

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

Ecole doctorale : Sciences de la Vie, de la Sante et de l'Environnement

Faculté des Sciences et Techniques



THESE DE DOCTORAT

Année : 2017

N° d'ordre : 201746

Mention : Biologie Physiologie et Pathologies Végétales

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Présentée par **M. Papa Mamadou Sitor NDOUR**

Effet de la variabilité génétique du mil (*Pennisetum glaucum* L.R.Br.) sur la diversité et l'activité des micro-organismes du sol rhizosphérique : Conséquences agronomiques et physiologiques

Soutenue le 22 Décembre 2017 devant le jury composé de :

Président	Pr Samba Ndao SYLLA	Professeur titulaire	FST-UCAD
Rapporteurs	Dr Diégane DIOUF	Maître de conférences	FST-UCAD
	Dr Laurent LAPLAZE	Directeur de recherches	IRD
	Dr Ndjido Ardo KANE	Chargé de recherches	ISRA
Examineur	Dr Thierry HEULIN	Directeur de recherches	CNRS
Co-directeurs de thèse	Pr Ibrahima NDOYE	Professeur titulaire	FST-UCAD
	Dr Laurent CURNAC	Directeur de recherches	IRD

REMERCIEMENTS :

Ce Mémoire me permet d'exprimer la gratitude et la reconnaissance que je porte pour plusieurs personnes qui ont participé à ma formation, m'ont guidé, motivé ou soutenu dans des moments plus ou moins difficiles de cette thèse réalisée entre le LMI-IESOL de Dakar, l'UMR Eco et Sols de Montpellier et le LEMIRE de Cadarache (Saint Paul lez-Durance).

Je remercie d'abord mes co-directeurs de thèse : Pr Ibrahima Ndoye et Dr Laurent Cournac. Pr Ndoye m'a très vite adopté dès mes débuts dans le master de biotechnologies végétales et microbiennes (BIOVEM) qu'il coordonnait. C'est grâce à ses conseils et ses orientations que j'ai pu intégrer le LMI-IESOL de l'IRD à travers un stage de master qui a abouti à cette présente thèse. A travers sa personne je remercie l'ensemble des Professeurs de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD qui ont contribué à ma formation. Quant au Dr Laurent Cournac, Je lui témoigne toute ma reconnaissance et ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail, pour sa générosité tant sur le plan intellectuel que sur le plan logistique ; Merci de n'avoir ménagé aucun effort pour que cette thèse soit menée à bien.

Je remercie ensuite les membres du jury qui ont accepté de juger ce modeste travail et d'y apporter des remarques constructives et pertinentes afin de le rendre meilleur. Je veux nommer le Président : Pr Samba Ndao Sylla, les rapporteurs : Dr Diégane Diouf, Dr Laurent Laplaze et Dr Ndjido Ardo Kane et l'examineur : Dr Thierry Heulin.

J'exprime également mes sentiments de gratitude aux Dr Thierry Heulin et Wafa Achouack du LEMIRE de Cadarache pour l'accueil chaleureux dans leur labo, ensuite pour l'encadrement et leur forte implication sur ce travail. A travers eux je remercie l'ensemble du personnel du LEMIRE. Je pense particulièrement à Mohamed Barakat et à Philippe Ortet qui m'ont formé sur l'utilisation du logiciel QIIME pour l'analyse des données NGS.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit du service de renforcement des capacités de l'IRD et du service de coopération et d'action culturelle de l'ambassade de France (SCAC) pour le co-financement de la bourse de thèse qui m'a permis de mener cette thèse en alternance entre Dakar-Montpellier-Saint Paul Lez-Durance ; mais aussi à l'ISRA à travers le projet PPAAO pour le soutien financier qu'il m'a accordé durant ma première année de thèse. Ainsi je remercie Dr Jean Luc-Chotte directeur de l'UMR Eco et sols, Dr Dominique Masse ancien directeur du LMI IESOL, Anne Laure-Pablo et Damien Dezette qui m'ont initié à la PCR-quantitative, mais également Josianne Abadie qui m'a aidé sur la manip Microresp durant mes

passages à Montpellier. Je profite également de cette occasion pour remercier Mariama Gueye qui m'a initié sur diverses techniques de Microbiologie et de Biologie Moléculaire.

Je remercie, également Dr Lydie Lardy d'avoir participé à mon comité de thèse et de m'avoir accueilli à l'aéroport lors de mon premier séjour à Montpellier. De même je remercie tous les autres membres de mon comité élargi qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail : Dr Ndjido Kane de l'ISRA, Dr Yves Vigouroux et Dr Komi Assigbetse de l'IRD.

