objectif de vérifier si la symbiose rhizobienne contribue à la croissance du haricot en tentant de répondre aux trois questions suivantes : (i) les sols de Sétif renferment-ils des rhizobia natifs capables de noduler efficacement les géotypes de haricot ? La fixation de N<sub>2</sub> par les nodosités contribue-t-elle à la croissance et au rendement du haricot ? (iii) La formation et/ou le fonctionnement des nodosités sont-ils limités par des facteurs édaphiques ou climatiques ?



*Figure V.3. Mode de culture du haricot dans les parcelles d'agriculteurs à Sétif (Lazali, 2011).*

### 2.3. Analyses physico-chimiques des sols

Pour caractériser le sol des parcelles choisies, un échantillonnage de type diagonal est effectué. Les sols sont prélevés en cinq emplacements dans chacune des 18 parcelles. Notre échantillonnage est réalisé à l'aide d'une tarière à une profondeur de 30 cm, avant la mise en place des essais. C'est l'épaisseur réelle susceptible d'être exploitée par les racines du haricot qui conditionne l'épaisseur du sol à prélever. Les sols sont séchés à l'aire libre, broyés puis tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm. Les différentes analyses effectuées sont reportés dans le tableau V.1.

*Tableau V.1. Analyses physico-chimiques des sols.*

Analyse	Eléments	Méthode
<i>Granulométrie</i>	Argile	Pipette de Robinson
	Limon	
	Sable	
<i>Chimique</i>	pH	pH mètre
	Calcaire total	Calcimètre de Bernard
	Carbone	Walkey-Black
	Matière organique	Anne
	Azote	Kjeldahl
	Phosphore total et assimilable	Olsen

## 2.4. Echantillonnages des plants et paramètres analysés

Les plantes sont récoltées en pleine floraison, au stade intermédiaire entre R6 et R7 coïncidant avec d'apparition des gousses d'une longueur ne dépassant pas les 2 cm (figure V.4). Ce stade correspond à une nodulation optimale qui se traduit par une meilleure fixation symbiotique de  $N_2$ . Les plantes sont prélevées dans deux emplacements homogènes en déterrants les racines dans un volume de 20 cm de côté. Sur chaque plante, la partie aérienne est séparée des racines au niveau du nœud cotylédonaire, et les nodules sont détachés des racines et dénombrés. Le poids sec des nodules et celui des parties aériennes sont mesurés après 72 h de séchage à l'étuve à 60°C. Les valeurs de chacun des paramètres considérés représentent la moyenne de 10 échantillons.



*Figure V.4. Echantillonnage des plants en pleine floraison (A). La récolte des plantes coïncide avec leur bonne nodulation (B).*

## 2.5. Efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne

L'efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) est estimée par la pente du modèle de régression de la biomasse des plantes sur la biomasse des nodosités. Dans l'équation de la droite de régression  $y = ax + b$  ;  $b$  correspond à la production de biomasse sans nodulation et  $a$  représente cette efficience (Drevon et al., 2011).

## 2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique des données est réalisée par le logiciel R (2.14.1). La comparaison des moyennes est effectuée en prenant Tukey HSD comme test de détermination de la signification dans un seuil de probabilité de 5%. Les corrélations entre les différents paramètres sont testées

par analyse de régression. La classification ascendante hiérarchique des parcelles prospectées est réalisée par le logiciel Winstat (2.0).

### **3. Résultats**

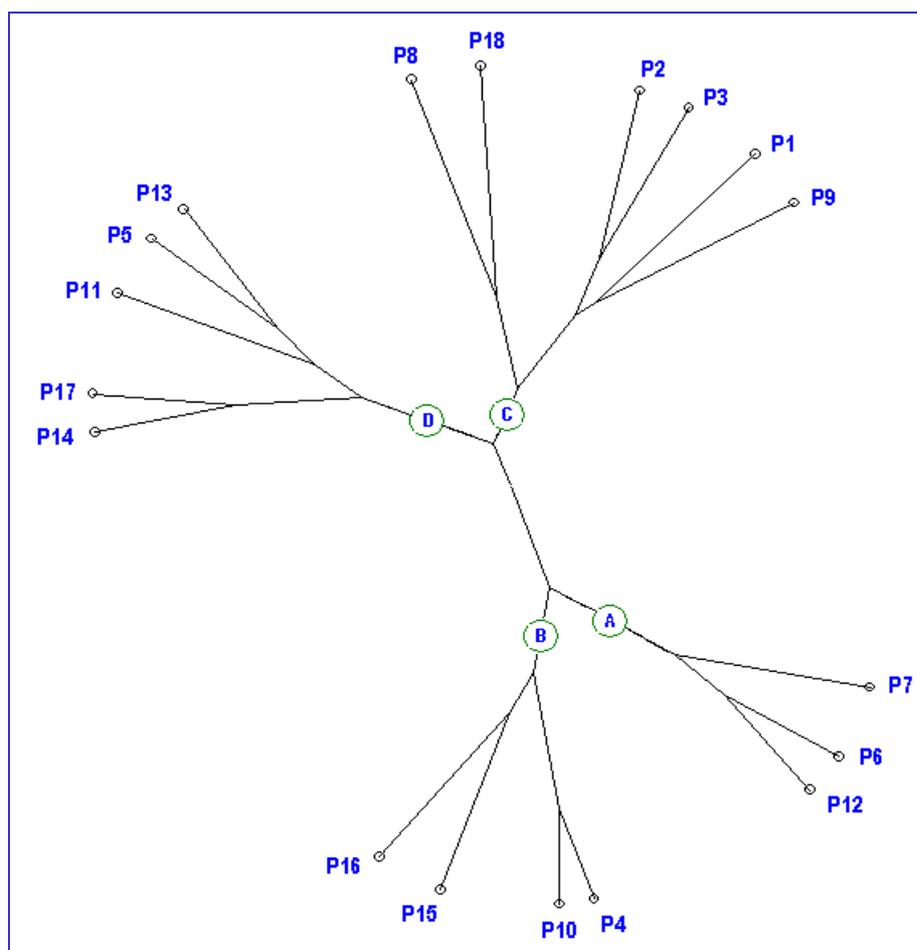
#### **3.1. Caractérisation physico-chimique des sols**

Les résultats du tableau V.2 montrent une grande variation entre les propriétés physico-chimiques des sols des 18 parcelles étudiées. Les parcelles P6, P8 et P14 montrent respectivement les pourcentages les plus élevés en argile (43%), en limon (37 %) et en sable (39%). Par contre, les pourcentages les plus faibles en argile (32%), en limon (30 %) et en sable (24%) sont enregistrés respectivement dans les parcelles P17, P7 et P16. Le pH des sols étudiés présente des valeurs allant de 7.4 à 8.5. Les parcelles P6, P10 et P12 ont un pH légèrement alcalins avec des valeurs allant de 7.4 à 7.6. Par contre le reste des parcelles ont un pH moyennement alcalins avec des valeurs comprises entre 7.6 et 8.5. De même, le calcaire total varie d'une manière significative entre 18 et 28% respectivement pour les parcelles P12 et P2. Les parcelles P1, P2, P3, P8 et P18 enregistrent des fortes teneurs en calcaire dépassent 25%. Le taux de matière organique le plus élevé est enregistré au niveau de la parcelle P12 avec une valeur moyenne de 1.31% tandis que le taux le plus faible est enregistré au niveau des parcelles P8 et P13 avec une valeur moyenne de 1.06%. La majorité des sols des parcelles ont des teneurs situées au dessus du seuil souhaitable (Anne, 1945) ; ils sont riches en matière organique. L'azote total varie entre 0.90 g kg<sup>-1</sup> de sol et 2.95 g kg<sup>-1</sup> de sol. Les teneurs moyennes à élevées en azote sont probablement dues à l'utilisation excessive des engrais azotés, sans tenir compte des besoins des cultures et les faibles prélèvements d'azote par les plantes. Les résultats de dosage du P total varient entre 97 ppm pour la parcelle P2 à 468 ppm pour la parcelle P12. La majorité des parcelles ont une teneur en P total supérieur à 130 ppm, un seuil jugé très élevés selon les normes d'interprétation de Murphy et Riley (1962). Toutefois, les résultats d'analyse du P assimilable, obtenus par la méthode Olsen, montrent que les sols des parcelles P5, P7, P13, P14 et P15 ont des teneurs moyennes en P assimilable. Les concentrations les plus faibles sont observées au niveau des parcelles P1, P2, P3, P9 et P18, tandis que les parcelles P4, P6, P12 présentent les teneurs les plus élevées en P assimilable.

**Tableau V.2.** Propriétés physico-chimiques des sols des 18 parcelles étudiées. \*\*,\*\*\* signifient que les différences sont statistiquement significatives au seuil de probabilité  $P \leq 0.01$  et  $P \leq 0.001$ .

Parcelles	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	pH	CaCO <sub>3</sub> (%)	MO (%)	N (g kg <sup>-1</sup> )	P-total (mg kg <sup>-1</sup> )	P-Olsen (mg kg <sup>-1</sup> )
	***	***	***	***	**	**	***	***	***
P1	41 ± 1.45	33 ± 1.74	26 ± 0.29	8.44 ± 0.06	26.17 ± 1.50	1.14 ± 0.08	0.90 ± 0.14	104 ± 31	3.14 ± 1.14
P2	38 ± 0.78	35 ± 1.46	27 ± 0.68	8.49 ± 0.05	28.46 ± 0.97	1.20 ± 0.03	2.00 ± 0.28	97 ± 13	2.92 ± 0.98
P3	40 ± 1.30	32 ± 0.54	28 ± 0.76	8.30 ± 0.13	26.27 ± 1.33	1.24 ± 0.07	2.50 ± 0.28	154 ± 19	5.44 ± 1.82
P4	39 ± 0.88	35 ± 0.74	26 ± 0.13	7.70 ± 0.21	19.68 ± 2.04	1.19 ± 0.04	2.30 ± 0.42	449 ± 11	24.43 ± 2.38
P5	37 ± 0.71	33 ± 0.32	30 ± 1.03	7.80 ± 0.21	20.10 ± 2.02	1.11 ± 0.01	0.90 ± 0.14	304 ± 29	18.08 ± 1.45
P6	41 ± 2.35	33 ± 1.18	26 ± 1.17	7.40 ± 0.15	20.47 ± 2.04	1.26 ± 0.06	2.60 ± 0.28	451 ± 28	26.60 ± 0.84
P7	43 ± 1.42	30 ± 0.87	27 ± 0.64	7.65 ± 0.14	19.90 ± 0.78	1.28 ± 0.05	2.40 ± 0.42	384 ± 23	19.96 ± 1.12
P8	33 ± 0.70	37 ± 0.85	30 ± 1.55	8.11 ± 0.21	24.90 ± 1.73	1.06 ± 0.06	1.05 ± 0.07	236 ± 28	11.21 ± 1.77
P9	43 ± 0.24	34 ± 1.61	23 ± 1.85	8.25 ± 0.14	24.41 ± 1.84	1.21 ± 0.04	1.60 ± 0.14	211 ± 20	10.82 ± 1.36
P10	38 ± 0.95	35 ± 1.57	27 ± 0.62	7.54 ± 0.21	19.12 ± 1.42	1.15 ± 0.07	2.05 ± 0.35	407 ± 35	22.51 ± 2.26
P11	38 ± 0.04	32 ± 0.74	30 ± 0.78	8.16 ± 0.21	24.11 ± 2.52	1.15 ± 0.04	1.25 ± 0.07	289 ± 25	11.71 ± 1.07
P12	41 ± 0.29	31 ± 1.58	28 ± 1.87	7.59 ± 0.19	18.50 ± 1.99	1.31 ± 0.06	2.95 ± 0.78	468 ± 20	27.51 ± 1.03
P13	36 ± 0.11	31 ± 1.10	33 ± 0.99	7.85 ± 0.14	22.07 ± 1.61	1.06 ± 0.08	0.90 ± 0.14	262 ± 26	16.66 ± 1.52
P14	31 ± 0.35	30 ± 1.58	39 ± 1.93	8.02 ± 0.19	20.82 ± 1.79	1.11 ± 0.01	1.25 ± 0.35	269 ± 19	17.43 ± 0.81
P15	36 ± 1.67	36 ± 0.93	28 ± 0.74	7.97 ± 0.11	20.65 ± 2.07	1.18 ± 0.04	1.68 ± 0.46	334 ± 35	18.41 ± 1.79
P16	40 ± 0.66	36 ± 1.34	24 ± 0.69	8.04 ± 0.16	23.19 ± 2.88	1.13 ± 0.01	1.60 ± 0.42	285 ± 22	13.50 ± 1.42
P17	32 ± 0.71	32 ± 0.94	36 ± 1.65	7.96 ± 0.10	23.36 ± 2.39	1.09 ± 0.12	1.05 ± 0.07	265 ± 21	14.05 ± 1.48
P18	35 ± 1.94	36 ± 0.03	29 ± 1.97	8.33 ± 0.08	25.17 ± 1.48	1.22 ± 0.03	1.15 ± 0.04	193 ± 18	6.84 ± 1.51

D'après l'analyse des sols, les sites peuvent être regroupés en 3 à 6 parcelles par cluster du sol (figure V.5). Les valeurs moyennes des propriétés physico-chimiques pour chaque cluster du sol sont illustrées dans le tableau V.3. La richesse des parcelles du cluster A en azote et P total dans leurs sols sont dus probablement à la fertilisation souvent excessive. Par contre, les parcelles du cluster D ont une faible concentration en azote ce qui peut être expliqué par un faible apport en fertilisants. Les autres clusters du sol ont des concentrations moyennes en azote et P total.



*Figure V.5. Classification des parcelles en fonction de leurs propriétés physico-chimiques des sols.*

### 3.2. Teneurs en P assimilables des sols

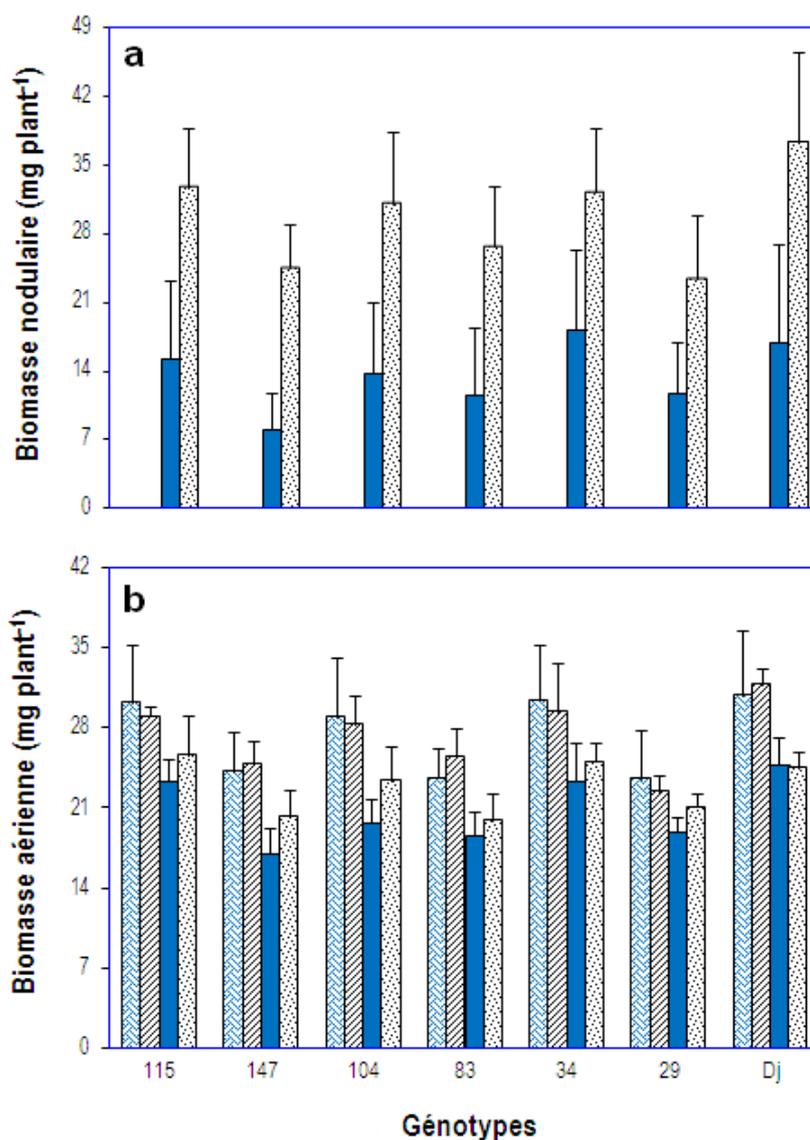
Les résultats illustrés dans le tableau V.3 montrent une différence significative entre les clusters de sols pour leur concentration en P Olsen. En effet, La concentration en P la plus élevée est enregistrée dans les sols du cluster A avec une valeur moyenne de 24.69 ppm, tandis que les sols du cluster D enregistrent une concentration moyenne en P (15.58 ppm). En revanche, les sols du cluster C sont caractérisés par une déficience en P (6.73 ppm). La concentration en P dans les sols du cluster A est 4 fois plus élevée par rapport à celle des sols du cluster C.

**Tableau V.3.** Propriétés physico-chimiques des 4 clusters de sols. NS signifie que les différences ne sont pas statistiquement significatives. \*\*, \*\*\* signifient que les différences sont statistiquement significatives au seuil de probabilité  $P \leq 0.01$  et  $P \leq 0.001$ .

Soil clusters	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	pH	CaCO <sub>3</sub> (%)	MO (%)	N (g kg <sup>-1</sup> )	P total (mg kg <sup>-1</sup> )	P Olsen (mg kg <sup>-1</sup> )
	ns	***	**	***	***	***	***	***	***
<b>A</b>	42 ± 1.22	31 ± 1.53	27 ± 0.42	7.54 ± 0.13	19.62 ± 1.01	1.28 ± 0.03	2.65 ± 0.28	434 ± 44	24.69 ± 4.12
<b>B</b>	39 ± 1.66	35 ± 0.77	26 ± 1.83	7.81 ± 0.23	20.66 ± 1.80	1.16 ± 0.03	1.91 ± 0.33	369 ± 74	19.71 ± 4.84
<b>C</b>	38 ± 3.85	35 ± 1.80	27 ± 2.44	8.32 ± 0.14	25.90 ± 1.45	1.18 ± 0.07	1.53 ± 0.62	166 ± 57	6.73 ± 3.63
<b>D</b>	35 ± 3.41	32 ± 0.94	33 ± 4.00	7.96 ± 0.14	22.09 ± 1.68	1.10 ± 0.03	1.07 ± 0.18	278 ± 18	15.58 ± 2.65

### 3.3. Nodulation

Parmi les objectifs visés par ces essais, la vérification de la présence des rhizobia dans les sols concernés par l'enquête de nodulation des génotypes testés. En effet, nos essais montrent que des rhizobia sont bien présents dans ces sols et qu'ils nodulent les racines des différents génotypes. Cependant, la nodulation varie largement en fonction des génotypes et des propriétés physico-chimiques des sols. Indépendamment des génotypes, aucune nodosité n'est formée sur les racines du haricot cultivé dans les parcelles du cluster A et B (figure V.6a). Cependant, ce paramètre varie de 18 mg à 8 mg par plante respectivement, chez la lignée tolérante 34 et la lignée sensible 147 cultivées dans les parcelles du cluster C. Dans les parcelles du cluster D où la teneur en N dans le sol est faible, la nodulation des génotypes est significativement plus élevée en comparaison avec celle du cluster C, permettant aux génotypes de compenser partiellement leur besoin en N par la fixation de N<sub>2</sub>. Les génotypes tolérants 115 et 34 enregistrent la biomasse des nodosités la plus élevée (32 mg MSn par plante) alors que les génotypes 147 et 29 enregistrent la biomasse nodulaire la plus faible (23 mg MSn par plante). Enfin, le génotype local Dj cultivé dans les parcelles du cluster D produit la plus grande biomasse nodulaire jusqu'à 37 mg MSn par plante. Ainsi, la nodulation des génotypes cultivés dans les parcelles du cluster D est deux fois plus élevée par rapport à celle des parcelles du cluster C.