J'exprime également mes remerciements à tous les chercheurs du LMI-IESOL de Bel Air pour leurs aide et conseils précieux, les Dr, Yacine Badiane-Ndour, Jonathan Vaussières, Farma Ndiaye-Cissé, Frédéric Feder, Moussa Ndiénor, Cathy Clermont-Dauphin, Laure Tall-Diouf, Samuel Legros. Merci à l'ensemble du personnel administratif et technique des laboratoires IESOL et LAMA, notamment Mme Pourméra Gassama à qui je réserve une mention spéciale, Mme Marie Pierre Tine les sieurs Lamine Dieng, Amadou Diop dit Traoré, Lamine Sagna, Moustapha Sané, Omar Faye, Eli Joseph Diatta, Blaise Mane, pour la bonne humeur qui vous a toujours animés dans les labos, couloirs et bureaux. Merci aux services administratifs de la Représentation de l'IRD ; Merci également à Pape Sarr pour le service informatique.

Ces remerciements s'adressent également à mes collègues étudiants du LMI-IESOL. Je commencerai naturellement par Diamé Tine et Cheikh Mbacke Barry qui ont contribué aux travaux de cette thèse en tant que stagiaires. Ensuite je dis merci aux Docteurs Tidiane Dieye « Chef du bureau 6 » qui m'a beaucoup guidé dans mes premiers pas, Abdoulaye Badiane, Sidy Diakhaté, et Habibou Assouma ; aux doctorants Rachel Ntoma, Banna Mbaye, Souleymane Diatta, Christian Nadieline, Paul Ciss, Myriam Grillot, Fallilou Diallo, Oscar Malou, Médoune Mbengue, Sophie Djiba, Maram Ba, Hervé Kouassi et aux stagiaires Awa Sy Thiam, Aïssata Ndiaye, Dieynaba Sarr, Merci également aux collègues des autres labos du centre de Bel-Air : El hadji Serigne Sylla mon ami et compagnon de tous les jours, Dr Babacar Thioye, Dr Mariama Ngom, Sally Diatta, Nogoye Niang, Ahmadou Sow, Moussa Sall, Ibrahima Djigaly.

Je remercie chaleureusement Momar Lô et Moustapha Salane, mes premiers amis que j'ai eus la chance de connaître durant mon cycle primaire. Merci également à Papa Waly Bakhoum, Babacar Mbaye, des amis avec qui je partagerai encore sûrement d'autres moments forts.

En fin c'est le moment de dire un très grand merci à ma famille. Je commencerai par mon père et ma mère pour l'éducation qu'ils m'ont offerte, ma grande sœur Seynabou et mes frères Massaer et Kabir. Je remercie du fond du cœur mon oncle Ndiogou Ndiaye qui m'a toujours

poussé à aller plus loin, mon cousin Pape Amadou Ndiaye et ma tante. Je n'oublie pas de remercier tous les membres de ma famille élargie que je ne pourrais pas citer ici : cousins, cousines, tantes, oncles etc. Je remercie également Abdou Lackram Ndiaye et toute sa famille pour tout ce qu'ils ont fait pour moi pendant mon jeune âge en réservant une mention spéciale à Fatou Seye pour tout le respect et la haute considération qu'elle me porte.

*Cette thèse est dédiée à
ma Mère **Amy Ndiaye** et mon Père **Mbaye Diarra Ndour***

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes
Prénom Nom du candidat : **Papa Mamadou Sitor NDOUR**

Titre de la thèse : Effet de la variabilité génétique du mil (*Pennisetum glaucum L.R.Br.*) sur la diversité et l'activité des micro-organismes du sol rhizosphérique : Conséquences agronomiques et physiologiques

Date et lieu de la soutenance : 22 Décembre 2017, UCAD, Dakar, Sénégal

Composition du jury :

Pr Samba Ndao SYLLA	Professeur titulaire	FST-UCAD	Président
Dr Diégane DIOUF	Maître de conférences	FST-UCAD	Rapporteur
Dr Laurent LAPLAZE	Directeur de recherches	IRD	Rapporteur
Dr Ndjido Ardo KANE	Chargé de recherches	ISRA	Rapporteur
Dr Thierry HEULIN	Directeur de recherches	CNRS	Examineur
Pr Ibrahima NDOYE	Professeur titulaire	FST-UCAD	Examineur
Dr Laurent COURNAC	Directeur de recherches	IRD	Examineur

Résumé :

Le mil est une céréale très résistante à la sécheresse, cultivée principalement en Inde et en Afrique sahélienne et présentant une grande diversité génétique. Cette dernière offre des possibilités en matière de sélection variétale pour une intensification durable de la production. Outre les critères liés aux performances agronomiques, à la résistance aux stress biotiques et abiotiques, les relations entre la plante et les communautés microbiennes rhizosphériques, en grande partie gouvernées par l'exsudation racinaire, pourraient être des cibles de sélection intéressantes à intégrer dans les programmes d'amélioration variétale. En effet, celles-ci influencent les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol et impactent la disponibilité des nutriments et de l'eau. Notre étude avait pour objectif de déterminer s'il existe chez le mil une variabilité génétique intra-spécifique de ces interactions en vue de tester leurs répercussions éventuelles sur les performances agronomiques.