**Figure V.6.** Biomasse des nodosités (a) et des parties aériennes (b) de sept géotypes de haricot cultivés dans les parcelles du cluster A (▨), cluster B (▩), cluster C (■) et cluster D (▤). Les données sont les moyennes de dix répétitions récoltées au stade floraison tardive des plantes.

### 3.4. Croissance des plantes

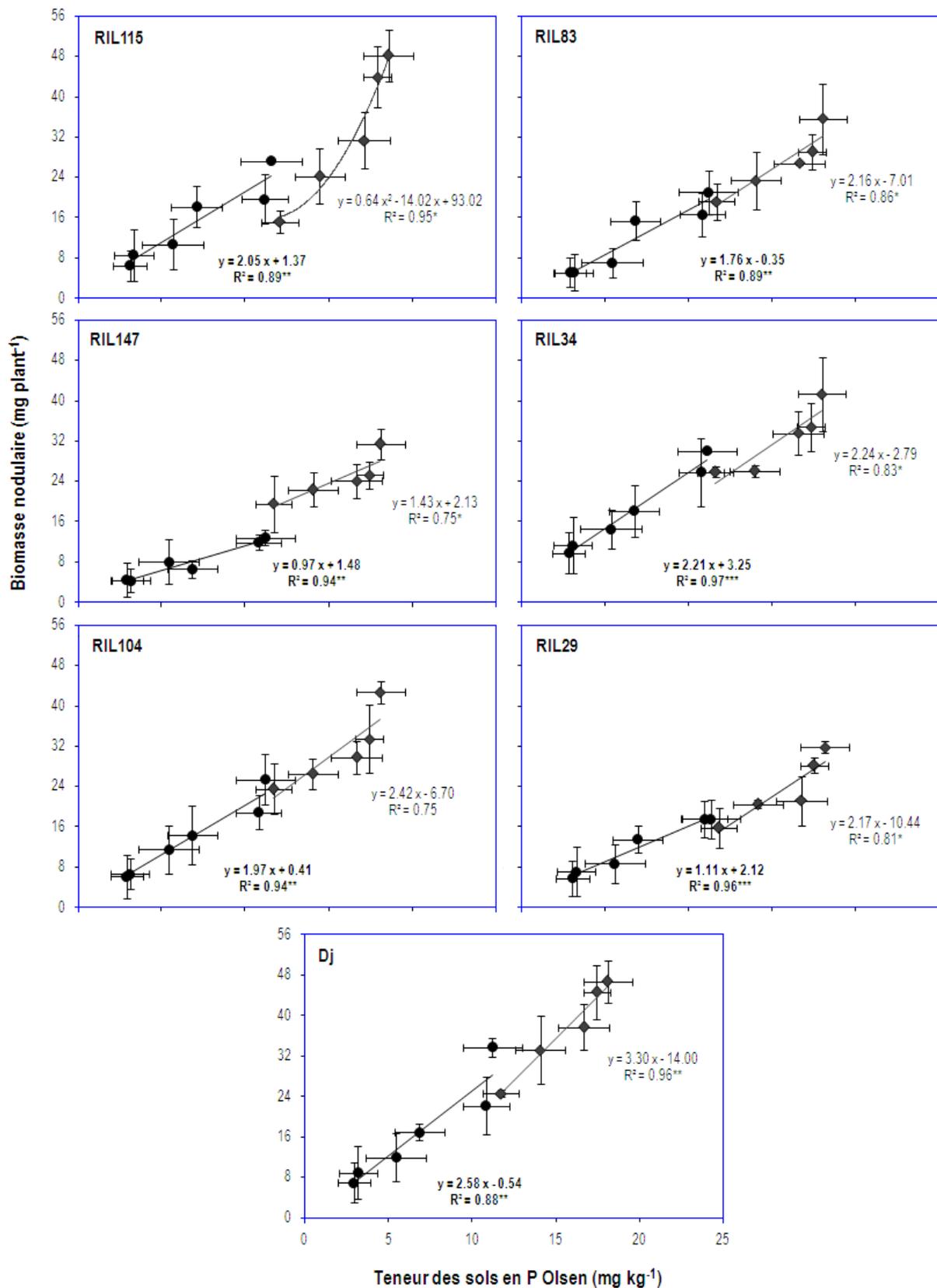
Les données illustrées dans la figure V.6b montrent que les géotypes Dj, 115 et 34 cultivés dans les parcelles du cluster A enregistrent une biomasse aérienne comparable avec une moyenne de 30 g MSa par plante. Cette croissance est significativement inférieure par rapport à celle des géotypes 147, 83 et 29, qui ont obtenu seulement une valeur moyenne de 23 g MSa par plante. Pour les parcelles du cluster B, des différences significatives de biomasses aériennes sont observées entre les différents géotypes testés, avec la plus importante biomasse notée chez les géotypes Dj et 34 (31 g MSa par plant). Dans les parcelles du cluster C, les résultats sont en

partie similaires à ceux enregistrés dans les parcelles du cluster B. Les génotypes qui ont montré une biomasse importante sont 115, 34 et Dj avec une valeur moyenne de 24 g MSa par plante. Cependant, les biomasses les plus faibles sont enregistrées cette fois ci chez les génotypes 147 et 83 avec une valeur moyenne de 17 g MSa par plante. Enfin, la biomasse des plantes dans les parcelles du cluster D est comparable pour les génotypes DJ et 34 (25 g MSa par plante) tandis que pour les autres génotypes elle varie entre 19 et 24 g MSa par plante. En générale, les génotypes cultivés dans les parcelles des clusters A et B présentent une biomasse plus élevée par rapport à ceux cultivés dans les parcelles des clusters C et D qui dépendent de la fixation de N<sub>2</sub>.

### **3.5. Corrélation entre la biodisponibilité du P dans le sol et la nodulation des plantes**

Les valeurs moyennes de la biomasse des nodosités sont représentées en fonction de la concentration en P Olsen dans les sols des clusters C et D. L'analyse des régressions linéaires illustrées dans la figure V.7 révèle une corrélation significative entre la concentration en P Olsen du sol et la nodulation de l'ensemble des génotypes. Dans les parcelles du cluster C, la corrélation entre la biomasse des nodosités et la concentration en P Olsen du sol varie selon les génotypes. En effet, les valeurs moyennes de la nodulation des génotypes 104, 29 et 147 ont une relation linéaire avec la concentration en P Olsen du sol jusqu' à une valeur de 11 mg P par kg de sol. Pour chaque augmentation de 1 mg P par kg de sol la biomasse nodulaire de ces génotypes augmente de 9, 11 et 9 mg MSn par plante. Pour chaque augmentation de 1 mg P par kg de sol, la biomasse nodulaire des génotypes 34, 115 et 83 augmente de 22, 21 et 17 mg MSn par plante. Alors que la biomasse nodulaire produite par le génotype local Dj qui est de 26 mg MSn par plante pour chaque augmentation de 1 mg P par kg de sol.

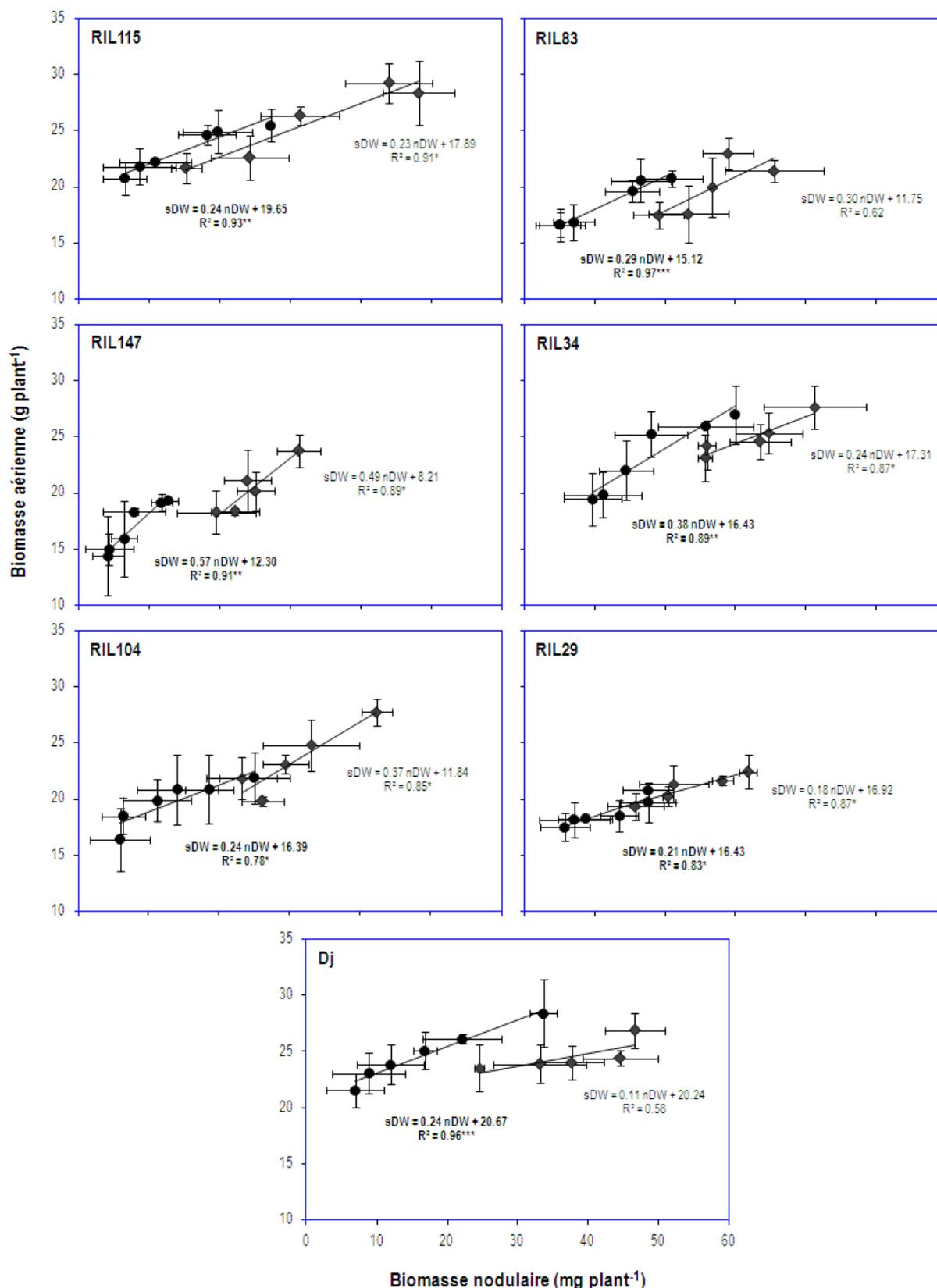
Similairement aux parcelles du cluster C, une corrélation positive est établie entre la concentration en P Olsen dans le sol et la nodulation de l'ensemble des génotypes. Cette corrélation est plus importante pour les génotypes Dj et 115 et légèrement faible pour les génotypes sensibles 147 et 29. Mais, de l'ensemble des génotypes testés, seul le génotype 104 montre une corrélation statistiquement insignifiante ( $R^2 = 0.75$ ).



**Figure V.7.** Relation entre la teneur des sols en P Olsen et la nodulation de sept géotypes de haricot cultivés dans les parcelles du cluster C (●) et cluster D (◆). Les données sont les moyennes de dix répétitions récoltées au stade floraison tardive des plantes.

### **3.6. L'efficience d'utilisation de la symbiose rhizobienne**

Afin d'analyser plus précisément les relations entre la nodulation et la croissance des génotypes cultivés dans les parcelles des clusters C et D, les coefficients de corrélation entre ces paramètres sont calculés pour chaque génotype avec la pente de régression pour une estimation de l'efficience de l'utilisation de la symbiose rhizobiums (EURS). L'analyse des résultats en termes d'EUSR montre une variation significative qui semble dépendre à la fois des génotypes et les parcelles où ils sont cultivés (figure V.8). En effet, dans les parcelles du cluster D, l'EUSR varie entre 110 et 490 mg MSa pour chaque mg MSn respectivement pour les génotypes Dj et 147. Elle augmente significativement chez tous les génotypes cultivés dans les parcelles du cluster C caractérisé par une déficience en P. Cette augmentation est significativement plus importante chez les génotypes Dj (54%) et 34 (37%) en comparaison avec les génotypes 115 (4%), 147 (14%) et 29 (12%). En revanche, l'EUSR des génotypes 83 et 104 est respectivement 3% et 54% plus élevé dans les parcelles du cluster D que du cluster C. Compte tenu de l'ensemble des génotypes testés, il s'avère qu'en moyenne, l'EUSR est plus élevée dans les parcelles du cluster C déficientes en P (310 mg MSa pour chaque mg MSn) par rapport à celles du cluster D suffisantes en P (274 mg MSa pour chaque mg MSn).



**Figure 5.8.** L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne de sept géotypes de haricot cultivés dans les parcelles du cluster C (●) et cluster D (◆). Les données sont les moyennes de dix répétitions récoltées au stade floraison tardive des plantes.

## **4. Discussion**

Cette étude visait à analyser la variabilité génotypique associée à la nodulation, la croissance et l'efficacité rhizobienne d'utilisation du P pour la FSN en tests multilocaux au sein de l'agro-écosystème de Sétif (figure V.2). Elle ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension de la physiologie des légumineuses pour l'adaptation aux sols peu fertiles. Nos résultats ont montré que la nodulation et la croissance des génotypes de haricot étaient significativement différentes en fonction des caractéristiques physico-chimiques des sols (figure V.6). En effet, l'absence de nodulation dans les parcelles des clusters A et B (figure V.6a) est vraisemblablement due à la forte teneur en azote résiduel du précédent cultural. Cette conclusion est confrontée par les observations dans les parcelles du cluster D où une nodulation plus abondante est associée à un moindre teneur en azote. Ceci n'exclut pas l'intervention éventuelle d'autres facteurs limitants la nodulation. Mais cette grande différence de nodulation entre parcelles, peut aussi être due à une forte variabilité spatiale de la distribution locale des rhizobia du haricot. Cette variabilité pourrait être aussi en rapport avec la répartition des cultures précédentes du haricot dans la région de Sétif. En outre, la nodulation plus importante en 2011 qu'en 2012 atteste d'une variation temporelle de nodulation des génotypes de haricot. La fixation de  $N_2$  par le haricot est sous l'influence de nombreux facteurs liés aux conditions de fertilité du sol (Drevon et al., 2011), au génotype cultivé (Bargaz et al., 2012 ; Rodino et al., 2012) et aux pratiques culturales. Les quantités et les formes de fertilisants apportés ainsi que des propriétés chimiques des sols sont les premiers facteurs explicatifs de la quantité de  $N_2$  fixée dans les champs du haricot. En outre, il est bien connu que la forte concentration en azote dans le sol inhibe la formation de nodosités et le processus de fixation de  $N_2$  (Jensen, 1996; Gentili and Huss-Danell, 2003; Xiao et al., 2004; Gentili et al., 2006). Les apports d'azote sous forme de fertilisants en début de culture sont souvent nécessaires pour permettre un rendement adéquat des légumineuses mais les apports excédent la dose starter ont généralement un effet inhibiteur sur la fixation de  $N_2$  (Zahran, 1999). Salvagiotti et al. (2008) ont mis en évidence une réduction de la FSN en fonction des doses d'azote apportées, surtout par l'engrais minéral. Les nitrates ont un effet inhibiteur plus important sur la FSN comparativement à l'ammonium. Il a été vérifié dans plusieurs travaux que la présence d'ions nitrate inhibe l'infection racinaire (Abdel-Wahab et al., 1996), le développement nodulaire (Imsande, 1986) et l'activité nitrogénase (Purcell et al., 1990 ; Sanginga et al., 1996 ; Arrese-igor et al., 1997). L'accumulation de l'azote dans les plantes dépend essentiellement de la teneur des sols en cet élément car plusieurs travaux ont montré que l'accumulation de l'azote est plus élevée chez les plantes de haricot qui dépendent du nitrate que chez celles dépendant de la

FSN. En plus, le haricot est considéré comme un fixateur d'azote médiocre, notamment par rapport au soja (Pereira et Bliss, 1987 ; Isoi et Yoshida, 1991). Ce constat est souvent abordé comme une fatalité incontournable pour le haricot, même si des travaux ont été effectués pour améliorer ce potentiel (Hardarson, 1993). Les fluctuations de biomasse observées chez les plantes des différents génotypes peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que la variabilité génétique des cultivars utilisés. Ainsi selon cette expérimentation, les génotypes 115, 104, 34 et Dj ont pu produire un rendement en biomasse plus important par rapport aux autres. La capacité d'assimilation des éléments minéraux pourrait être un autre facteur fluctuant le rendement du haricot et pourrait varier d'un génotype à l'autre. En effet, dans ce contexte et à titre d'exemple, Beebe et al. (1997) ont signalé l'existence d'une variation génétique pour l'efficacité d'utilisation du P chez le haricot, qu'ils ont attribué à l'origine géographique des cultivars utilisés. Certaines caractéristiques physico-chimiques des sols pourraient être aussi à l'origine de cette variation de réponse des génotypes.

Les interventions dans le champ qui tendent à améliorer la disponibilité de l'azote pour les plantes semblent entraîner une réduction de la fixation de N<sub>2</sub>. Ainsi la monoculture de légumineuses dans les champs semble avoir un effet dépressif sur la FSN, surtout sur les quantités de N<sub>2</sub> fixées. Cela montre encore la nécessité de vraies rotations dans les systèmes de culture. En supposant qu'une légumineuse précédente aurait fixé suffisamment de N<sub>2</sub> dans un champ, elle permettrait d'améliorer les teneurs en azote du sol et cela entraînerait une diminution de la fixation de N<sub>2</sub> dans le champ de légumineuse suivante. De plus, la monoculture peut avoir pour conséquences une prolifération des ravageurs dans le champ, et contribuer à une baisse des rendements et des quantités de N<sub>2</sub> fixées. Par contre une rotation céréale-haricot sur la parcelle permet une meilleure optimisation de la FSN chez le haricot.

Dans ce travail, la faible nodulation et croissance des génotypes du haricot cultivés dans les placettes du cluster C (Figure V.6a) était, probablement, la conséquence de la faible concentration de leur sol en P Olsen (tableau 3). En effet, la déficience des sols en P peut avoir deux causes, la première est la faible teneur en P total de certains sols pauvres en matière organique ou très lessivés, la deuxième peut être la complexation du P avec les cations Ca, Al ou Fe, sous forme d'oxydes ou hydroxydes insolubles indisponibles pour les plantes, comme dans des sols acides riches en Al et en Fe libres (Giroux, 2002). La déficience des sols en P diminue le nombre de nodosités par plante (Singleton et al., 1985 ; Mullen et al., 1988) et/ou la masse individuelle (Israel, 1987 ; Gunawardena et al., 1992), ainsi que la masse des bactéroïdes (Sa et Israel, 1991). Une moindre survie des rhizobia en sols déficients en P pourrait diminuer la probabilité d'infection (Leung et

Bottomley, 1987 ; Almendras et Bottomley, 1987), et donc justifier la sélection de souches tolérantes à la déficience en P en culture libre (Cassman et al., 1981, Graham, 1992). Or, le conditionnement des rhizobia en milieu déficient en P entraîne un retard à l'infection sans qu'il y ait des différences ultérieures pour le nombre de nodosités sur la racine primaire ou pour la masse des nodosités par plante (Mullen et al., 1988). La disponibilité en P du milieu de croissance de la plante serait un facteur déterminant de la biomasse nodulaire finale. La disponibilité du P dans le sol et surtout sa mobilisation par la plante ont un effet direct sur leur capacité à fixer le N<sub>2</sub> (Barea et al., 1983). Robson et al. (1981) ont suggéré que la déficience en P limiterait la fixation de N<sub>2</sub> indirectement, via la croissance de la plante hôte. Nos résultats sont en accord avec ceux de Cassman et al. (1980) qui rapportent que la déficience en P augmente la proportion de biomasse racinaire au détriment de la biomasse aérienne, et la présence de nodosités fonctionnelles modifie peu cette répartition de la biomasse en début de stade végétatif chez le soja. Ultérieurement, la croissance racinaire se maintient ou augmente chez la légumineuse nodulée tandis que la croissance des nodosités est davantage ralentie que celle de la partie aérienne (Israel, 1987 ; Ribet et Drevon, 1995b). En se référant aux fortes teneurs des différentes parcelles en P, nos constatations suggèrent que la disponibilité de cet élément dans le sol serait probablement liée à d'autres facteurs. En effet, l'humidité, le pH du sol et la taille des particules constituant le sol, pourront avoir un effet sur la mise en disponibilité des éléments minéraux en général (Johnson, 2000). Cet auteur estime que l'augmentation de la teneur en argile diminue le coefficient de diffusion du P à cause de l'augmentation des sites d'adsorption à la surface des particules et du pouvoir tampon. En outre, l'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobia et engendre par conséquent une diminution de la nodulation. Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour les rhizobia que pour la plante hôte (Bordeleau et Prevost, 1994).

Cette étude a permis de mettre en évidence des interactions significatives reliant le contenu du sol en P-Olsen et la nodulation des différents génotypes étudiés (figure V.7). Ainsi, il est bien établi que la biomasse nodulaire est fortement corrélée à la disponibilité en P de la plante, elle est énormément réduite sous sa déficience (Gunawardena et al., 1992). Dans une expérimentation sur différentes légumineuses (fèves, pois chiche et haricot), Drevon et Sifi (2000) ont trouvé que l'augmentation des apports de P augmente le nombre et la biomasse des nodosités parallèlement à l'amélioration des biomasses de la partie aérienne. Il suggère que le P améliore la fixation de

N<sub>2</sub> par l'amélioration de la biomasse de la plante. Dans un sol, les rhizobia et les plantes hôtes disposent des éléments nutritifs qui leur sont nécessaires pour initier et entretenir l'activité symbiotique conduisant à la fixation de N<sub>2</sub>. Les corrélations significatives des sept géotypes cultivés dans les placettes des clusters C et D montrent que les biomasses aériennes sont corrélées avec les biomasses nodulaires (figure V.8) ce qui signifie que ces géotypes ont eu recours à la FSN pour satisfaire leurs besoins en azote, contrairement aux mêmes géotypes qui ont été cultivés dans les placettes A et B par le fait de leur nutrition en azote minéral du sol. Cependant, les géotypes 115, 104 et 34 ayant des biomasses de nodosités et des parties aériennes plus importantes sont capables de fixer mieux l'azote que les géotypes 147, 83 et 29. Mais il ne suffit pas que les souches de rhizobia provoquent la formation de nodosités, encore faut-il qu'elles soient efficaces et qu'elles fixent réellement l'azote atmosphérique. L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne était remarquablement élevée chez les géotypes cultivés dans les placettes du cluster C par rapport à ceux cultivés dans les placettes du cluster D.

## **5. Conclusion**

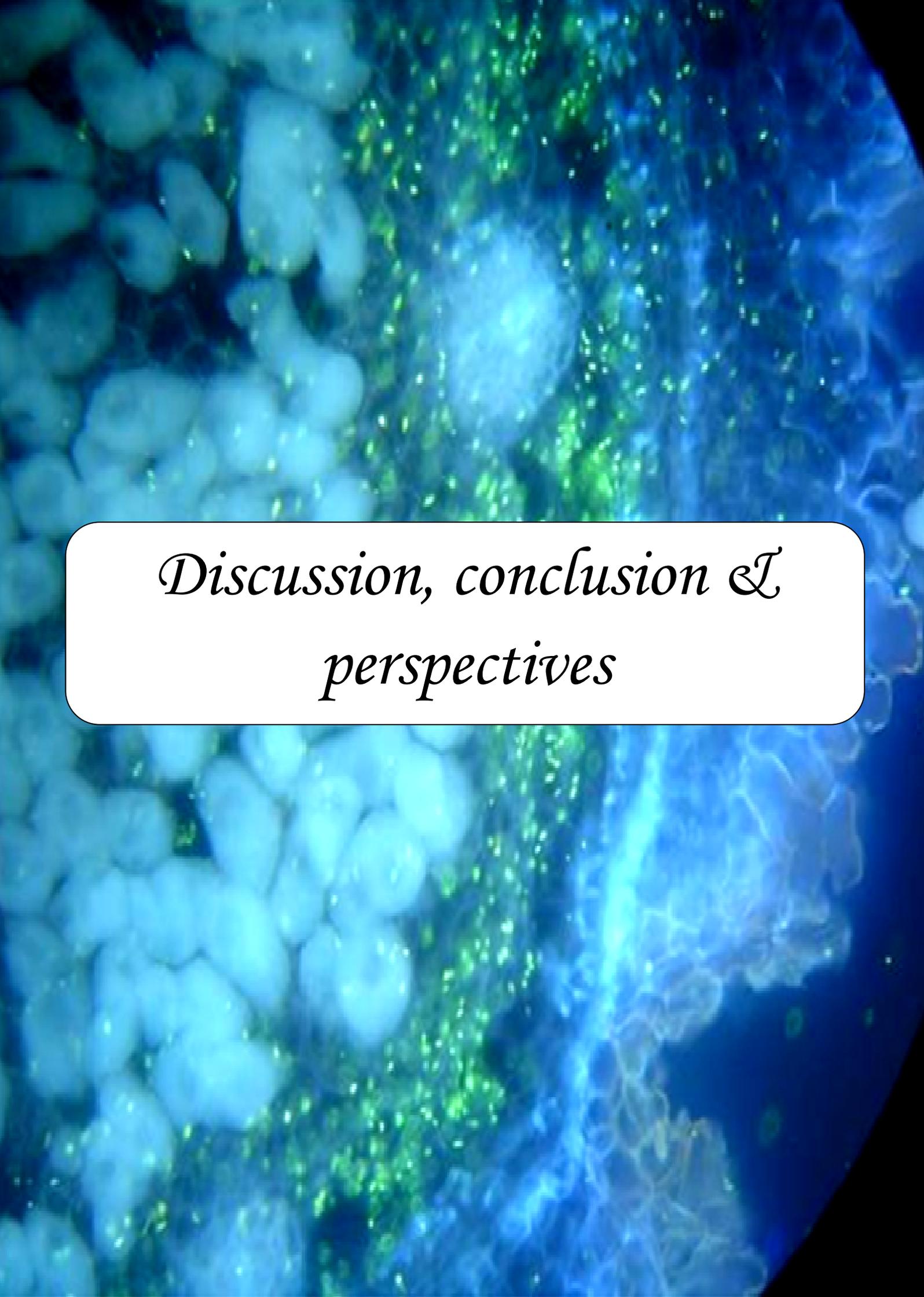
Nous concluons que des différences dans la biomasse, la nodulation et l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne existent entre les différents géotypes de haricot testés. Ces géotypes ont montré différents niveaux d'adaptation aux conditions environnementales de la région de Sétif en particulier la faible disponibilité des sols en P. La FSN chez le haricot est ainsi sous l'influence de plusieurs facteurs. La nodulation des géotypes testés est inversement liée à la teneur en azote total du sol. Plus il y a d'azote dans le sol pour la plante, moins elle dépend de l'azote atmosphérique pour sa nutrition azotée. La croissance des plantes quant à elle est beaucoup plus influencée par la fertilité, notamment la teneur en P disponible du sol. Plus il y a de P apporté mais surtout disponible aux plantes moins la production de biomasse et les quantités d'azote fixées par les plantes sont limitées. L'identification d'autres géotypes à forte EUP pour la FSN notamment dans le cas d'une déficience en P pourrait être une alternative durable dans les systèmes paysans à faible apport d'intrant. La sélection de géotypes de haricot susceptibles d'être nodulés avec des rhizobia indigènes est une pratique récente, bien que la distribution et la culture de ces géotypes par les agriculteurs n'a pas été généralisée.

## Plant and Soil

### Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in multi-local field tests under Mediterranean climate

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of common bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) in multi-local field tests under Mediterranean climate
<b>Article Type:</b>	Manuscript
<b>Keywords:</b>	common bean, nitrogen, nodulation, phosphorus, soil fertility, symbiosis
<b>Corresponding Author:</b>	Mohamed Lazali Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro. Place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France Montpellier, FRANCE
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro. Place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Mohamed Lazali
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Mohamed Lazali Samira Brahimi Chahinez Benadis Rym Tinhinen Maougal Didier Blavet Jean-Jacques Drevon Sidi Mohamed Ounane
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Aims</b> Common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) has the capacity to fix atmospheric N<sub>2</sub> into the biosphere through its aptitude to establish a symbiosis with soil rhizobia. We aimed to examine the effect of the environmental constrains that might limit this symbiosis.</p> <p><b>Methods</b> A nodular diagnosis was performed in eighteen field sites chosen with farmers of the Setif agroecosystem, with common bean as a model grain-legume using six recombinant inbred lines (RILs) and one local genotype. At flowering stage, the biomass of plants and nodules was determined by excavating 20 cm in depth and around the root-system of ten plants per genotype and per site.</p> <p><b>Resultas</b> The results indicate a large spatial variation in nodulation and growth between genotypes. Among, four soil clusters, based on physical and chemical properties of the eighteen sites, the inhibition of nodulation of all genotypes in soil of clusters A and B was associated with high residual soil mineral nitrogen. The low nodulation of all genotypes in the P-deficient soil of cluster C was partly compensated by increasing their efficiency in use of the rhizobial symbiosis. Interestingly, significant correlations were found between nodulation of all genotypes and Olsen-P concentration in soils of clusters C and D.</p> <p><b>Conclusions</b> It is concluded that the RILs selected for their efficient use of P for symbiotic nitrogen fixation show the highest nodulation and growth and that the nodular diagnosis can be used to assess the adaptation of N<sub>2</sub>-dependent grain-legume to low soil availabilities of N and P.</p>



*Discussion, conclusion &  
perspectives*

## **1. Discussion générale**

La caractérisation physiologique des lignées de haricot cultivées en hydroaéroponie et aux champs des agriculteurs est réalisée à l'aide de mesures physiologiques (perméabilité nodulaire et biodisponibilité du P) et biochimiques (analyse des phosphatases et phytases) sous des régimes suffisants et déficients en P. Ces données sont suivies par des observations de la localisation de deux gènes de phosphatases et phytases sur des coupes micrométriques de nodosités et graines en germination. A travers ces approches complémentaires, nous avons pu répondre à l'objectif principal de cette thèse qui consistait en une compréhension plus approfondie de la physiologie de la nutrition et de la croissance de la symbiose rhizobienne du haricot sous déficience en P.

A la lumière des résultats obtenus sous conditions de culture contrôlée, les symbioses haricot-rhizobia testées ont montré des variations importantes sous déficience en P. La réponse la plus fréquente est la réduction de la biomasse nodulaire et aérienne des plantes. En outre, l'activité phytase dans les nodosités est fortement stimulée chez les lignées tolérantes par rapport aux lignées sensibles. Egalement, les nodosités des lignées cultivées sous déficience en P ont accumulé des teneurs importantes en P inorganique (Pi). Ces résultats montrant l'exigence des nodosités des lignées tolérantes en Pi, suggèrent que cet élément pourrait exercer un rôle spécifique dans le développement et le fonctionnement nodulaire. Une situation comparable a été analysée chez d'autres génotypes de haricot où la variabilité génotypique était plus importante vis-à-vis aux exigences en Pi qu'envers la teneur des plantes en azote (Vadez et al., 1999). Bien que la déficience en P agisse peu sur la teneur nodulaire en P, en raison d'une grande proportion de P structural dans les nodosités, elle pourrait cependant affecter fortement la fraction du P impliquée dans le métabolisme. Des déséquilibres dans la répartition du P entre les différents compartiments de la nodosité, notamment entre cellules non infectées et cellules infectées, et entre bactéroïdes, mitochondries et cytosol dans ces cellules pourraient entraîner des dysfonctionnements importants de l'activité nodulaire (Sa et Israel, 1991).

A la lumière de ces résultats confortant l'importance de Pi dans le métabolisme nodulaire pour la FSN, il est intéressant d'approfondir la relation entre l'activité phytase responsable de la libération de Pi et la perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub> hypothétiquement décrite en étant un facteur déterminant dans la régulation de la FSN (Hunt et Layzell, 1993; Schulze et Drevon, 2005). En effet, dans le chapitre II, nous avons démontré que l'induction de la phytase dans les nodosités

de lignées cultivées sous déficience en P est significativement corrélée à l'augmentation à leur perméabilité nodulaire à l'O<sub>2</sub>. Ce qui laisse penser que l'activité phytase induite par les nodosités déficientes en P est impliquée dans l'ajustement de l'O<sub>2</sub> et par conséquent dans la régulation de la quantité de N<sub>2</sub> fixée. De ce fait, nous suggérons que les nodosités constituent un site actif qui semble jouer non seulement un rôle déterminant dans la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> (FSN) mais aussi servant en tant qu'organe de tolérance agissant en premier lieu lors d'une contrainte nutritionnelle y compris la limitation en P. Ainsi, les nodosités agissent en ajustant la perméabilité nodulaire et par conséquent le flux d'O<sub>2</sub> à l'intérieur de la nodosité qui serait hautement régulé par des changements osmo-tactiles des cellules du cortex nodulaire (Schulze et Drevon, 2005). Cette constatation est en cohérence avec les travaux de Bargaz et al., (2013c) démontrant que l'augmentation de la respiration nodulaire est associée à une surexpression de la phosphoenol pyruvate phosphatase et de la tréhalose 6-P phosphatase dans le parenchyme nodulaire. Outre l'hypothèse expliquant que la conductance nodulaire à la diffusion de l'O<sub>2</sub> est osmo-réglée au niveau des cellules corticales, il nous semble cohérent, en se basant sur les travaux de Serraj et al. (1995), de suggérer l'existence d'une relation étroite entre la stimulation de l'activité phytase et la respiration nodulaire sous déficience en P.

L'existence de cette relation est en accord avec la forte expression du transcrite de phytase (ADNc) que nous avons observée au niveau du cortex nodulaire (chapitre III). En outre, le niveau élevé du transcrite de phytase détecté dans le cortex nodulaire (précisément, le cortex interne) pourrait justifier qu'au niveau de ce compartiment, une co-régulation i.e. physiologique (perméabilité nodulaire) et biochimique (induction de la phytase) aurait lieu pour optimiser la FSN. Cependant, la forte expression obtenue sous déficit en P est d'autant plus élevée chez la lignée tolérante (RIL115) que celle sensible (RIL147) et que la localisation nodulaire de ce gène a variée d'un compartiment à l'autre et particulièrement dans le cortex interne qu'externe où une haute expression est décelée. De telles stimulations auraient préservé l'intégrité du cortex nodulaire et le processus de la FSN en contrôlant la conductance nodulaire à la diffusion de l'O<sub>2</sub> sous déficience en P.

Parallèlement aux données sur la localisation in situ du transcrite phytase, des résultats portant sur le fructose 1,6 bisphosphate phosphatase (FBPase) ont permis de conclure que la déficience en P stimule aussi bien l'activité enzymatique que l'expression in situ du transcrite correspondant (chapitre IV). En effet, cette phosphatase s'est montrée impliquée dans l'efficacité d'utilisation du P (EUP) pour la FSN. Les différences d'EUP pour la FSN que nous avons mises en évidence entre les lignées testées permettent d'envisager une sélection basée sur l'efficacité d'utilisation

des éléments minéraux dans l'agriculture. Une sélection pour l'EUP pour la FSN serait importante en termes de ressource en P du sol puisque l'EUP consiste à fixer davantage de  $N_2$  par unité de P allouée, donc permettant une meilleure gestion des éléments minéraux. Ainsi, des cultures possédant une forte EUP pour la FSN exerceraient une moindre pression sur des agro-écosystèmes de moindre fertilité.

Les expérimentations aux champs des agriculteurs de la région du Sétif où la limitation en P fait partie des contraintes affectant les rendements, ont abouti à des résultats concluants (chapitre V). Nous avons d'abord pu classer les différentes parcelles prospectées en quatre clusters en fonction des propriétés physico-chimiques de leurs sols. En effet, les valeurs élevées de l'azote total dans sols des clusters A et B ont inhibé la nodulation. Nous avons aussi démontré que la biomasse aérienne sous fixation de  $N_2$  est proche de celle obtenue sous nutrition exclusive de l'azote minéral. Ainsi, des différences dans la biomasse, la nodulation et l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne sont mises en évidence entre les différents génotypes de haricot testés. Toutefois, une biomasse racinaire importante serait associée à une nodulation aussi bien importante qu'exploratrice d'une surface tellurique maximale. Ceci dépendrait également du degré de réussite et d'efficacité de l'interaction entre les souches de rhizobia natives et l'aptitude des racines à se mettre en symbiose, qui par la suite, donne naissance à des nodosités aussi bien nombreuses que fonctionnelles. Elles sont le lieu où la FSN s'achève permettant à la plante de pourvoir à ses besoins en azote atmosphérique. Bien que la biomasse et la nodulation soient sévèrement réduites dans les parcelles du cluster C pauvre en P, des différences marquantes dans l'allocation en P se sont avérées dépendantes des génotypes testés. Cette constatation justifie, en partie, les résultats obtenus sous conditions contrôlées. La FSN est sensible à la déficience en P et nécessite plus de  $P_i$  par rapport aux plantes dont la croissance dépend de la nutrition azotée minérale (Serraj et al., 2004). De cette constatation, il est impératif que les légumineuses nodulées se procurent du P, qui pour une meilleure croissance sous FSN, devait être directement biodisponible. Dans une analyse spécifique des parcelles à forte nodulation (clusters C et D) nous avons pu démontrer que la nodulation est significativement corrélée à la biodisponibilité du P assimilable dans le sol.