Pour ce faire un travail de criblage a été effectué sur deux collections de lignées de mil en utilisant comme paramètre test de ces interactions l'agrégation du sol rhizosphérique, mesurée via le ratio entre la masse de sol adhérent aux racines et la biomasse racinaire (MSA/BR). Des lignées contrastées ont été sélectionnées et des analyses de la diversité et de l'activité des communautés microbiennes rhizosphériques associées ont été effectuées dans deux expérimentations dont l'une en conditions semi contrôlées et l'autre au champ.

Les expérimentations de phénotypage ont montré qu'il y avait bien une variabilité génétique de l'agrégation rhizosphérique entre les lignées de mil. En conditions semi contrôlées, la diversité et la composition de la communauté bactérienne au sein de la rhizosphère étaient variables et corrélées à l'intensité du ratio MSA/BR. Lors de l'expérimentation au champ, cette relation n'a pas été retrouvée. Toutefois, certaines activités enzymatiques du sol comme la chitinase, la phosphatase acide et la bêta glucosidase y présentent une variabilité entre lignées et une certaine relation avec l'agrégation du sol rhizosphérique. Les corrélations entre les indicateurs de structure et d'activité des communautés rhizosphériques et l'agrégation ne sont pas univoques, indiquant que d'autres processus sont probablement impliqués dans la variabilité de ces paramètres. Cependant les observations réalisées confirment l'intérêt de poursuivre l'étude du déterminisme génétique des interactions rhizosphériques chez le mil, et de poursuivre de manière plus détaillée l'évaluation de leur impact agronomique.

Mots-clés : mil, exsudation racinaire, agrégation rhizosphérique, séquençage 16S, séquençage ITS, exopolysaccharide, diversité microbienne, activités microbiennes, qPCR

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Prénom Nom du candidat : **Papa Mamadou Sitor NDOUR**

ABSTRACT

Effect of pearl-millet (*Pennisetum glaucum L.R.Br.*) genetic variability on the diversity and activity of rhizospheric soil microorganisms: Agronomic and physiological consequences

Millet is a drought-tolerant cereal crop, mainly grown in India and Sahelian Africa, with high genetic diversity. The latter offers opportunities for varietal selection for its sustainable intensification. In addition to criteria related to agronomic performances, resistance to biotic and abiotic stresses, the relationships between varieties and rhizospheric microbial communities could be very interesting to take in account in breeding programs. Indeed, these relationships can influence the soil physico-chemical and biological characteristics, which affect the availability of nutrients and water. Our study aimed to determine whether there is an intra-specific genetic variability which governs these interactions in millet and to evaluate their possible repercussions on agronomical performances.

A screening experiment of rhizospheric soil aggregation, used as a proxy of rhizospheric interactions, was carried out on two collections of millet lines using the ratio between the mass of the soil adhering to the roots and the root tissue mass (RAS/RT). Contrasted lines were selected and an analysis of the diversity and activity of the rhizospheric microbial communities were carried out in two experiments, one in semi-controlled conditions and one in the field.

Phenotyping experiments showed a significant genetic variability rhizospheric soil aggregation in pearl millet. Under semi-controlled conditions, the bacterial community diversity and structure was variable between millet lines and correlated with rhizosphere soil aggregation. However, on the field experimentation, this relationship has not been found. However, some specific enzymatic activities such as chitinase, acid phosphatase and beta glucosidase showed significant variability between lines and some relation with soil aggregation. Correlations between indicators of structure and activity of microbial communities and soil aggregation are not unique and other processes are likely implied in the variability of these parameters. However, our observations confirm the interest in continuing the study of genetic determinism of rhizospheric interactions in millet, and in investigating more thoroughly their agronomical impacts.

Keywords: Pearl-millet, root exudation, rhizosphere aggregation, 16S sequencing, ITS sequencing, exo-polysaccharide, microbial diversity, microbial activities, qPCR

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
Al³⁺	: Ion aluminium
ANOVA	: Analysis of Variance
ARN	: Acide ribonucléique
BET	: Bromure d'Ethidium
BR	: Biomasse racinaire
BSA	: Bovine Serum Albumine
C	: Carbone
CFU	: Colony Forming Unit
CLPP	: Community Level Physiological Profil
CMA	: Champignon Mycorhizien à Arbuscule
CO₂	: Dioxyde de carbone
DGGE	: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
EPS	: Exopolysaccharide
FDA	: Fluorescéine Di-acétate
g	: Gramme
G	: Glucose
GSPR	: Glomaline Related Soil Protein
H⁺	: Ion hydrogène
HPLC	: High Performance Liquide Chromatographie
ITS	: Internal Transcribed Spacer
JAS	: Jours après semis
L	: Litre
M	: Molaire
mg	: Milligramme
mL	: Millilitre
µL	: Microlitre
MO	: Matière organique
MSA/BR	: Ratio entre la masse de sol adhérent aux racines et la biomasse racinaire
NGS	: Next Generation Sequencing
OTU	: Operational taxonomic unit
P	: Phosphore