Se référant à l'ensemble des résultats obtenus aux champs des agriculteurs, il s'avère que les symbioses de haricot testées ont montré des niveaux différents dans leur adaptation aux conditions environnementales de la région du Sétif et plus particulièrement la faible disponibilité de leur sol en P. En effet, les génotypes Djadida, 115, 104 et 34 pourraient être classés comme

génotypes P-efficients tandis que les génotypes 147, 83 et 29 sont classés comme génotypes sensibles en tenant compte de leurs réponses vis-à-vis la déficience en P particulièrement exprimées dans les parcelles déficientes en P.

## **2. Conclusion**

Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus, nous concluons que la fixation de  $N_2$  est un processus sensible à la déficience en P mais influencée également par la nodulation, la respiration nodulaire et l'allocation en P particulièrement nodulaire. Les teneurs élevées de la symbiose haricot-rhizobia en P semble être impliquées dans sa tolérance au déficit en P. Une forte teneur nodulaire en P augmente la conductance nodulaire à la diffusion de l' $O_2$  et par conséquent intervient dans la régulation de la FSN. L'importante capacité de puits pour le P des nodosités de plantes tolérantes suggère l'existence de transporteurs membranaires végétaux très affines pour le P, qui permettraient ainsi de séquestrer le P, favorisant le meilleur développement nodulaire.

L'ensemble des données obtenus de la nodulation, la fixation de  $N_2$ , la conductance nodulaire à la diffusion de l' $O_2$  et l'allocation en P, semblent être des paramètres inter-reliés réagissant ensemble pour assurer une FSN optimale. Ce qui permet de suggérer que la FSN est un processus multi-régulé notamment au niveau du cortex nodulaire. Outre le rôle spécifique du cortex nodulaire précédemment discuté en termes d'ajustement des échanges gazeux, nous suggérons que ces échanges sont également en étroite relation avec l'activité phytase nodulaire qui semble être hautement activé au niveau du cortex interne nodulaire.

En général, face à la déficience en P, les lignées tolérantes sont les plus efficaces par rapport aux autres génotypes. L'utilisation des génotypes P-efficients et des souches de rhizobia ayant une efficacité optimale de croissance et de rendement sous sols peu fertiles y compris, déficients en P, contribuerait à l'amélioration de la nutrition phosphatée des légumineuses nodulées. Les génotypes les plus efficaces ont, en plus de leur biomasse importante, les meilleures efficacités d'utilisation de la symbiose rhizobienne.

En outre, bien que les activités phosphatases nodulaire aient été stimulées sous déficience en P contribuant à la libération du  $P_i$  à partir des formes organiques, ces enzymes demeurent une perspective intéressante à approfondir aussi bien dans les nodosités que dans les racines et le sol rhizosphérique. L'augmentation des activités phosphatase et phytase nodulaire pourrait constituer un mécanisme adaptatif pour la tolérance des légumineuses fixatrices de  $N_2$  non

seulement vis-à-vis au déficit en P mais aussi vis-à-vis de la salinité si l'on considère la spécificité des phosphatases tel que le cas de la FBPase.

Le développement de l'agriculture, de même que son orientation vers la durabilité des systèmes de production, continuera d'assigner un rôle fondamental aux légumineuses, notamment avec l'expansion progressive des cultures sur des sols peu fertiles. L'utilisation effective de ces espèces dans les systèmes de production actuels, dépendra principalement de l'attention qui sera accordée à leur symbiose avec les bactéries du sol sous diverses contraintes environnementales.

### **3. Perspectives**

Les différences d'EUP pour la FSN qui sont mises en évidence entre les génotypes de haricot étudiés semblent être multi-régulées. La respiration du sol, principalement, la respiration nodulaire est considérée comme étant parmi les facteurs déterminants de la FSN. Ainsi, à la lumière des travaux précédents portant sur les phosphatases et l'acidification de la rhizosphère, il est fortement souhaitable d'élucider les mécanismes associés à l'adaptation de haricot au déficit en P en combinant des études portant sur les échanges minéraux et gazeux entre les nodosités et la rhizosphère. Dans cette perspective, il reste encore fortement souhaitable de mieux comprendre les interactions entre les nodosités fixatrices de N<sub>2</sub> et leur environnement rhizosphérique se trouvant souvent sous contraintes particulièrement osmotiques et nutritionnelles telle que la faible disponibilité en eau et en éléments minéraux y compris le P. Au niveau moléculaire, la recherche d'autres gènes candidats impliqués dans l'adaptation de cette symbiose à la déficience en P est l'une des perspectives les plus importantes comme complément du présent travail.

L'utilisation de symbioses performantes sous conditions de P limitant doit être pleinement exploitée par une évaluation plus large d'associations symbiotiques cultivar-rhizobia. Ceci permettrait de proposer un système de production durable aux producteurs de haricot, qui serait d'une incidence économique, agronomique et environnementale considérable. La FSN a un rôle central à jouer dans une agriculture qui se veut productive et durable. Les impacts positifs sur la production agricole se feront à travers la maîtrise de l'effet des contraintes environnementales sur la FSN, par une utilisation judicieuse de faibles quantités de fertilisants (notamment le P) et l'exploitation de la très large variabilité disponible pour la sélection des souches de rhizobia et des génotypes hôtes présentant de bonnes aptitudes agronomiques. Les génotypes des plantes et des bactéries à utiliser, de même que les systèmes de culture doivent être adaptés aux conditions locales pour exprimer pleinement leur efficacité.



*Références bibliographiques*

---

## Références bibliographiques

---

1. Abdel-Wahab AM, Zahran HH, Abd-Alla MH. 1996. Root-hair infection and nodulation of four grain legumes as affected by the form and the application time of nitrogen fertilizer. *Folia Microbiologica* 41, 303-308.
2. Adu-Gyamfi JJ, Fujita K, Ogata S. 1989. Phosphorus absorption and utilization efficiency of pigeon pea (*Cajanus Cajan* (L.) Millsp) in relation to dry matter production and dinitrogen fixation. *Plant and Soil* 119, 315-324.
3. AFNOR. 1969. Dosage spectrophotométrique de l'anhydride phosphorique: méthode vanadomolybdique. AFNOR, Paris, pp 224-246.
4. Akthar MS, Oki Y, Adachi T. 2008. Genetic variation in phosphorus acquisition and utilization efficiency from sparingly soluble P-sources by *Brassica* cultivars under P-stress environment. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194, 380-392.
5. Alkama N, Bi Bolou EB, Vailhe H, Roger L, Ounane SM, Drevon JJ. 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, 1814-1823.
6. Almeida JPF, Hartwig UA, Frehner M, Nösberger J, Lüscher A. 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* 51, 1289-1297.
7. Almendras AS, Bottomley PJ. 1987. Influence of lime and phosphate on nodulation of soil grown *Trifolium subterraneum* L. by indigenous *Rhizobium trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2090-2097.
8. Al-Niemi TS, Kahn ML, Mc Dermott TR. 1997. P metabolism in the bean *Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiology* 113, 1233-1242.
9. Amarger N, Mecheret V, Laguerre G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 996-1006.
10. Anne P. 1945. Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. *Annals of Agronomy* 2, 161-172.
11. Anuradha M, Narayanan A. 1991. Promotion of root elongation by phosphorus deficiency. *Plant and Soil* 136, 273-275.

12. Araujo AP, Plassard C, Drevon JJ. 2008. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant and Soil* 312, 129-138.
13. Arrese-igor C, Minchin FR, Gordon AJ, Nath AK. 1997. Possible cause of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in response to nitrate. *Journal of Experimental Botany* 48, 905-913.
14. Bakker MR, Jolicoeur E, Trichet P, Augusto L, Plassard C, Guinberteau J, Loustau D. 2009. Adaptation of fine roots to annual fertilization and irrigation in a 13-year-old *Pinus pinaster* stand. *Tree Physiology* 29, 229-238.
15. Baldwin JC, Karthikeyan AS, Raghothama KG. 2001. LEPS<sub>2</sub>, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiology* 125, 728-737.
16. Barea JM, Azcon-Aguilar C. 1983. Mycorrhiza and their significance in nodulating nitrogen fixing plants, *Advances in Agronomy* 36, 1-54.
17. Bargaz A, Ghoulam C, Faghire M, Aslan Attar H, Drevon JJ. 2011. The nodule conductance to the O<sub>2</sub> diffusion increases with high phosphorus content in the *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis. *Symbiosis* 53, 157-164.
18. Bargaz A, Faghire M, Abdi N, Farissi M, Sifi B, Drevon JJ, Cherkaoui-Ikbal M, Ghoulam C. 2012. Low soil phosphorus availability increases acid phosphatases activities and affects p partitioning in nodules, seeds and rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *Agriculture* 2, 139-153.
19. Bargaz A, Lazali M, Amenc M, Abadie J, Ghoulam C, Farissi M, Faghire M, Drevon JJ. 2013a. Differential expression of trehalose 6-P phosphatase and ascorbate peroxidase transcripts in nodule cortex of *Phaseolus vulgaris* and regulation of nodule O<sub>2</sub> permeability. *Planta* 238, 107-119.
20. Bargaz A, Faghire M, Abdi N, Farissi M, Sifi B, Drevon JJ, Cherkaoui Ikbal M, Ghoulam C. 2013b. Low soil phosphorus availability increases acid phosphatases activities and affects P partitioning in nodules, seeds and rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *Agriculture* 2, 139-153.
21. Bargaz A, Ghoulam C, Drevon JJ. 2013c. Specific expression and activity of acid phosphatases in common bean nodules. *Plant Signaling and Behavior* doi.org/10.4161/psb.25022.

22. Barron JE, Pasini RJ, Davis DW, Stuthman DD, Graham PH. 1999. Response to selection for seed yield and nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Fields Crops Research* 62, 119-128.
23. Bassett B, Goodman RN, Novacky A. 1977. Ultrastructure of soybean nodules. I. Release of rhizobia from the infection thread. *Canadian Journal of Microbiology* 23, 573-582.
24. Bates TR, Lynch JP. 2000. Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 87, 958-963.
25. Batten GD. 1992. A review of phosphorus efficiency in wheat. *Plant and Soil* 146, 163-168.
26. Bayuelo-Jiménez JS, Debouck DG, Lynch JP. 2003. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crop Research* 80, 207-222.
27. Beebe S, Lynch J, Galwey N, Tohme J, Ochoa I. 1997. A geographical approach to identify phosphorus-efficient genotypes among landraces and wild ancestors of common bean. *Euphytica* 95, 325-336.
28. Beemster GTS, Baskin TI. 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116, 1515-1526.
29. Bergersen FJ, Goodchild DJ. 1973. Aeration pathways in soybean root nodules. *Australian Journal of Biological Sciences* 26, 729-740.
30. Bergersen FJ. 1994. Distribution of O<sub>2</sub> within infected cells of soybean root nodules: a new simulation. *Protoplasma* 183, 49-61.
31. Bhat KKS, Nye PH. 1974. Diffusion of phosphate to plant roots in soil. III: Depletion around onion roots without root hairs. *Plant and Soil* 41, 383-394.
32. Bielecki RL. 1973. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 225-252.
33. Bliss FA. 1993. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant and Soil* 152, 71-79.
34. Bolan NS. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plant. *Plant and Soil* 134, 189-207.
35. Bordeleau LM, Prevost D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil* 161, 115-124.

36. Brewin NJ. 2004. Plant cell wall remodelling in the rhizobium legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Science* 23, 293-316.
37. Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology* 182, 5641-5652.
38. Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252, 55-128.
39. Burns RG. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 423-427.
40. Caixeta ET, Borém A, Azevedo Fagundes S, Niestche S, Barros EG, Moreira MA. 2003. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD marker linked to the resistance gene. *Euphytica* 134, 297-303.
41. Canini A, Leonardi D, Caiola MG, Ruggeri S, Carnovale E. 2001. Intracellular localization of calcium, phosphorus and nitrogen in common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Borlotto) by SEM, ESI and EELS techniques. *Plant Biosystems* 135, 123-132.
42. Caradus JR. 1981. Effect of root hair length on white clover growth over a range of soil phosphorus levels. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 24, 359-364.
43. Cassman KG, Whitney AS, Stockinger KR. 1980. Root growth and dry matter distribution of soybean as affected by phosphorus stress, nodulation and nitrogen source. *Crop Science* 20, 239-244.
44. Cassman KG, Munns DN, Beck DP. 1981. Growth of Rhizobium strains at low concentration of phosphate. *Soil Science Society of America Journal* 45, 520-523.
45. Cellier F, Conejero G, Ricaud L, Lu DT, Lepetit M, Gosti F, Casse F. 2004. Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant Journal* 39, 834- 846.
46. Chauvel B, Guillemain JP, Colbach N, Gasquez J. 2001. Evaluation of cropping systems for management of herbicide-resistant populations of blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). *Crop Protection* 20, 127-137.
47. Chaverra MH, Graham PH. 1992. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean. *Crop Science* 32, 1432-1436.
48. Chen WX, Wang ET, Wang SY, Li YB, Chen XQ, Li Y. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense*, sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated

- from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45, 153-159.
49. Chen WX, Tan ZY, Gao JL, Li Y, Wang ET. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov. isolated from tropical trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 870-873.
50. Cheng HP, Walker GC. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 180, 5183-5191.
51. Clarkson DT, Hawkesford MJ. 1993. Molecular biological approaches to plant nutrition. In: *Plant Nutrition-from Genetic Engineering to Field Practice* (Barrow NJ. ed). Kluwer Academic Publishers, pp. 23-33.
52. Colbach N, Maurin N, Huet P. 1996. Influence of cropping system on foot rot of winter wheat in France. *Crop Protection* 15, 295-305.
53. Condrón LM, Tiessen H. 2005. Interactions of organic phosphorus in terrestrial environments. In: *Organic Phosphorus in the Environment* (Turner BL, Frossard E, Baldwin DS. eds). CABI Publishing, Wallingford. pp, 295-307.
54. Cooper JE. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1355-1365.
55. Cordell D, Drangert JO, White S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19, 292-305.
56. Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6, 145-150.
57. Dakora FD. 1998. Nodule function in symbiotic bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) and kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) is tolerant of nitrate in the root medium. *Annals of Botany* 82, 687-690.
58. Dalton DA, Baird LM, Langeberg L, Taugher CY, Anyan WR, Vance CP, Sarath G. 1993. Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiology* 102, 481-489.
59. Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M. 1998. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* 206, 225-233.
60. Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M. 1999. *Pht2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11, 2153-2166.

61. Darrah PR. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 155/156, 1-20.
62. Debouck D. 1991. Systematics and morphology. In: *Common beans: Research for crop improvement* (van Schoonhoven A, Voysest O. eds). CABI, Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia. pp, 55-118.
63. Denarie J, Cullimore J. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors : a new class of signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74, 951-954.
64. Denarie J, Debelle F, Prome JC. 1996. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65, 503-535.
65. Denison RF, Kinraide TB. 1995. Oxygen-induced membrane depolarizations in legume root nodules (possible evidence for an osmoelectrical mechanism controlling nodule gas permeability). *Plant physiology* 108, 1235-1240.
66. Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE. 2008. *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Springer Science+Business Media B.V. 416 p.
67. Drevon JJ, Kalia VC, Heckmann MO, Salsac L. 1987. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 610-612.
68. Drevon JJ, Kalia VC, Heckmann MO, Pedelahore P. 1988. In situ open-flow assay of acetylene reduction activity by soybean root-nodules: influence of acetylene and oxygen. *Plant Physiology and Biochemistry* 26, 73-78.
69. Drevon JJ, Hartwig UA. 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soy bean and alfalfa. *Planta* 201, 463-469.
70. Drevon JJ, Frangne N, Fleurat-Lessard P, Payre H, Ribet J, Vadez V. 1998. Is nitrogenase-linked respiration regulated by osmocontractile cells in legume nodules? In: *Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century*. (Elmerich C, Kondorosi A, Newton W. eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 465-466.
71. Drevon JJ, Sifi B. 2000. Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le bassin méditerranéen. *Colloques INRA* 100, 417 p.
72. Drevon JJ, Alkama N, Araujo A, Beebe S, Blair MW, Hamza H, Jaillard B, Lopez A, Martinez-Romero E, Rodino P, Tajini F, Zaman-Allah M. 2011. Nodular diagnosis for ecological engineering of the symbiotic nitrogen fixation with legumes. *Procedia Environmental Science* 9, 40-46.

- 
73. Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* 90, 791-800.
  74. Eardly BD, Wang FS, Whittam TS, Selander RK. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 61, 507-512.
  75. FAOSTAT 2013. [http://faostat3.fao.org/home/index\\_fr.html?locale=fr#DOWNLOAD](http://faostat3.fao.org/home/index_fr.html?locale=fr#DOWNLOAD).
  76. Felix JF, Obaton M, Messiaem CM, Salsac L. 1981. Nitrate reductase and nitrogenase activities of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from different geographic locations. *Plant and Soil* 63, 427-438.
  77. Fohse D, Claassen N, Jungk A. 1988. Phosphorus efficiency of plants. I: External P requirements and P uptake efficiency of different plants species. *Plant and Soil* 110, 101-109.
  78. Föhse D, Claassen N, Jungk A. 1991. Phosphorus efficiency of plants. II: Significance of root radius, root hairs and cation-anion balance for phosphorus influx in seven plant species. *Plant and Soil* 132, 261-272.
  79. Frossard E, Condrón LM, Oberson A, Sinaj S, Fardeau JC. 2000. Processes Governing Phosphorus Availability in Temperate Soils. *Journal of Environmental Quality* 29, 15–23.
  80. Gage DJ, Bobo T, Long SR. 1996. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Bacteriology* 178, 7159-7166.
  81. Gage DJ, Margolin W. 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology* 3, 613-617.
  82. Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 280-300.
  83. Gahoonia TS, Care D, Nielsen NE. 1997. Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. *Plant and Soil* 191, 181-188.
  84. Gahoonia TS, Nielsen NE, Lyschede OB. 1999. Phosphorus (P) acquisition of cereal cultivars in the field at three levels of P fertilization. *Plant and Soil* 211, 269-281.
  85. Gahoonia TS, Nielsen NE. 2003. Phosphorus (P) uptake and growth of a root hairless barley mutant (bald root barley, *brb*) and wild type in low- and high-P soils. *Plant, Cell and Environment* 26, 1759-1766.