Pa	: Pascal
PAB	: Phénol-analine-bleu
PCoA	: Principal Coordinate Analysis
PCR	: Polymerase chain reaction
PD	: Phylogenetic Diversity
PGM	: Personal Genome Machine
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	: potentiel hydrogène
PLFA	: Phospholipid-linked Fatty Acids
QIIME	: Quantitative Insight In Microbial Ecology
qPCR	: Quantitative polymerase chain reaction
QTL	: Quantitative trait loci
RISA	: Ribosomal intergenic spacer analysis
S	: Saccharose
t	: Tonne
TGGE	: Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T-RFLP	: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisme
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
°C	: Degré Celsius
%	: Pour cent

LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES

CIRAD	: Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CNRA	: Centre National de Recherche Agronomique
DIADE	: Diversité, adaptation et développement des plantes
Eco & sols	: Ecologie fonctionnelle et biogéochimie des sols et des agro-écosystèmes
FAO	: Food and Agriculture Organization of United Nations
ICRISAT	: International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics
IESOL	: Intensification Ecologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest
IRD	: Institut de Recherche pour le Développement
ISRA	: Institut Sénégalais de Recherche Agricole
LEMIRE	: Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et des Environnements extrêmes
LMI	: Laboratoire Mixte Internationale
RDP	: Ribosomal Database Project
UMR	: Unité Mixte de Recherche

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques du sol de Bambey	34
Tableau 2: Matrice de corrélation de Pearson entre le ratio MSA/BR, la biomasse aérienne (BA), la biomasse racinaire (BR), le ratio BA/BR et l'humidité du sol des 9 lignées de mil contrastées. Les (*) indiquent les corrélations significatives ($p < 0.05$)	43
Tableau 3: Les souches de bactéries productrice d'EPS isolées dans la rhizosphère des lignées de mil.....	45
Tableau 4: Indicateurs de la diversité alpha bactérienne du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 40870 séquences a été retenue. Les (*) indiquent des différences significatives avec le sol témoin (T) en utilisant le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).....	58
Tableau 5: Résultats du blast des séquences des isolats dans les données de séquençage NGS. Dans la colonne 2, il est indiqué le nombre d'OTUs différentes qui s'alignent avec les souches de bactéries à un pourcentage de similarité minimal de 97%. Les colonnes 2 jusqu'à 10 donnent les abondances moyennes cumulées de ces OTUs dans les différents traitements. Les lettres différentes sur les lignes indiquent les différences significatives entre les traitements ($p < 0,05$ Test de Fisher). Les valeurs en gras indiquent les différences significatives avec le sol témoin (T). <i>M.</i> = <i>Microbacterium</i> ; <i>A.</i> = <i>Agrobacterium</i>	63
Tableau 6: Indicateurs de la diversité alpha fongique du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 5940 séquences a été retenue. Les lettres identiques indiquent l'absence de différence significative entre les différents traitements avec le test de Kruskal-Wallis.	65
Tableau 7: Indicateurs de la diversité alpha bactérienne du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 24839 séquences a été retenue. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les différents traitements avec le test de kruskal-Wallis ($p < 0,05$)	86
Tableau 8: Indicateurs de la diversité alpha fongique du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 15524 séquences a été retenue. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les différents traitements avec le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).	92
Tableau 9: Activités enzymatiques du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Dans chaque colonne, les lettres différentes indiquent les différences significatives entre les traitements avec le test de Kruskal-Wallis suivi de la comparaison par paire de Dunn.	100

Tableau 10: Matrice de corrélation entre les activités enzymatiques, l'activité respiratoire, la biomasse microbienne, l'azote minéral et le pH mesurés dans les échantillons de sol rhizosphérique des lignées de mil. Les Astérix (*) indiquent les corrélations significatives entre les différentes variables en utilisant le test de Spearman ($p < 0,05$) 103

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Production des 10 premiers pays producteurs de mils dans le monde en 2014..... 7
- Figure 2:** Schéma général des trois zones qui constituent la rhizosphère (Lynch 1983). 14
- Figure 3:** Criblage des 86 lignées de mil sur le ratio MSA/BR (A-G): Chaque graphe représente les résultats d'un bloc. Le graph (H) représente les résultats de la première vérification des phénotypes contrastés de 16 lignées sélectionnées. Les histogrammes représentent la moyenne de 5 répétitions. 40
- Figure 4:** Ratio MSA/BR des 9 lignées sélectionnées. Chaque histogramme représente la moyenne de 10 répétitions. Les barres d'erreurs sur les histogrammes représentent les écart-types. Les lettres différentes représentent les différences significatives entre lignées avec le test de Tukey ($p < 0,05$) 41
- Figure 5:** Humidité du sol lors de la récolte des 9 lignées sélectionnées. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écart-types. Les lettres identiques représentent l'absence de différences significatives entre les différentes lignées avec le test de Tukey ($p < 0,05$). 42
- Figure 6:** Biomasse aérienne et biomasse racinaire des 9 lignées contrastées sélectionnées. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres minuscules différentes représentent les différences significatives de la biomasse aérienne entre les différentes lignées avec le test de Tukey ($p < 0,05$)..... 42
- Figure 7:** Nombre de CFU du sol adhérent aux racines (A) et du sol non adhérent (B) des 9 lignées de mil contrastées. Le nombre de CFU est exprimé en valeur logarithmique. Pas de donnée pour L82A..... 44
- Figure 8:** Principe de la technique MicroResp™ (crédit photo : www.MicroResp.com). (A) plaque de détection montée sur une plaque à puit profonds contenant les échantillons de sol par l'intermédiaire d'un joint (en bleu). (B) Zoom individuel sur un puit..... 56
- Figure 9:** Densité de la communauté bactérienne totale dans le sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et dans le sol control (T). Chaque Histogramme représente la moyenne des 4 répétitions. Les barres représentent les écarts-types. Les différentes lettres indiquent les différences significatives entre les différents traitements. 57
- Figure 10:** Courbes de raréfaction des OTUs de bactéries des sols rhizosphériques (et du sol témoin) à 40870 séquences pour chaque échantillon : (A) pour les différents traitements (lignées à faible ratio MSA/BR en rouge et lignées à fort ratio MSA/BR en bleu ; (B) pour les sols rhizosphériques des 9 lignées de mil vs sol nu (Témoin). 59
- Figure 11:** Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions weighted UniFrac obtenu après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 9

lignées de mil et du sol témoin (T). Les lignées à faible agrégation sont représentées en carré et les lignées à forte agrégation en cercle..... 60

Figure 12: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions unweighted UniFrac obtenu après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin. Les lignées à faible agrégation sont représentées en carré et les lignées à forte agrégation en cercle..... 60

Figure 13: Abondance relative des 15 phyla bactériens les plus abondants dans le sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T). 61

Figure 14: Différences du nombre de séquences des bacillales entre le sol rhizosphérique des 9 lignées et le sol témoin (T), ns : nombre de séquences. Le caractère (*) indique la différence significative entre le sol control et le traitement L82 en utilisant le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)..... 62

Figure 15: Densité de la communauté fongique dans le sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T). Chaque Histogramme représente la moyenne des 4 répétitions. Les barres représentent les écart-types. Les lettres différentes indiquent les différences significatives entre les traitements..... 64

Figure 16: Courbes de raréfaction du nombre d'OTUs de champignons rhizosphériques (et du sol témoin) à 5940 séquences pour chaque échantillon : (A) pour les différents traitements ; (B) pour les sols rhizosphériques des 9 lignées de mil et pour le sol témoin (T)..... 66

Figure 17: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions weighted UniFrac obtenue après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 18S du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin (T)..... 67

Figure 18: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions unweighted UniFrac obtenu après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 18S du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin (T). 67

Figure 19: Abondance relative des différents phyla de champignons retrouvés dans la rhizosphère des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T) 68

Figure 20: Abondance relative des 16 classes de champignon les plus abondants retrouvées dans la rhizosphère des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T) 69

Figure 21: Activité respiratoire microbienne induite par le Glucose (gris) et par le Saccharose (noir) du sol rhizosphérique des 9 lignées et du sol témoin (T). Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres représentent les écart-types. Les lettres minuscules et majuscules différentes donnent les différences significatives entre les traitements respectivement avec le glucose et avec le saccharose..... 70

Figure 22: activité respiratoire fongique induite par le Glucose (gris) et par le Saccharose (noir) du sol rhizosphérique des 9 lignées et du sol témoin (T). Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres représentent les écart-types. Les lettres minuscules et majuscules différentes donnent les différences significatives entre les traitements respectivement avec le glucose et avec le saccharose..... 70

Figure 23: Ratio MSA/BR des 181 lignées de mil du second lot. Pour chaque lignée, la moyenne de 8 répétitions a été calculée et présentée. Le ratio MSA/BR varie de 7,44 à 25,36 ; soit un facteur de 3,4. 79