- 
86. Galvez S, Hirsch AM, Wycoff KL, Hunt S, Layzell DB, Kondorosi A, Crespi M. 2000. Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. *Plant Physiology* 124, 1059-1068.
  87. Gentili F, Huss-Danell K. 2003. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. *Journal of Experimental Botany* 54, 2757-2767.
  88. Gentili F, Wall LG, Huss-Danell K. 2006. Effects of phosphorus and nitrogen on nodulation are seen already at the stage of early cortical cell divisions in *Alnus incana*. *Annals of Botany* 98, 309–315.
  89. George TS, Turner BL, Gregory PJ, Cade-Menun BJ, Richardson AE. 2006. Depletion of organic phosphorus from oxisols in relation to phosphate activities in the rhizosphere. *European Journal of Soil Science* 57, 47-57.
  90. Gepts P, Debouck D. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Common beans: Research for crop improvement (van Schoonhoven A, Voysest O. eds). C.A.B.I., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia. pp. 7-53.
  91. Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008. Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review of Genetics* 42, 413-441.
  92. Gilbert N. 2009. The disappearing nutrient. *Nature* 461, 716-718.
  93. Gilroy S, Jones DL. 2000. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science* 5, 56-60.
  94. Giroux M., Cantin J, Rivest M, Tremblay G. 2002. L'évolution des teneurs en phosphore dans les sols selon leur fertilité, leur richesse en phosphore et les types de sol. In : Colloque sur le phosphore : une gestion éclairée, Québec, 19 p.
  95. Graham PH. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. : a review. *Field Crops Research* 4, 93-112.
  96. Graham PH. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 475-484.
  97. Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131, 872-877.
  98. Graham PH, Hungria M, Tlusty B. 2004. Breeding for better nitrogen fixation in grain legumes: Where do the rhizobia fit in? *Crop Management*. Doi: 10.1094/CM-2004-0301-02-RV.

- 
99. Graham PH. 2008. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses (Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE. eds). Springer Science, The Netherlands. pp. 23-58.
  100. Greiner R, Jany KD, Alminger ML. 2000. Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from barley (*Hordeum vulgare*). Journal of Cereal Science 31, 127-139.
  101. Greiner R, Muzquiz M, Burbano C, Cuadrado C, Pedrosa MM, Goyoaga C. 2001. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans (*Vicia faba* var. Alameda). Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 2234-2240.
  102. Grierson CS, Parker JS, Kemp AC. 2001. *Arabidopsis* genes with roles in root hair development. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 164, 131-140.
  103. Gunawardena SFBN, Danso SKA, Zapata F. 1992. Phosphorus requirement and nitrogen accumulation three mungbean (*Vigna radiata* (L) Welzek) cultivars. Plant and Soil 147, 267-274.
  104. Gunawardena SFBN, Danso SKA, Zapata F. 1993. Phosphorus requirement and sources of nitrogen in three soybean (*Glycine max*) genotypes, Bragg, nts 382 and Chippewa. Plant and Soil 151, 1-9.
  105. Ha NC, Kim YO, Oh TK, Oh BH. 1999. Preliminary X-ray crystallographic analysis of a novel phytase from a *Bacillus amyloliquefaciens* strain. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 55, 691-693.
  106. Hardarson G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. Plant and Soil 152, 1-17.
  107. Hardarson G, Bliss FA, Cigales-Rivera MR, Henson RA, Kipe-Nolt JA, Longeri L, Manrique A, Pena-Cabriaes JJ, Pereira PAA, Sanabria CA, Tsai SM. 1993. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. Plant and Soil 152, 59-70.
  108. Harlan JR, de Wet JMJ. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. Taxon 20, 509-517.
  109. Hawkesford MJ, Belcher AR. 1991. Differential protein synthesis in response to sulphate and phosphate deprivation: Identification of possible components of plasma-membrane transport systems in cultured tomato roots. Planta 185, 323-329.
  110. Hegeman CE, Grabau EA. 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. Plant Physiology 126, 1598-1608.

- 
111. Hellsten A, Huss-Danell K. 2001. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B, Soil and Plant Science* 50, 135-142.
112. Hernandez G, Drevon JJ. 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, 587-590.
113. Herouart D, Baudouin E, Frenco P, Harrison J, Santos R, Jamet A, Van de Sype G, Touati D, Puppo A. 2002. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 619-624.
114. Herrera MA, Bedmar EJ, Olivares J. 1985. Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. *Plant Science* 42, 177-182.
115. Hinsinger P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64, 225-265.
116. 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.
117. Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their environment constraint – a review. *Plant and Soil* 248, 43-59.
118. Hirsch AM. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 320-326.
119. Hirsch AM, Lum MR, Downie JA. 2001. What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special ? *Plant Physiology* 127, 1484-1492.
120. Hodge A. 2009. Root decisions. *Plant, Cell and Environment* 32, 628-640.
121. Hoffland E. 1992. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilisation of rock phosphate by rape. *Plant and Soil* 140, 279-289.
122. Hogberg P. 1997.  $^{15}N$  natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* 137, 179-203.
123. Hungria M, Franco AA, Sprent JI. 1993. New sources of high- temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 149, 103-109.
124. Hunt S, Gaito ST, Layzell DB. 1988. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II. Characterization of the diffusion barrier and estimation of the concentrations of  $CO_2$ ,  $H_2$ , and  $N_2$  in the infected cells. *Planta* 173, 128-141.
-

- 
125. Hunt S, Layzell D.B. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 483-511.
126. Imsande J. 1986. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. *Journal of Experimental Botany* 37, 348-355.
127. Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M, Emerich DW. 1990. Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium meliloti* cultures and bacterioids and their distribution within alfalfa nodules. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2587-2589.
128. Isoi T, Yoshida S. 1991. Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Soil Science and Plant Nutrition* 37, 559-563.
129. Israël DW. 1993. Symbiotic dinitrogen fixation and host plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency. *Physiologia Plantarum* 88, 294-300.
130. Israel DW. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiology* 84, 835-840.
131. Israel DW, Ruffy TW. 1988. Influence of phosphorus and nitrogen utilization efficiencies and associated physiological responses in soybean. *Crop Science Society of America* 28, 954-960.
132. Jakobsen I. 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* 64, 190-196.
133. Jackson RB, Manwaring JH, Caldwell MM. 1990. Rapid physiological adjustments of roots to localized soil enrichments. *Nature* 344, 58-60.
134. James EK, Sprent JI, Minchin FR, Brewin NJ. 1991. Intercellular location of glycoprotein in soybean nodules: effect of altered rhizosphere oxygen concentration. *Plant, Cell & Environment* 14, 467-476.
135. Jebara M, Drevon JJ. 2001. Genotypic variation in nodule conductance to the oxygen diffusion in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomie* 21, 667-674.
136. Jebara M, Aouani ME, Payre H, Drevon JJ. 2005. Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes under phosphorus deficiency. *Journal of Plant Physiology* 162, 309-315.
137. Jemo M, Abaidoo RC, Nolte C, Tchienkoua M, Sanginga N, Horst W.J. 2006. Phosphorus benefits from grain-legume crops to subsequent maize grown on acid soils of southern Cameroon. *Plant and Soil* 284, 385-397.
138. Jensen ES. 1996. Grain yield, symbiotic N<sub>2</sub> and interspecific competition for inorganic N in pea-barley Intercrops. *Plant and Soil* 182, 25-38.
-

- 
139. Johnson AE. 2000. Soil and plant phosphate. International Fertilizer Industry Association, Paris, 46p.
140. Johnson JF, Vance CP, Allan DL. 1996. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiology* 112, 31-41.
141. Jones DL. 1998. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil* 205, 25-44.
142. Jordan DC. 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (Krieg NR, Holt JC. eds). pp. 234-254.
143. Juma NG, Tabatabai MA. 1988. Hydrolysis of organic phosphates by corn and soybean roots. *Plant and Soil* 107, 31-38.
144. Jungk A, Asher CJ, Edwards DG, Meyer D. 1990. Influence of phosphate status on phosphate uptake kinetics of maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*). *Plant and Soil* 124, 175-182.
145. Jungk A. 2001. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164, 121-129.
146. Kai M, Masuda Y, Kikuchi Y, Osaki M, Tadano T. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from *Catharanthus roseus* which is highly homologous with phosphate transporter. *Soil Science and Plant Nutrition* 43, 227-235.
147. Kijne JW, Bauchrowitz MA, Diaz CL. 1997. Root Lectins and Rhizobia. *Plant Physiology* 115, 869-873.
148. King BJ, Layzell DB. 1991. Effects of increase in oxygen concentration during the argon-induced decline in nitrogenase activity in root nodules of soybean. *Plant Physiology* 96, 376-381.
149. Kipe-Nolt JA, Giller KE. 1993. A field evaluation using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. *Plant and Soil* 152, 107-114.
150. Kirk GJD, Santos EE, Findenegg GR. 1999. Phosphate solubilization by organic anion secretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. *Plant and Soil* 211, 11-18.
151. Kishinevsky BD, Zur M, Friedman Y, Meromi G, Ben-Moshe E, Nemas C. 1996. Variation in nitrogen fixation and yield in landraces of bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.). *Field crops research*. 48, 57-64.

- 
152. Kouas S, Labidi N, Debez A, Abdely C. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for Sustainable Development* 25, 389-393.
153. Kouas S, Alkama N, Abdely C, Drevon JJ. 2008. Proton efflux by nodulated roots varies among common-bean genotypes (*Phaseolus vulgaris*) under phosphorus deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 242-248.
154. Kouas S, Louche J, Debez A, Plassard C, Drevon JJ, Abdely C. 2009. Effect of phosphorus deficiency on acid phosphatase and phytase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under symbiotic nitrogen fixation. *Symbiosis* 47, 141-149.
155. Kumaga F, Danso SKA, Zapata F. 1994. Time-course of nitrogen fixation in two bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) cultivars. *Biology and Fertility of Soils* 18, 231-236.
156. Laboure AM, Gagnon J, Lescure AM. 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochemistry Journal* 295, 413-419.
157. Laguerre G, Fernandez MP, Edel V, Normand P, Amarger N. 1991. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43, 761-767.
158. Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE. 2008. Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology and Evolution* 23, 95-103.
159. Lamont B. 1983. Root hair dimensions and surface/volume/weight ratios of roots with the aid of scanning electron microscopy. *Plant and Soil* 74, 149-152.
160. Lamont BB. 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters - a review. *Plant and Soil* 248, 1-19.
161. LaRue T.A., Patterson T.G. 1981. How much nitrogen do legumes fix? *Advances in Agronomy* 34, 15-38.
162. Layzell DB, Gaito ST, Hunt S. 1988. Model of gas exchange diffusion in legume nodules. I. Calculation of gas exchange rates and the energy cost on N<sup>2</sup> fixation. *Planta* 173, 117-127.
163. Layzell DB, Atkins CA. 1997. The physiology and biochemistry of legume N<sub>2</sub> fixation. In: *Plant Metabolism* (Dennis D.T., Turpin D.H., Lefebvre D.D., Layzell D.B. eds). Harlow: Addison Wesley Longman. pp. 495-505.
164. Lazali M, Zaman-Allah M, Amenc L, Ounane G, Abadie J, Drevon JJ. 2013. A phytase gene is over-expressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta* 238, 317-324.
-

- 
- 165.Lazali M, Bargaz A, Carlsson G, Ounane SM, Drevon JJ. 2014. Discrimination against  $^{15}\text{N}$  among recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* L. contrasting in phosphorus use efficiency for nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology* 171, 199-204.
- 166.Leggewie G, Willmitzer L, Riesmeier JW. 1997. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *The Plant Cell* 9, 381-392.
- 167.Lei XG, Weaver JD, Mullaney E, Ullah AH, Azain MJ. 2013. Phytase, a new life for an old enzyme. *The Annual Review of Animal Biosciences* 1, 283-309.
- 168.Leprince F, Quiquampoix H. 1996. Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- 169.Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Prome JC, Denarie J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium-Meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.
- 170.Leung K, Bottomley PJ. 1987. Influence of phosphate on the growth and nodulation characteristics of *Rhizobium trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2098-2105.
- 171.Leytem AB, Mikkelsen RL, Gilliam JW. 2002. Sorption of organic phosphorus compounds in Atlantic coastal plain soils. *Soil Science* 167, 652-658.
- 172.Li D, Zhu H, Liu K, Liu X, Leggewie G, Udvardi M, Wang D. 2002. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 27772-27781.
- 173.Li L, Tang C, Rengel Z, Zhang F. 2003. Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropped wheat by an organic phosphorus source. *Plant and Soil* 248, 297-303.
- 174.Li M, Tadano T. 1996. Comparison of characteristics of acid phosphatases secreted from roots of lupin and tomato. *Soil Science and plant Nutrition* 42, 753-763.
- 175.Li YF, Luo AC, Wei XH, Yao XG. 2008. Changes in phosphorus fractions, pH and phosphatase activity in rhizosphere of two rice genotypes. *Pedosphere* 18, 785-794.
- 176.Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal* 1, 321-330.
- 177.Lindstrom K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39, 365-367.
-

- 
178. Loewus FA, Loewus MW. 1983. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 34, 137-161.
179. Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 280-287.
180. Lott JNA, Ockenden I, Raboy V, Batten GD. 2000. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research* 10, 11-33.
181. Lung SC, Lim BL. 2006. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*N. tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant and Soil*, 279, 187-199.
182. Lung SC, Leung A, Kuang R, Wang Y, Leung P, Lim BL. 2008. Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry* 69, 365-373.
183. Lynch JP, Beebe S. 1995. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to two phosphorus availability. *HortScience* 30, 1156-1171.
184. Lynch JP, Brown KM. 2001. Topsoil foraging: an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* 237, 225-237.
185. Lynch JP, Brown KM. 2006. Whole-plant adaptations to low phosphorus availability. In: *Plant-Environment Interactions* (Huang B. ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 209-242.
186. Lynch WL. 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology* 109, 7-13.
187. Ma XF, Wright E, Ge Y, Bell J, Xi Y, Bouton JH, Wang ZY. 2009. Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes. *Plant Science* 176, 479-488.
188. Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP. 2001. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 24, 459-467.
189. Mahuku GS, Jara CE, Cajiao C, Beebe S. 2002. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. *Plant Disease* 86, 1383-1387.
190. Mandri B, Drevon JJ, Bargaz A, Oufdou K, Faghire M, Plassard C, Payre H, 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 Nutr* 35, 1477-1490.
191. Martinez E, Flores M, Brom S, Romero D, Davila G, Palacios R. 1988. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant and Soil* 108, 179-184.
-

- 
192. Martinez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Antonio A, Graham P, Pardo MA. 1991. *Rhizobium tropicia*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 41, 417-426.
193. Massawe FJ, Mwale SS, Azam-Ali SN, Roberts JA. 2005. Breeding in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.): strategic considerations. African Journal of Biotechnology 4, 463-471.
194. Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. Plant Physiology 133, 499-509.
195. Mateos PF, Baker DL, Petersen M, Velazquez E, Jimenez-Zurdo JI, Martinez-Molina E, Squartini A, Orgambide G, Hubbell DH, Dazzo FB. 2001. Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Canadian Journal of Microbiology 47, 475-487.
196. Maugenest S, Martinez I, Lescure AM. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedlings phytase. Biochemistry Journal 322, 511-517.
197. Mengel K, Kirby EA. 1987. Principles of plant nutrition. International Potash Institute, Switzerland, 687 p.
198. Michiels J, Van Soom T, D'hooghe I, Dombrecht B, Benhassine T, de Wilde P, Vanderleyden J. 1998. The *Rhizobium etli* rpoN locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of rpoN, pstN and ptsA mutant. Journal of Bacteriology 180, 1729-1740.
199. Miller SS, Liu J, Allan DL, Menzhuber CJ, Fedorova M, Vance CP. 2001. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. Plant Physiology 127, 594-606.
200. Minchin FR. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. Soil Biology and Biochemistry 29, 881-888.
201. Minchin FR, James EK, Becana M. 2008. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. In: Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses (Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE. eds). Springer Science+Business Media B.V. pp : 321-362.
202. Molina C, Zaman-Allah M, Khan F, Fatnassi N, Horres R, Rotter B, Steinhauer D, Amenc L, Drevon JJ, Winter P, Kahl G. 2011. The salt-responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deepSuperSAGE. BMC Plant Biol 11:31.
-

- 
203. Moraghan JT, Etchevers JD, Padilla J. 2006. Contrasting accumulations of calcium and magnesium in seed coats and embryos of common bean and soybean. *Food Chemistry* 95, 554-561.
204. Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW. 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 31, 341-353.
205. Mullaney EJ, Ullah AH. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312, 179-184.
206. Mullaney EJ, Ullah AHJ. 2007. Phytases: Attributes, catalytic mechanisms and applications. In: *Inositol phosphates linking agriculture and the environment* (Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ. Eds). Cambridge, CABI. pp. 97-110.
207. Mullen MD, Israel DW, Wilum AG. 1988. Effects of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean (*glycine max* (L.) Merr.) phosphorus nutrition on nodulation and dinitrogen fixation. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2387-2392.
208. Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31-36.
209. Neumann G, Römheld V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211, 121-130.
210. Neumann G, Martinoia E. 2002. Cluster roots - an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science* 7, 162-167.
211. O'Hara GW, Boonkerd N, Dilworth MJ. 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil* 108, 93-110.
212. Obaton M, Miquel M, Robin P, Conejero G, Domenach AM, Bardin R. 1982. Influence d'un déficit hydrique sur l'activité nitrate réductase et nitrogénase chez le soja. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 294, 1007-1112.
213. Oh BC, Choi WC, Park S, Kim YO, Oh TK. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 362-372.
214. Ohwaki Y, Hirata H. 1992. Differences in carboxylic acid exudation among P-starved leguminous crops in relation to carboxylic acid contents in plant tissues and phospholipid level in roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 38, 235-243.

- 
215. Olivera M, Tejera N, Iribarne C, Ocana A, Lluch C. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* 121, 498-505.
216. Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA, Washington, 18 p.
217. Parniske M, Downie JA. 2003. Locks, keys and symbioses. *Nature* 425, 569-570.
218. Parsons R, Day DA. 1990. Mechanism of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. *Plant, Cell & Environment* 13, 501-512.
219. Parsons R, Raven JA, Sprent JI. 1995. Translocation of iron to the N<sub>2</sub> fixing stem nodules of *sesbania rostrata* (Brem). *Journal of Experimental Botany* 46, 291-296.
220. Patriarca EJ, Tate R, Ferraioli S, Laccarino M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology* 234, 201-262.
221. Peoples MB, Giller KE, Herridge DF, Vessey JK. 2002. Limitations to biological nitrogen fixation as a renewable source of nitrogen for agriculture. In: Nitrogen fixation: global perspectives. (Fina MT, O'Brian MR, Layzell DB, Vessey JK, Newton W. eds). Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Congress of Nitrogen Fixation, Canada, CABI Publishing. pp. 346-351.
222. Pereira PAA, Bliss FA. 1987. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. *Plant and Soil* 104, 79-84.
223. Pereira PAA, Bliss FA. 1989. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N<sub>2</sub> fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. *Plant and Soil* 115, 75-82.
224. Pérez-Torres C, Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M, Herrera-Estrella L. 2008. Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the *TIR1* auxin receptor. *The Plant Cell* 20, 3258-3272.
225. Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 180-201.
226. Peterson RL, Farquhar ML. 1996. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. *The Botanical Review* 62, 1-40.
227. Piha MI, Munns DN. 1987. Nitrogen fixation potential of grain legumes under controlled conditions. *Plant and Soil* 98, 169-182.
-

- 
- 228.Plante AF. 2005. Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In: Soil microbiology, ecology and biochemistry (Paul E.A. ed.). Elsevier, New York, USA. pp. 389-432.
- 229.Poirier Y, Bucher M. 2002. Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, Vol. 1.
- 230.Polèse LM. 2006. La culture des haricots et des pois. Editions Artémis, 60 p.
- 231.Prell J, Poole P. 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. Trends in Microbiology 14, 161-168.
- 232.Purcell LC, Sinclair TR. 1990. Nitrogenase activity and nodule gas permeability response to rhizospheric NH<sub>3</sub> in soybean. Plant Physiology 92, 268-272.
- 233.Purcell LC, Sinclair TR. 1993. Soybean (*Glycine max*) nodule physical traits associated with permeability responses to oxygen. Plant Physiology 103, 149-156.
- 234.Qiao Y, Tang C, Han X, Miao S. 2007. Phosphorus Deficiency Delays the Onset of Nodule Function in Soybean. Journal of Plant Nutrition 30, 1341-1353.
- 235.Quiquampoix H, Mousain D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: Organic phosphorus in the environment (Turner BL, Frossard E, Baldwin DS. eds), CAB International, Wallingford. pp. 89-112.
- 236.Raboy V. 2003. Molecules of interest: myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. Phytochemistry 64, 1033-1043.
- 237.Raboy V. 2003. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. Phytochemistry 64, 1033-1043.
- 238.Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewin NJ. 1992. Structure and Growth of Infection Threads in the Legume Symbiosis with *Rhizobium-Leguminosarum*. The Plant Journal 2, 385-395.
- 239.Raghothama KG. 1999. Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50, 665-693.
- 240.Raghothama KG. 2000. Phosphate transport and signalling. Current Opinion in Plant Biology 3, 182-187.
- 241.Rainey KM, Griffiths PD. 2005. Inheritance of heat tolerance during reproductive development in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of the American Society for Horticultural Science 130, 700-706.
- 242.Rathbun EA, Naldrett MJ, Brewin NJ. 2002. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules. Molecular Plant Microbe Interactions 15, 350-359.