Figure 24: Phénotype MSA/BR des 13 lignées contrastées sélectionnées à l'issue du criblage. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs dans les 4 expérimentations (le criblage + les 3 manipulations de vérifications). Les barres représentent les écart-types. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les différentes lignées avec le test de Kruskal-Wallis. 79

Figure 25: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersion weighted UniFrac obtenue après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Les carrés représentent les lignées à forte agrégation, les cercles représentent les lignées à faible agrégation et les croix représentent les lignées intermédiaires..... 87

Figure 26: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions unweighted UniFrac obtenue après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Les lignées à forte agrégation sont représentées avec des carrés, les lignées à faible agrégation avec des cercles et les lignées intermédiaires avec des croix. 88

Figure 27: Abondances relatives des phyla bactériens dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin. 89

Figure 28: Abondances relatives des 20 classes de bactéries les plus abondantes dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin..... 90

Figure 29: Abondances relatives des 20 ordres de bactéries les plus abondants dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin..... 91

Figure 30: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions de Bray-Curtis obtenue après le séquençage de l'ITS fongique du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Les lignées à forte agrégation sont représentées avec des carrés, les lignées à faible agrégation avec des cercles et les lignées intermédiaires avec des croix..... 93

Figure 31: Abondances relatives des différents phyla de champignons dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin..... 94

- Figure 32:** Abondances relatives des classes de champignons dans la rhizosphère des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin. 95
- Figure 33:** Abondances relatives des 30 ordres de champignons les plus abondants dans la rhizosphère des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin 96
- Figure 34:** Biomasse microbienne du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison par paire de Dunn 97
- Figure 35:** Activité respiratoire du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de comparaison par paire de Tukey 98
- Figure 36:** pH du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de comparaison par paire de Tukey..... 98
- Figure 37:** Teneur en Azote minéral du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison par paire de Dunn 99
- Figure 38:** Teneur en glomalines dans le sol rhizosphérique des lignées de mil et dans le sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de comparaison par paire de Tukey. 99
- Figure 39:** Analyse en composante principale des différentes activités enzymatiques mesurées dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil et dans le sol témoin. (A) Projection de variables sur le plan factoriel formés par les 2 premiers axes. (B) projection des observations (11 Lignées contrastées) sur le plan factoriel formé par les 2 premiers axes..... 102

LISTE DES PLANCHES

Planche 1: Dispositif expérimental du phénotypage des lignées en "serre"	35
Planche 2: Dépotage des plantes et secouement des racines.....	36
Planche 3: Morphologie des bactéries productrices d'EPS sur le milieu TSA + saccharose ..	38
Planche 4: Essai au champ réalisé sur les 181 lignées de mil au CNRA de Bambey.	80

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Liste des 86 lignées mil du premier lot : collection de l'UMR DIADE de l'IRD ... a

Annexe 2: Liste des 181 lignées de mil du second lot : collection de l'ICRISAT..... e

Annexe 3: Corrélation entre le ratio MSA/BR et les paramètres de croissance des lignées de mil cultivées en pot.j

Annexe 4: Corrélation entre le ratio MSA/BR et les paramètres agronomiques des lignées de mil cultivées au champ k

Annexe 5: Valorisation de la thèse.....l

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I : Revue bibliographique.....	4
I.1- Généralités sur les mils	5
I.1.1- Le mil à chandelles	5
I.1.2- Importance économique et distribution géographique du mil	6
I.1.3- Le mil en Afrique sahélienne :	7
I.1.4- Les limites de la production du mil	7
I.1.5- Cycle de développement du mil :	9
I.1.5.1- Phase végétative.....	9
I.1.5.2- Phase reproductive.....	9
I.1.5.3- Phase de remplissage des graines	10
I.1.6- Diversités des mils à chandelles	10
I.1.6.1- Les formes sauvages : <i>Pennisetum glaucum ssp. violaceum</i>	10
I.1.6.2- Les formes intermédiaires : <i>Pennisetum glaucaum ssp. sieberianum</i>	10
I.1.6.3- Les formes cultivées : <i>Pennisetum glaucum ssp. glaucum</i>	11
I.1.7- Caractéristiques Morphologiques et Physiologiques des mils cultivés.	12
I.2- Généralité sur la rhizosphère des plantes.....	13
I.2.1- L'exsudation racinaire	14
I.2.1.1- Les différents types d'exsudats racinaires :	15
I.2.1.2- Le rôle de l'exsudation racinaire :	17
I.2.1.3- Les facteurs affectant l'exsudation racinaire	17
I.2.2- La communauté microbienne de la rhizosphère	19
I.2.2.1- Les techniques d'étude de la diversité microbienne des sols.....	19
I.2.2.2- Les facteurs influant sur la diversité microbienne rhizosphérique	23
I.2.2.3- Impact du microbiome rhizosphérique sur la plante hôte.....	26
I.3- La structure du sol : importance et déterminants de l'agrégation.....	27
I.3.1- les facteurs abiotiques de l'agrégation rhizosphérique	27
I.3.2- Les facteurs biotiques de l'agrégation rhizosphérique.....	27
I.3.2.1- Influences directes de la plante sur l'agrégation rhizosphérique	27
I.3.2.2- L'influence de l'activité microbienne sur l'agrégation rhizosphérique	28
Chapitre II : Effet de la variabilité génétique du mil sur l'agrégation du sol rhizosphérique : Rôle des bactéries productrices d'exo-polysaccharide	31
Introduction	32
II.1- Matériel et Méthodes.....	33
II.1.1- Les accessions de mil	33