- 
243. Rausch C, Bucher M. 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216, 23-37.
244. Renella G, Egamberdiyeva D, Landi L, Mench M, Nannipieri P. 2006. Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 702-708.
245. Ribet J, Drevon JJ. 1995a. Increase in conductance to oxygen and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiologia Plantarum* 94, 298-304.
246. Ribet J, Drevon JJ. 1995b. Phosphorus deficiency increases the acetylene-induced decline in nitrogenase activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Experimental Botany* 46, 1479-1486.
247. Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant Journal* 25, 641-649.
248. Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321, 305-339.
249. Robertson JG, Farnden KJF. 1980. Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. In: *The biochemistry of plants* (Stumpf PK, Conn EE eds). Academic Press, New York, pp. 65-113.
250. Robson AD, O'Hara GW, Abbott LK. 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* 8, 427-436.
251. Rochester IJ, Peoples MB, Hulugalle NR, Gault RR, Constable GA. 2001. Using legume to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. *Field Crops Research* 70, 27-41.
252. Rodino AP, De La Fuente M, De Ron AM, Lema MJ, Drevon JJ, Santalla M. 2011. Variation for nodulation and plant yield of common bean genotypes and environmental effects on the genotype expression. *Plant and Soil*, 346, 349-361.
253. Rolin DB, Boswell RT, Sloger C, Tu SI, Pfeffer PE. 1989. *In vivo*  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic studies of soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis. *Plant Physiology* 89, 1238-1246.
254. Rotaru V, Sinclair TR. 2009. Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. *Environmental and Experimental Botany* 66, 94-99.
-

- 
255. Roth LE, Stacey G. 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology* 49, 13-23.
256. Ryan PR, Delhaize E, Jones DL. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 527-560.
257. Sa TM, Israel DW. 1991. Energy status and functioning of phosphorus deficient soybean nodules. *Plant Physiology* 97, 928-935.
258. Sadowsky MJ, Cregan PB, Keyser HH. 1988. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1907-1910.
259. Sadowsky MJ. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. *In Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment.* (Werner D., Newton W.E. Eds) Springer, Printed in the Netherlands, 89-112.
260. Salsac L, Drevon JJ, Zengbe M, Cleyet-Marel JC, Obaton M. 1984. Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation. *Physiologie Vegetale* 22, 509-521.
261. Salvagiottia F, Cassmana KG, Spechta JE, Waltersa DT, Weissb A, Dobermann A. 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Fields Crop Research* 108, 1-13.
262. Sanginga N, Wirkom LE, Okogun A, Akobundu IO, Carsky RJ, Tian G. 1996. Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and legumes in Guinea savanna in Nigeria. *Biology and Fertility of Soils* 23, 441-448.
263. Santos R, Herouart D, Puppo A, Touati D. 2000. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiology* 38, 750-759.
264. Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116, 447-453.
265. Schulze J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 125-137.
266. Schulze J, Drevon JJ. 2005. P-deficiency increases the O<sub>2</sub> uptake per N<sub>2</sub> reduced in alfalfa. *Journal of Experimental Botany* 56, 1779-1784.

- 
- 267.Segovia L, Pinero D, Palacios R, Martinez Romero E. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Applied and Environmental Microbiology 57, 426-433.
- 268.Serraj R, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Drevon JJ. 1994. Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root-nodules are induced by short-term exposures to high salt or oxygen concentrations. Plant, Cell and Environment 18, 455-462.
- 269.Serraj R, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Drevon JJ. 1995. Structural changes in the inner cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposures to high salt or oxygen concentrations. Plant, Cell and Environment 18, 455-462.
- 270.Serraj R, Adu-Gyamfi J. 2004. Role of symbiotic nitrogen fixation in the improvement of legume productivity under stressed environments. West African Journal of Applied Ecology 6, 95-109.
- 271.Serraj R, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Drevon JJ. 2005. Changes in soybean nodule cortical cells under short-term salt stress and altered O<sub>2</sub> concentration. Plant, Cell and Environment 18, 455-462.
- 272.Shane MW, Szota C, Lambers H. 2004. A root trait accounting for the extreme phosphorus sensitivity of *Hakea prostrata* (Proteaceae). Plant, Cell and Environment 27, 991-1004.
- 273.Shane MW, Lambers H. 2005. Cluster roots: a curiosity in context. Plant and Soil 274, 101-125.
- 274.Shearer G, Kohl DH. 1986. N<sub>2</sub>-fixation in field setting: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. Australian Journal of Plant Physiology 13, 699-756.
- 275.Shu L, Shen L, Rengel Z, Tang C, Zhang F, Cawthray GR. 2007. Formation of cluster roots and exudation by *Lupinus albus* in response to localized application of different phosphorus source. Plant Science 172, 1017-1024.
- 276.Siddiqi MY, Glass ADM. 1981. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. Journal of Plant Nutrition 4, 289-302.
- 277.Silva LG, Trugo LC. 1996. Characterization of phytase activity in lupin seeds. Journal of Food Biochemistry 20, 329-340.
- 278.Sinclair TR, Goudriaan J. 1981. Physical and morphological constraints on transport in nodules. Plant Physiology 67, 143-145.
- 279.Singh SP. 1991. Bean genetics. In: Common beans: Research for crop improvement (van Schoonhoven A, Voysest O. eds). C.A.B.I., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia. pp. 199-286.
-

- 
- 280.Singleton PW, AbdelMajid HM, Tavares JW. 1985. Effect of phosphorus on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. Soil Science Society of America Journal 49, 613-616.
- 281.Skene KR. 1998. Cluster roots: some ecological considerations. Journal of Ecology 86, 1060-1064.
- 282.Skene KR. 2001. Cluster roots: model experimental tools for key biological problems. Journal of Experimental Botany 52, 479-485.
- 283.Smit G, Kijne JW, Lugtenberg BJ. 1987. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. Journal of Bacteriology 169, 4294-4301.
- 284.Smit G, Logman TJ, Boerrigter ME, Kijne JW, Lugtenberg BJ. 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. Journal of Bacteriology 171, 4054-4062.
- 285.Steiner T, Mosenthin R, Zimmermann B, Greiner R, Roth S. 2007. Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. Animal Feed Science and Technology 133, 320-334.
- 286.Sun JS, Simpson RJ, Sands R. 1992. Nitrogenase activity of two genotypes of *Acacia mangium* as affected by phosphorus nutrition. Plant and Soil 144, 51-58.
- 287.Tang C, Hinsinger P, Jaillard B, Rengel Z, Drevon J.J. 2001. Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. Agronomie 21, 683-689.
- 288.Tarafdar JC, Jungk A. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. Biology and Fertility of Soils 3, 199-204.
- 289.Timmers ACJ, Auriac MC, Truchet G. 1999. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development 126, 3617-3628.
- 290.Tjepkema JD, Yocum CS. 1974. Measurement of oxygen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. Planta 119, 351-360.
- 291.Tohme J, González DO, Beebe S, Duque MC. 1996. AFLP analysis of gene pools a wild bean core collection. Crop Science 36, 1375-1384.
-

- 
292. Tsvetkova GE, Georgiev GI. 2003. Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient-use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* soybean (*Glycine max* L. Merr.) symbiosis. Bulgaria Journal of Plant Physiology, Special issue 331-335.
293. Turner BL, Cade-Menun BJ, Westermann DT. 2003. Organic phosphorus composition and potential bioavailability in semi-arid arable soils of the western United States. Soil Science Society of America Journal 67, 1168-1179.
294. Turner BL, Frossard E, Baldwin DS. 2005. Organic phosphorus in the environment. CABI Publishing, 875 Massachusetts Avenue, Cambridge, USA, 399 p.
295. Turner WL, Plaxton WC. 2001. Purification and characterization of banana fruit acid phosphatase. Planta 214, 243-249.
296. Vadez V, Lasso JH, Beck DP, Drevon JJ. 1999. Variability of N<sub>2</sub>-fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. Euphytica 106, 231-242.
297. Vadez V, Drevon JJ, 2001. Genotypic variability in phosphorus use efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). Agronomie 21, 691-699.
298. Valverde C, Wall LG. 1999. Regulation of nodulation in *Discaria trinervis* (Rhamnaceae)-*Frankia* symbiosis. Canadian Journal of Botany 77, 1302-1310.
299. Valverde C, Ferrari A, Wall LG. 2002. Phosphorus and the regulation of nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* BCU110501. New Phytologist 153, 43-51.
300. van Aarle IM, Viennois G, Amenc LK, Tatry MV, Luu DT, Plassard C. 2007. Fluorescent in situ RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. Mycorrhiza 17, 487-494.
301. van Berkum P, Beyene D, Bao G, Campbell TA, Eardly BD. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 48, 13-22.
302. van Brussel AA, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lugtenberg BJ, Kijne JW. 1992. Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. Science 257, 70-72.
303. Van Etten RL, Davidson R, Stevis PE, MacArthur H, Moore DL. 1991. Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. Journal of Biology and Chemistry 266, 2313-2319.
-

- 
304. Vance CP, Graham PH, Allan DL. 2000. Biological Nitrogen Fixation: Phosphorus-A Critical Future Need?. In: Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity (Pedros FO, Hungria M, Yates G, Newton WE. eds.), Kluwer Academic Publishers. pp. 509-514.
305. Vance CP. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiology 127, 390-397.
306. Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants securing a nonrenewable resource. New Phytologist 157, 423-447.
307. Vance CP. 2008. Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules. In: Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses (Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE. eds). Springer Science+Business Media B.V. pp. 293-320.
308. Vikman KE, Vessey JK. 1993. Ontogenetic changes in root nodule subpopulations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). I. Nitrogenase activity and respiration during pod filling. Journal of Experimental Botany 44, 563-569.
309. Vincent JM. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook, Oxford: Blackwell Science Publisher, 164 p.
310. Waelkens F, Voets T, Vlassak K, Vanderleyden J, van Rhijn P. 1995. The nodS gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena Leucocephala*. Molecular Plant Microbe Interactions 8, 147-154.
311. Walsh KB, Canny MJ, Layzell DB. 1989. Vascular transport and soybean nodule function: II. A role for phloem supply in product export. Plant, Cell & Environment 12, 713-723.
312. Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX, Martinez-Romero E. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 48, 687-699.
313. Wasaki J, Omura M, Osaki M, Ito H, Matsui H, Shinano T, Todano T. 1999. Structure of a cDNA for an acid phosphatase from phosphate-deficient lupin (*Lupinus albus* L.) roots. Soil Science and Plant Nutrition 45, 439-449.
314. Webb J, Sheehy JE. 1991. Legume nodule morphology with regard to oxygen diffusion and nitrogen fixation. Annals of Botany 67, 77-83.
315. Weinman S, Méhul P. 2004. Toute la biochimie. Dunod. 466 p.
316. Weiz PR, Sinclair TR. 1987. Regulation of soybean nitrogen fixation in response to rhizosphere oxygen: role of nodule respiration. Plant Physiology 84, 900-905.

- 
317. Werner D, Newton WE. 2005. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Printed in the Netherlands. 361p.
318. Witty JF, Minchin FR, Sheehy JE, Minguez MI. 1984. Acetylene-induced changes in the oxygen diffusion resistance and nitrogenase activity of legume root nodules. *Annals of Botany* 53, 13-20.
319. Witty JF, Skot L, Revsbech NP. 1987. Direct Evidence for Changes in the Resistance of Legume Root Nodules to O<sub>2</sub> Diffusion. *Journal of Experimental Botany* 38, 1129-1140.
320. Woolley J, Davis JHC. 1991. The agronomy of intercropping with beans. In *Common beans: Research for crop improvement* (van Schoonhoven A., Voysest O. eds). C.A.B.I., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia. pp. 707-735.
321. Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, Van Loon AP. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 367-373.
322. Xiao K, Harrison MJ, Wang ZY. 2005. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta* 222, 27-36.
323. Xiao Y, Li L, Zhang F. 2004. Effect of root contact on interspecific competition and N transfer between wheat and fababean using direct and indirect <sup>15</sup>N techniques. *Plant and Soil* 262, 45-54.
324. Yan F, Zhu Y, Muller C, Zorb C, Schubert S. 2002. Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology* 129, 50-63.
325. Yan X, Lynch JP, Beebe SE. 1995. Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types: II. Yield response. *Crop Science* 35, 1094-1099.
326. Yang WC, de Blank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, van kammen A, Franssen H, Bisseling T. 1994. *Rhizobium* Nod Factors Reactivate the Cell-Cycle During Infection and Nodule Primordium Formation, but the Cycle Is Only Completed in Primordium Formation. *The Plant Cell* 6, 1415-1426.
327. Zahran HH. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular biology Reviews* 63, 968-989.

The background of the slide is a circular microscopic image of plant tissue. It shows a central vascular cylinder with a distinct arrangement of cells. The outer part of the cylinder consists of large, rectangular cells, likely the cortex or epidermis. The inner part shows a more complex structure, possibly the pith or a vascular bundle, with smaller, more densely packed cells. The overall color is a mix of light blue and green, suggesting a specific staining technique. A white, rounded rectangular box is centered horizontally across the middle of the image, containing the word 'Annexes' in a black, italicized serif font.

*Annexes*

## **I. Protocole d'extraction d'ARN : Qiagen**

1. Récolte des échantillons (nodules pour les deux lignées 115 et 147), juste après leur récolte ces échantillons doivent être conservés à -80°C ;
2. Broyage manuelle dans l'azote selon le cas ;
3. Aliquotage : Tarer le tube et prélever 100 mg de poudre ou échantillon entier avec une spatule fine. Il faut rester au maximum sur glace ou sur de l'azote liquide ;
4. Conserver pendant une nuit à -80°C ;
5. Compléter le tampon d'extraction (TE) : 20 µl de DTT 2M (0,30g/ml) pour 1 ml de tampon sous la sorbonne ;
6. Ajouter rapidement à l'aide d'une pointe bleue coupée 1 ml de tampon TE complété ; mélanger par inversion afin que le liquide soit bien en contact avec l'échantillon ;
7. Broyer 20 secondes (6 m/s) : Broyeur MP ;
8. Incuber 30 min ;
9. Transférer le surnageant (liquide) dans la colonne violette. La centrifugation retient les débris cellulaire et homogénéise le lysat. S'il y a beaucoup de débris, certains peuvent passé dans le tube. Faire attention alors de ne pas les collecter en transférant le lysat dans un autre tube ;
10. Centrifuger 2 min / 13 000 rpm à 20°C ;
11. Transférer le surnageant (liquide) dans un tube de 2 mL sans toucher au culot et en prenant le moins possible de particules en suspension ;
12. Ajouter 1 volume (généralement 700 µl) d'EtOH 100% (bien mélanger par inversion) : Précipitation des acides nucléiques ;
13. Centrifuger 15 mn à 13 200 rpm ;
14. Eliminer le surnageant et les gouttelettes sur la paroi (sécher le tube) avec un cône puis avec un kimwips sans toucher au culot. Changer de cône et de kimwips à chaque échantillon ;
15. Reprendre le culot dans 200 µl H<sub>2</sub>O DEPC (RNase Free) en pipetant jusqu'à la dissolution complète ;
16. Mettre le liquide dans colonne à bague violette (retient ADN) ;
17. Centrifuger 30 sec à 10 000 rpm ;

18. Ajouter 350 µl de RTL plus +DTT 2M (20µl de B-mercapto pour 1 ml de RTL plus) puis mélanger par inversion ;
  19. Ajouter 1 volume (généralement 250 µl) d'EtOH 100% au liquide du tube collecteur et jeter la colonne ou récupérer ADN. Un précipité peut se former après l'addition d'éthanol, mais cela n'affecte pas la procédure. Mélanger en pipetant ;
  20. Déposer immédiatement avec les précipités formés sur une colonne RNeasy (rose)
  21. Centrifuger 15 sec à 10 000 rpm ;
  22. Jeter le liquide ;
  23. Ajouter 700 µl de RW1 ;
  24. Centrifuger 15 sec à 10 000 rpm. Jeter liquide ;
  25. Ajouter 500 µl de RPE + EtOH ;
  26. Centrifuger 15 sec à 10 000 rpm. Jeter liquide ;
  27. Ajouter 500 µl de RPE + EtOH ;
  28. Centrifuger 15 sec à 10 000 rpm. Jeter le liquide ;
  29. Centrifuger 2 min à 13 000 rpm (élimine toute trace d'EtOH) ;
  30. Changer le tube collecteur (mettre type collecteur propre) : Optionnel ;
  31. Centrifuger 1 min à 13 000 rpm : Optionnel ;
  32. Mettre la colonne dans un tube de 1.5 ml (stockage de la marque Eppendorf) ;
  33. Ajouter 50 µl H<sub>2</sub>O du Kit directement sur la membrane. Attention à bien placer l'eau au centre de la colonne pour éviter la rétention d'eau par la bague. Incuber 10 min à température ambiante ;
- Si on suppose qu'il y a plus de 20 µg d'ARN, on peut répartir le volume d'élution en deux fois le tout dans le même tube ;
34. Centrifuger 1 min à 13 000 rpm. Jeter la colonne ;
  35. Faire un aliquote de 15 µl en mélangeant bien par pipettage avant pour la visualisation sur gel (10 µl) et pour le dosage au ribogreen (2x2µl) ;
  36. Conserver l'ARN à -80°C.

## II. Présentation de la région d'étude

### 1. Situation géographique

La wilaya de Sétif se situe dans les hautes plaines céréalières de l'Est algérien. Elle est limitée au Nord par les wilayas de Jijel et Bejaia, à l'Est par la wilaya de Mila, à l'Ouest par la wilaya de Bordj Bou Arreridj, au Sud-Est par la wilaya de Batna et au Sud-Ouest par la wilaya de M'sila (Figure 1). Elle est composée de 20 dairate et 60 communes. Sa superficie est de 6 504 km<sup>2</sup>, soit 0.27 % du territoire national. Elle compte près de 1.7 millions d'habitants ce qui la classe comme la deuxième wilaya la plus peuplée en Algérie après la capitale Alger.



*Figure 1. Situation de la zone d'étude.*

### 2. Le milieu physique

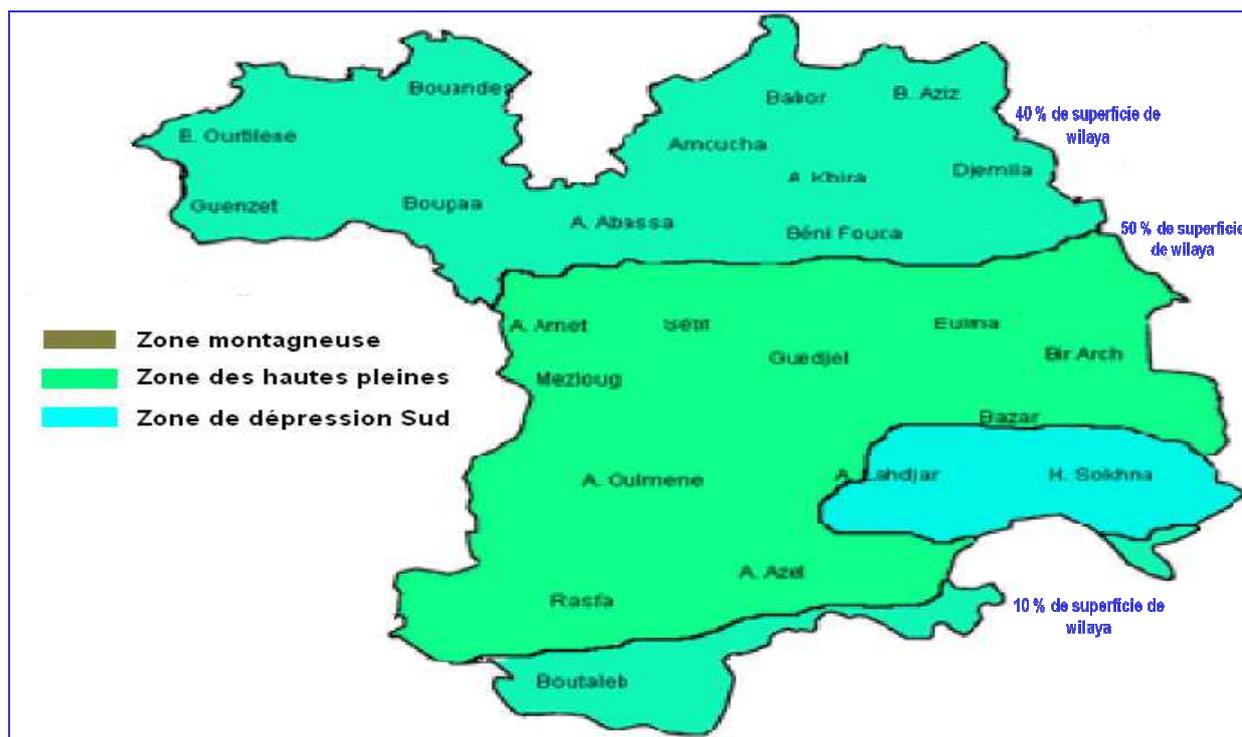
#### 2.1. Le relief

La wilaya de Sétif est appelée capitale des hauts plateaux avec une altitude de 1300 m et un découpage naturel décomposé de 3 grandes zones :

- Une zone montagneuse au Nord représentée par la chaîne des Babors qui s'étend sur une centaine de kilomètres couvrant pratiquement le Nord de la wilaya où on rencontre des cimes élevés dont la montagne de Babor avec 2004 m.
- Une zone des hautes plaines : Elle occupe la région centrale de la wilaya dont l'altitude varie entre 800 et 1300 m. Au niveau de cette zone émerge des mamelons et quelques bourrelets

montagneuse. Au Nord : Djebel Megress 1737 m (Ain Abessa) ; A l'Est Djebel Braou 1263 m (Bazer Sekra) ; Au Sud Djebel Boutaleb Aferhane : 1886 m (Boutaleb) ; Au Centre Djebel Youcef Aferhane : 1442 m (Guedjal, Bir Hadada).

- La zone sud : Son altitude varie entre 1000 et 1500 m. Au Sud Est, on trouve le Djebel Afghan avec un sommet culminant à 1886 m. Cette zone est caractérisée par la présence des Chotts : Chott Beida (commune d'Oum Laâdjoul), Chott El-Fraïne (commune de Ain Lahdjar) et Chott Melloul (commune de Guellal).



*Figure 2. Le relief de la région de Sétif.*

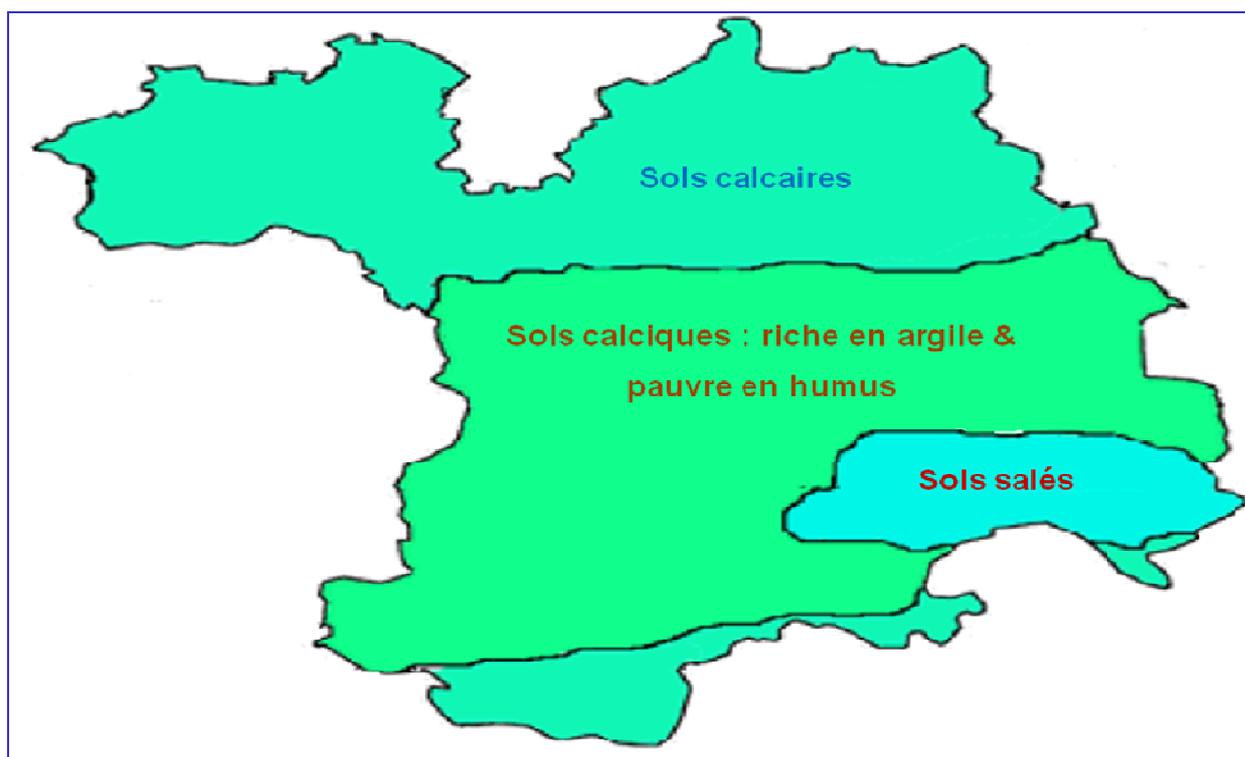
## 2.2. Les sols

Les sols de la région de Sétif sont généralement de type brun calcaire au Sud et au Centre avec parfois des encroûtements calcaires (dalles), pour devenir argileux à argileux limoneux et profond au Nord.

La région montagneuse, dans sa plus grande partie, est recouverte par des sols calcaires ainsi que des sols alluvions occupant les bourrelets montagneux. Les hautes plaines sont occupées de façon intermittente par les sols calciques et les sols salins.

Les terres sont localisées à 40% en zone de piémonts où on enregistre une pluviométrie moyenne de 500 mm par an ; le reste des terres (60%) est en zone de plaines où il pleut généralement entre 250 et 400 mm par an.

Cette répartition génère une diversité au niveau de la morphologie des sols de part et d'une obéissant pour chaque zone à un système de production spécifique. Néanmoins, la vocation première de la wilaya réside dans l'association céréales-élevage, seul schéma en l'absence de grands périmètres irrigués, pouvant valoriser au mieux les potentialités agricoles dans cette région.

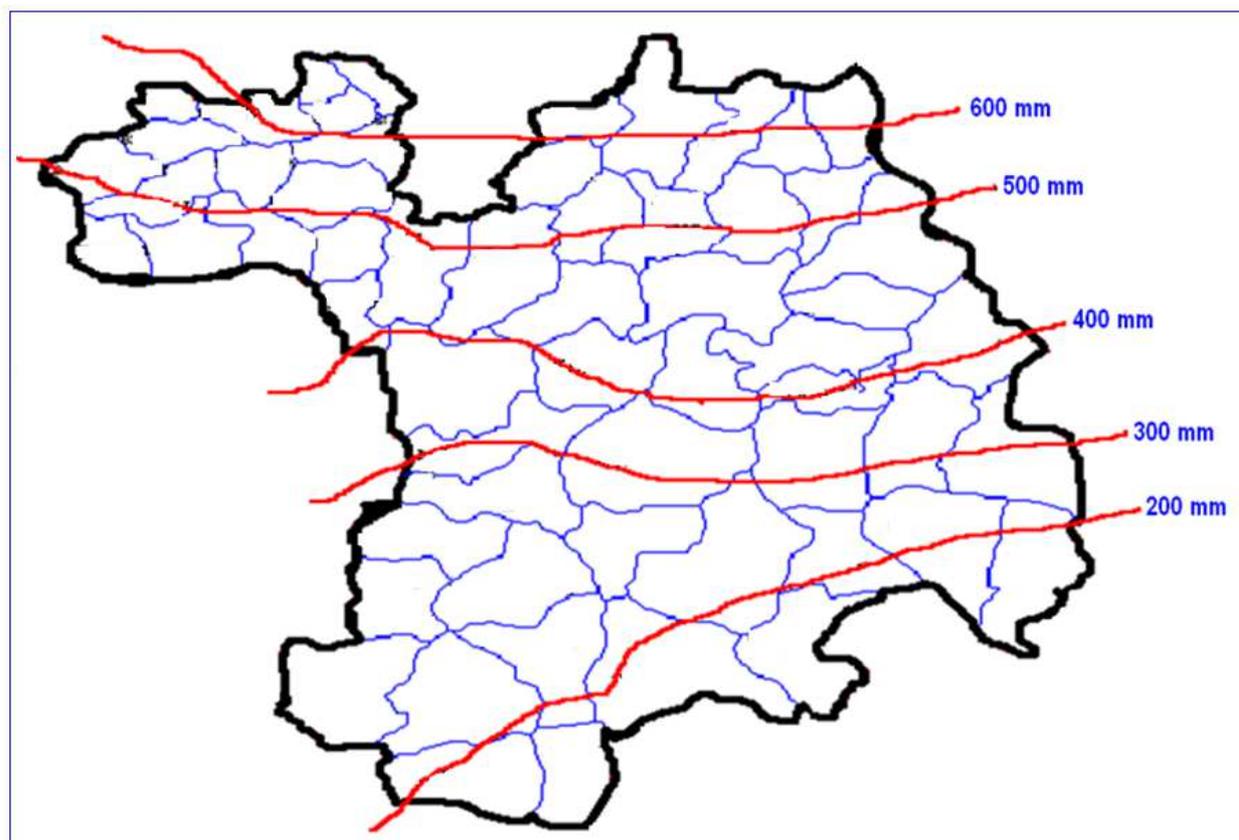


*Figure 3. Les sols de la région de Sétif.*

### 2.3. Les ressources hydriques

#### - Les eaux superficielles

Elles proviennent essentiellement des oueds dont les plus importants sont :



*Figure 4. Répartition spatiale des précipitations.*

- *Oued Boussellam* : c'est le principal cours d'eau permanent qui coule du Nord vers le Sud et vers le Nord Ouest pour rejoindre Oued Soummam dans la wilaya de Bejaia ;
- *Oued Dhamecha et Oued Menaâ* : ce sont les deux Oueds permanents localisés dans le Nord Est de la wilaya. Le premier prend ses sources aux environs des hautes plaines et l'autre aux environs de Ain el Kebira et drainent la partie Nord ;
- *Oued Ftissa et Oued Ben Diab* : ces deux Oueds sillonnent la partie Sud mais sont moins importants que ceux de la partie Nord ; ils deviennent secs en été.

#### *- Les eaux souterraines*

Les réservoirs des eaux souterraines sont encore mal connus et très peu de données relatives aux nappes sont disponibles. Notons la présence de nappes artésiennes et phréatiques au Nord qui se caractérisent par un débit médiocre et des nappes profondes se localisant dans le Sud et qui sont influencées par une remontée permanente dans les Chotts où une partie de leurs eaux se perd par évaporation. Le tableau 8 qui rapporte les ressources hydriques de la wilaya de Sétif montre que celles-ci sont relativement faibles ; le débit moyen varie de 4 litres par seconde pour les puits à 14 litres par seconde pour les forages.

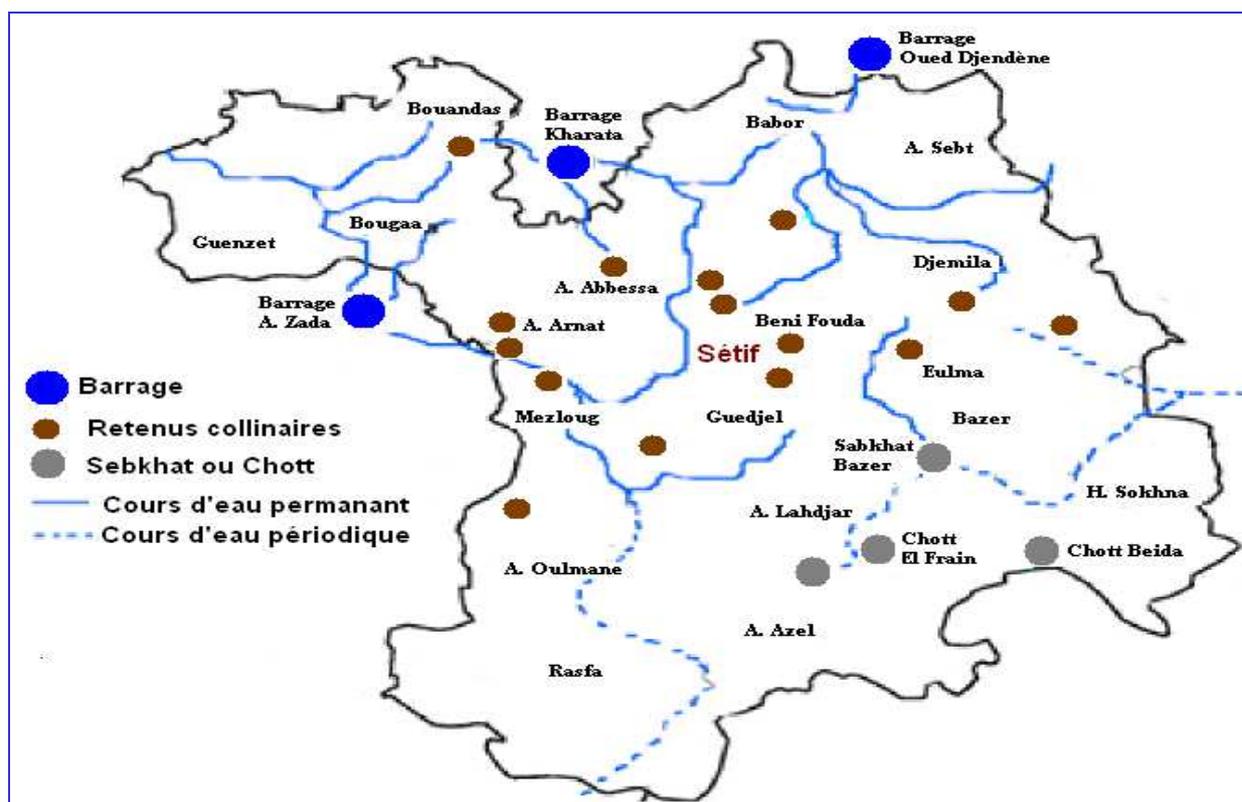


Figure 5. Les ressources en eaux de la région de Sétif.

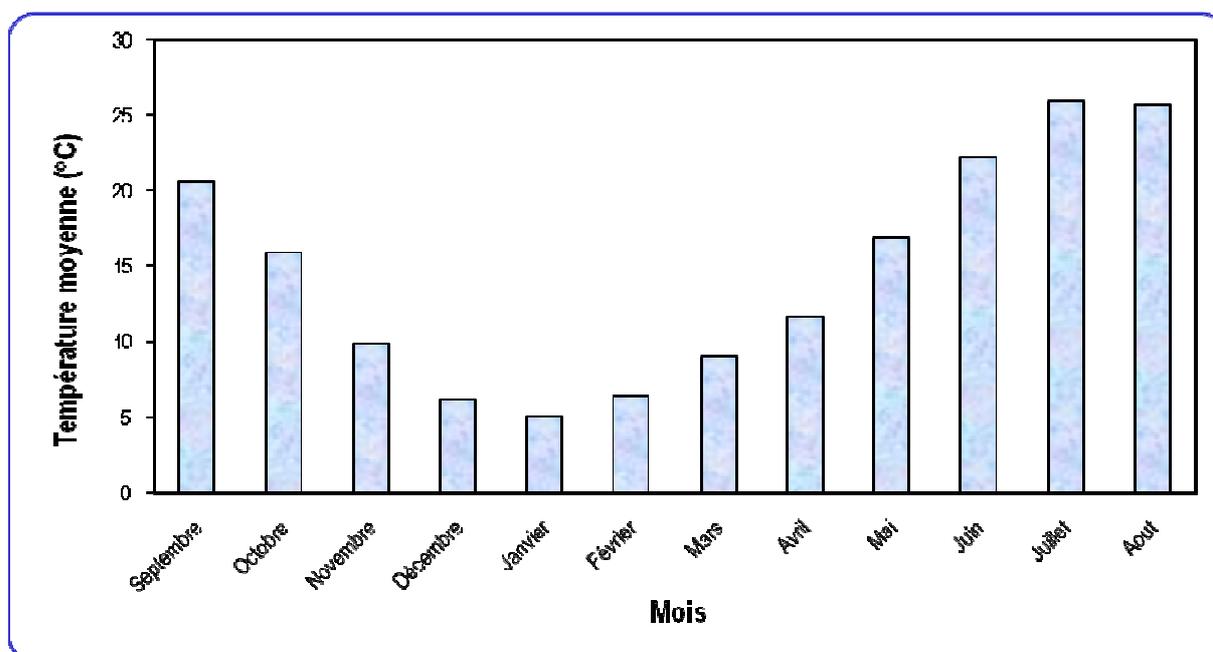
## 2.4. Le climat

Sétif est caractérisée par un climat de type continental semi-aride avec des hivers rigoureux et des étés torrides. Les pluies hivernales sont très violentes et sont responsables d'érosions prononcées surtout en zone Nord. En été, les précipitations sont presque nulles et les chaleurs sont très importantes et responsables de nombreux incendies.