II.1.2- Mise au point de la méthodologie de phénotypage	33
II.1.3- Echantillonnage et analyse chimique du sol de Bambey.....	34
II.1.4- Le criblage des lignées	34
II.1.5- Isolement de bactéries productrices d'EPS	36
II.1.5.1- Décompte du nombre de CFU et isolement de souches EPS	37
II.1.5.2- Identification des souches isolées.....	38
II.1.6- Analyses statistiques.....	38
II.2- Résultats	39
II.2.1- Phénotype des 86 lignées.....	39
II.2.2- Relation entre MSA/BR et les paramètres de croissance	43
II.2.3- Le nombre de CFU dans le sol rhizosphérique :	43
II.2.4- Les souches de bactéries productrices d'EPS isolées	44
II.3- Discussion	46
Conclusion:.....	48
Chapitre III : Diversité et activités microbiennes rhizosphériques de différentes lignées de mil cultivées en conditions semi contrôlées	49
Introduction :	50
III.1- Matériel et Méthodes	51
III.1.1- Matériel biologique :	51
III.1.2- Culture et échantillonnage du sol rhizosphérique :	51
III.1.3- Extraction de l'ADN du sol rhizosphérique	51
III.1.4- PCR quantitative	52
III.1.5- Analyse de la diversité microbienne par séquençage NGS	53
III.1.6- Abondance des bactéries productrices d'EPS dans le sol rhizosphérique des lignées.....	54
III.1.7- Activité respiratoire microbienne.....	55
III.1.8- Analyse statistique :	56
III.2- Résultats.....	57
III.2.1- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la communauté bactérienne.	57
III.2.1.1- La densité de la communauté bactérienne rhizosphérique.....	57
III.2.1.2- Diversité des communautés bactériennes rhizosphériques des lignées de mil.....	57
III.2.1.3- Composition taxonomique de la communauté bactérienne du sol rhizosphérique des lignées de mil.....	61
III.2.2- L'abondance des bactéries productrices d'EPS dans les données NGS.....	62
III.2.3- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la communauté fongique.....	64
III.2.3.1- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la densité fongique	64
III.2.3.2- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la diversité fongique.	64

III.2.3.3- La composition taxonomique fongique :.....	67
III.2.4- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la respiration rhizosphérique.....	69
III.3- Discussion :.....	71
III.3.1- Impact des traits génétiques du mil sur la communauté bactérienne rhizosphérique.....	71
III.3.2- Impact des traits génétiques du mil sur la communauté fongique rhizosphérique.....	73
III.3.3- Impact des traits génétiques du mil sur l'activité respiratoire induite du sol rhizosphérique.....	74
Conclusion:.....	75
Chapitre IV : Diversité et activités microbiennes rhizosphériques de différentes lignées de mil cultivées au champ.....	76
Introduction :.....	77
IV.1- Matériel et méthodes :.....	78
IV.1.1- L'expérimentation et le prélèvement des échantillons :.....	79
IV.1.2- Diversité des communautés microbiennes rhizosphériques.....	80
IV.1.3- pH et teneur en azote minéral des échantillons de sol rhizosphérique.....	81
IV.1.4- Activité respiratoire basale	81
IV.1.5- Biomasse microbienne	81
IV.1.6- Teneur en Glomalines des échantillons de sol rhizosphérique	81
IV.1.7- Les activités enzymatiques	82
IV.1.7.1- L'activité de la bêta-glucosidase.....	82
IV.1.7.2- L'activité Phosphatase acide.....	83
IV.1.7.3- L'hydrolyse de la fluorescéine di-acétate (FDA).....	83
IV.1.7.4- L'activité Uréase.....	83
IV.1.7.5- L'activité chitinase.....	84
IV.1.7.6- L'activité déshydrogénase	84
IV.1.8- Analyses Statistiques	84
IV.2- Résultats.....	86
IV.2.1- La diversité bactérienne du sol rhizosphérique des lignées de mil	86
IV.2.2- Effet de la variabilité génétique du mil sur la composition taxonomique bactérienne du sol rhizosphérique.	88
IV.2.3- Effet de la variabilité génétique du mil sur la diversité fongique rhizosphérique.....	92
IV.2.4- Effet de la variabilité génétique du mil sur la Composition taxonomique fongique.....	93
IV.2.5- Biomasse microbienne et activité respiratoire du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil :.....	97
IV.2.6- Le pH et l'azote minérale du sol rhizosphérique des lignées de mil.....	98
IV.2.7- Teneur en Glomalines du sol rhizosphérique des lignées de mil.....	99
IV.2.8- Les Activités enzymatiques dans le sol rhizosphérique des lignées de mil.....	100