Sétif est moyennement gélifère ; la zone montagneuse se trouve être la plus gélifère de la wilaya. Durant la saison froide, la wilaya enregistre d'importantes chutes de neige bénéfiques aux sols et ce, jusqu'au mois de Mars et parfois Avril. Au cours de la saison printanière les gelées tardives font des ravages sur les hautes plaines et influent négativement sur la production agricole.

### - Les températures

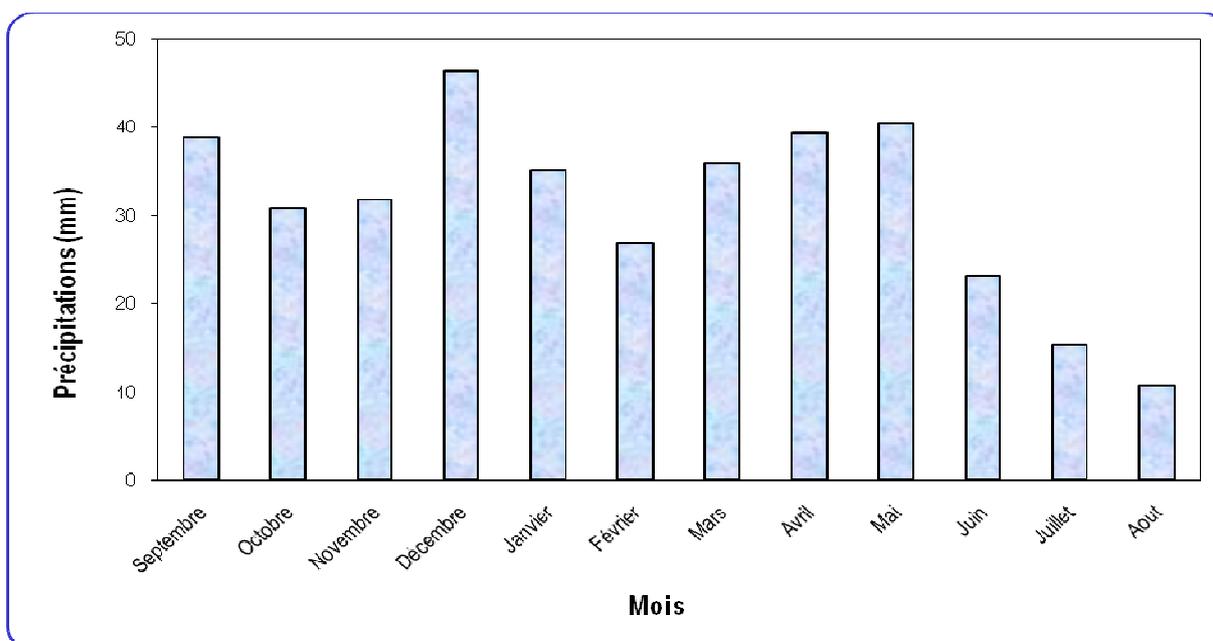
Les températures sont généralement basses pendant l'hiver et très élevées en période estivale particulièrement en Juillet et Août. Pendant la période hivernale, on note la prédominance des vents d'Ouest et Nord-Ouest et en été, la prédominance du sirocco, un vent du Sud. La saison sèche s'étend généralement du mois de Mai à Septembre.



*Figure 6. Evolution des températures moyennes mensuelles de la période 1985 – 2007.*

#### - La pluviosité

Les pluies sont très irrégulières d'une année à l'autre et inégalement réparties. La région montagneuse reçoit environ 700 mm en moyenne annuellement. La région des hautes plaines en reçoit 400 mm. La moyenne annuelle des précipitations avoisine les 350 mm/an. Les pluies sont généralement fréquentes de l'automne jusqu'au printemps alors que l'été est pratiquement sec.

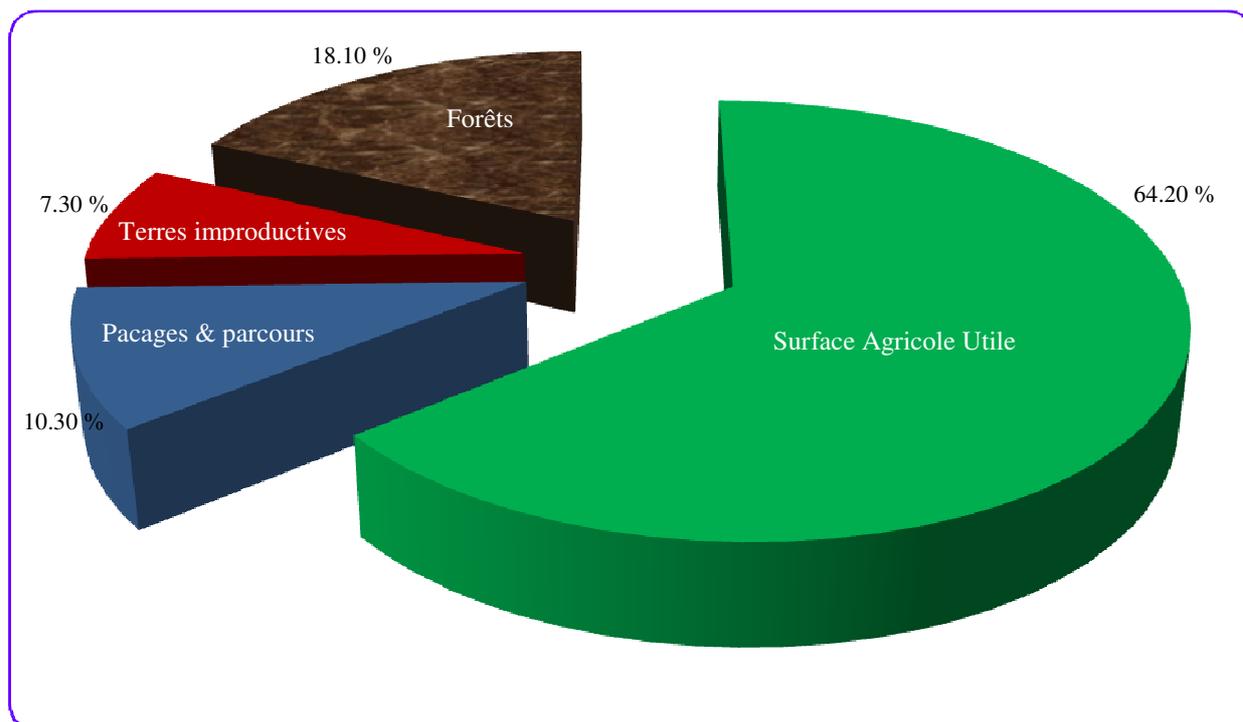


*Figure 7. Evolution des précipitations moyennes mensuelles de la période 1985 – 2007.*

### 3. L'agriculture

#### 3.1. Répartition générale des terres

La wilaya de Sétif occupe une superficie agricole totale (SAT) de 561 970 ha soit 85.80% de la superficie totale. La superficie agricole utile (SAU) est de 360 890 ha (64.20% de la SAT) dont 18 499 ha en irrigué.



*Figure 8. Répartition de la surface agricole totale.*

#### 3.2. Diagnostic du secteur agricole de la wilaya de Sétif

La wilaya de Sétif compte 42 300 exploitations agricoles dont plus de 96 % sont de nature juridique privée. Elles occupent en effet plus de 64% de la SAU. Les terres du domaine privé de l'Etat (EAC+EAI) ne sont pas moins importantes ; elles représentent près de 30% de la SAU.

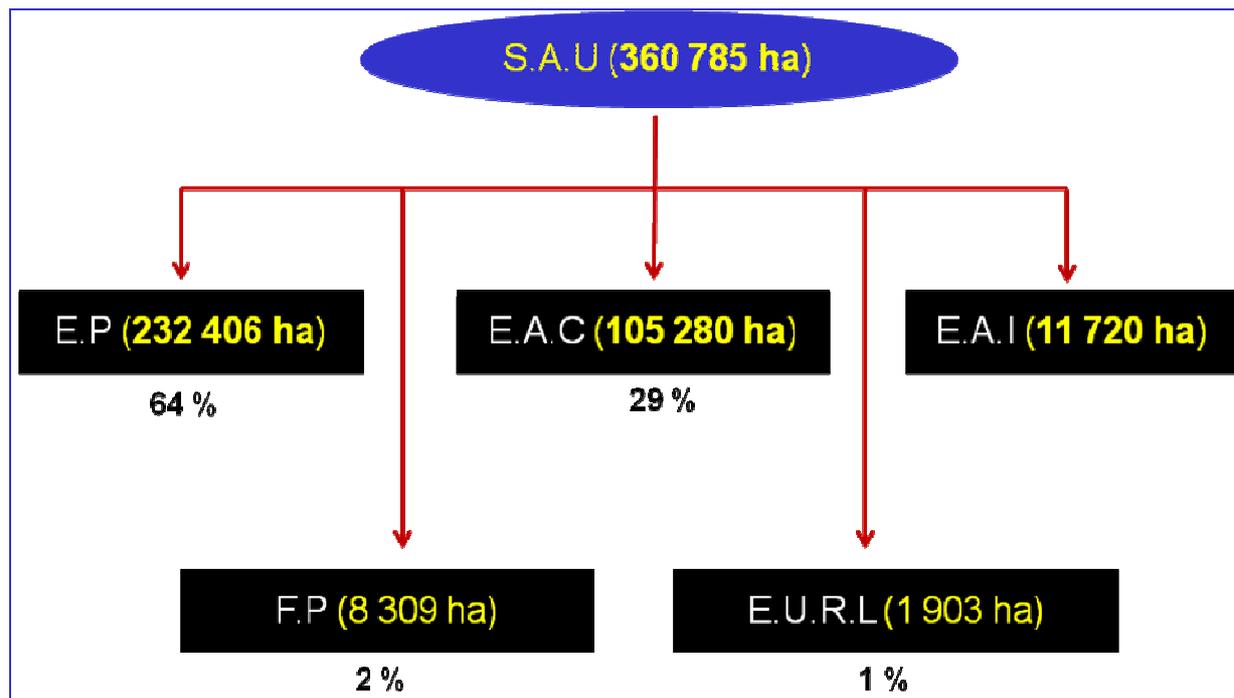


Figure 9. Répartition générale des terres.

### 3.3. Les cultures

#### - Les céréales

La production céréalière est extrêmement fluctuante et est caractérisée par l'extrême variabilité du volume des récoltes car elle reste sous l'étroite dépendance des conditions climatiques mais cela démontre aussi, si besoin est, de l'insuffisance maîtrise de cette culture. Les superficies emblavées annuellement tournent autour d'une moyenne de 170 000 ha soit 47% de la S.A.U. Les rendements sont très faibles (une moyenne de 8 qx/ha sur 10 ans) et nous remarquons que la production est irrégulière et évolue en corrélation avec la pluviométrie autour d'une moyenne décennale de l'ordre de 1 349 000 qx.

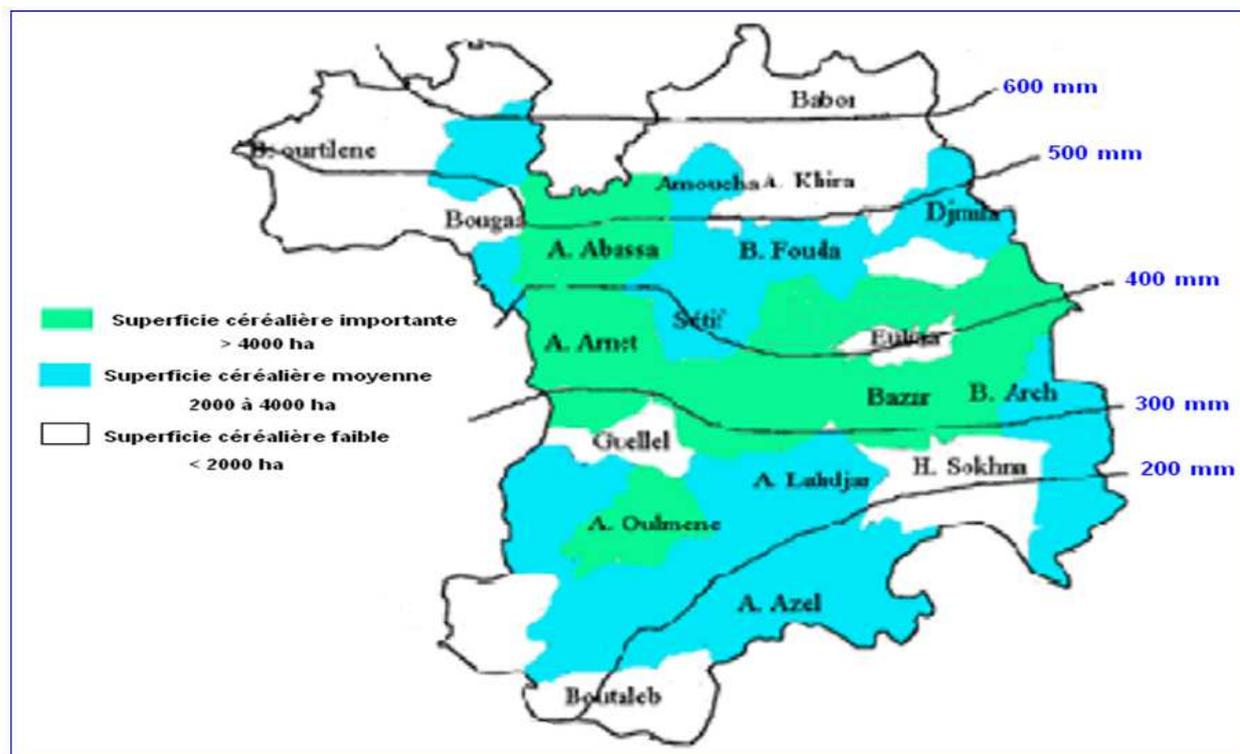


Figure 10. Répartition des cultures céréalières en fonction des zones.

#### - Légumineuses alimentaires

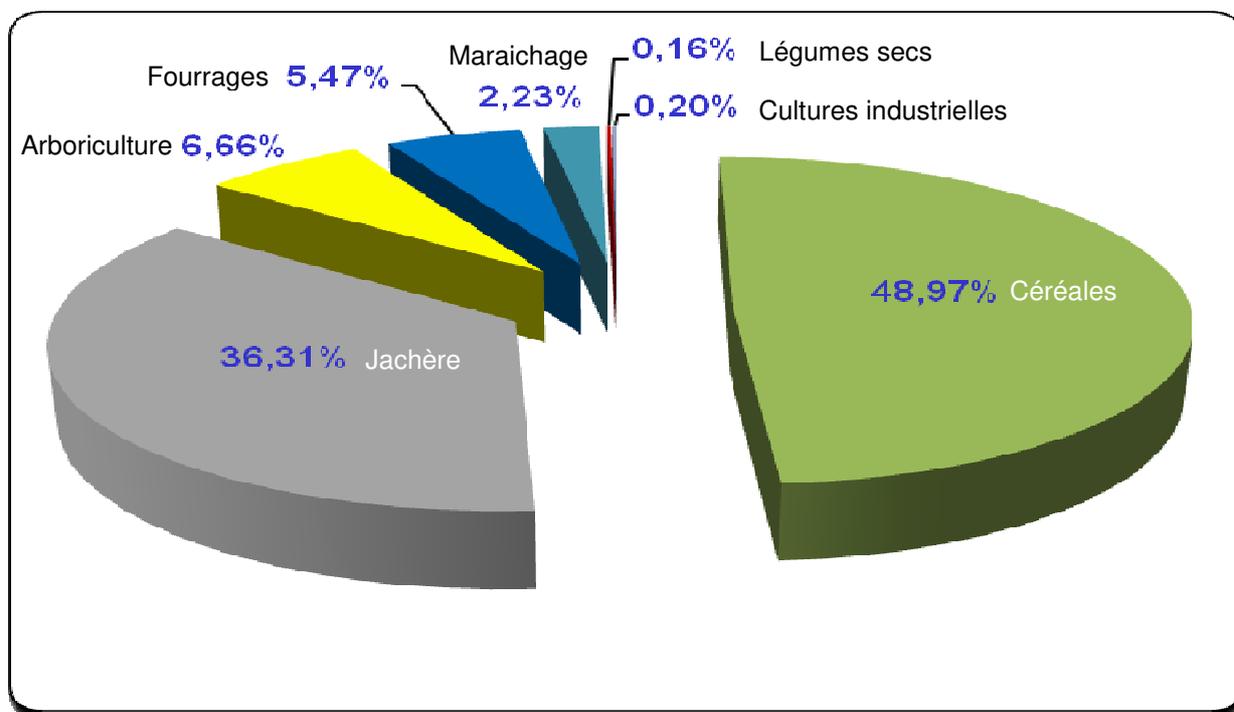
Dans les hauts plateaux de Sétif, la culture des légumineuses alimentaires n'a pas connu l'évolution escomptée tant sur le plan des superficies que celui de la production en grain. Actuellement, la situation se caractérise par une variation persistante et imprévisible de la production, une faiblesse des rendements et une diminution des superficies. Elles restent concentrées dans le Nord de la wilaya où les conditions agro-écologiques sont plus favorables. On les retrouve principalement dans la zone Nord à Beni Aziz qui cultive de 17 à 22% de la sole des légumineuses de la wilaya, suivi de Beni Ourtilane, Bougaa, Bouandas, Maouklane, Ain el Kébira et Amoucha. Dans la zone centre, elles sont présentes principalement à El Eulma et Ain Arnet.

En ce qui concerne les espèces, le pois-chiche et la fève ont toujours occupés la première place suivis du pois sec, la lentille et le haricot.

Les rendements obtenus ont toujours été faibles et n'ont jamais dépassé 6 qx/ha pour la lentille et 7 qx/ha pour la fève, le pois-chiche et le pois sec. L'analyse des rendements moyens par espèce pour la période 1985/1997, montre que la culture du pois-chiche (4 qx/ha) et la lentille (3 qx/ha) sont les moins productives.

### - Cultures maraichères et fruitières

Les cultures maraichères et industrielles occupent 11 513 ha soit 3% de la SAU. La pomme de terre prédomine avec 2 730 ha. Cependant, les surfaces des plantations fruitières connaissent ces dernières années une augmentation considérable, passant ainsi de 16 262 ha en 1994 à plus de 24 000 ha en 2004 grâce aux aides de l'Etat à travers le PNDA.



*Figure 11. Répartition des cultures en fonction de la SAU.*