IV.2.9- Relation entre l'activité microbienne, la biomasse microbienne l'azote minéral et le pH du sol rhizosphérique des lignées	103
IV.3- Discussion :	104
IV.3.1- Diversité microbienne de la rhizosphère de différentes lignées de mil :	104
IV.3.2- Biomasse et activités microbiennes rhizosphériques des différentes lignées de mil	105
IV.3.3- Relation entre la teneur en glomalines, le pH et l'agrégation rhizosphérique	108
Conclusion :	108
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	109
1. Variabilité génétique de l'agrégation rhizosphérique chez le mil : importance et utilisation potentielle en sélection variétale	110
2. Rôle des micro-organismes dans l'agrégation rhizosphérique	112
3. Les facteurs biotiques déterminants de l'agrégation du sol rhizosphérique	114
4. L'impact de l'agrégation rhizosphérique sur les performances agronomiques	116
5- Est-il possible de modeler l'exsudation racinaire des cultures pour séquestrer plus de carbone dans les sols ?	117

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale :

En Afrique sahélienne, la majeure partie de la population est rurale et vit essentiellement de l'agriculture (Vigouroux et al., 2011b) . Cette zone abrite le centre de domestication du mil (*Pennisetum glaucum* L.R.Br) qui en est l'une des céréales les plus cultivées et qui constitue la base alimentaire de 50 millions de personnes d'où son importance socio-économique. Dans le passé, le recours à l'agro-biodiversité et la domestication ont permis aux plantes cultivées de s'adapter aux besoins anthropiques tout en faisant face aux pressions environnementales comme celles liées aux changements climatiques, ou à l'émergence de pathologies végétales. En effet le premier facteur limitant pour la croissance des plantes en zone sahélienne est sans doute l'eau et particulièrement l'eau du sol, vient ensuite la disponibilité en nutriments. Le stress hydrique peut avoir des conséquences directes sur la croissance et le rendement des plantes (Radhouane, 2008) mais aussi des conséquences indirectes sur leur santé notamment par l'augmentation de la sensibilité aux bio-agresseurs : voir la revue de A. Verdugo et al (2016). Les différents types de contraintes peuvent en outre varier en intensité d'une année à l'autre. De ce fait, la diversité inter et intra-spécifique des cultures pourrait être un atout quant à l'adaptation à ces conditions variables, et les paysans d'Afrique sub-saharienne font d'ailleurs largement appel à cette diversité génétique pour maintenir une production durable et assurer leur survie. La substitution constitue une des stratégies utilisées dans l'intensification et l'adaptation dans les milieux arides. En effet, dans les zones arides des Etats Unis, le maïs est remplacé par le Sorgho (Vigouroux et al., 2011a). L'adaptation peut également être intra spécifique. Au Niger par exemple, les paysans ont aujourd'hui recours à des variétés de mil à floraison plus rapide (cycle court) pour faire face à la baisse de la pluviosité. Cette adaptation ne s'est pas faite par substitution de variétés mais par introgression dans les populations cultivées via des croisements avec des variétés locales à court cycle (Vigouroux et al., 2011b).

Dans cette logique, diverses études visant in fine la sélection de variétés de céréales sèches résistantes aux contraintes biotiques et abiotiques sont menées. Dans le cas précis du mil, certaines d'entre elles portent sur les déterminants génétiques de la date de floraison (Saïdou et al., 2009; Sehgal et al., 2015; Vigouroux et al., 2011b), de la tolérance face au déficit en phosphore (Gemenet et al., 2015) , de l'anatomie et de la croissance racinaire (Passot et al., 2016). Cependant il serait tout aussi intéressant de prendre également en compte le rôle potentiel des plantes cultivées en tant qu'acteurs contribuant à façonner l'environnement : par exemple la capacité des cultures à stocker du carbone dans le sol pourrait avoir à la fois un effet sur le maintien de la fertilité et représenter un atout pour la mitigation des changements

climatiques. Ainsi, il apparaît pertinent d'imaginer des critères de sélection intégrant des caractères qui pourraient potentiellement impacter sur la production de manière durable plutôt que de se focaliser uniquement sur l'accroissement des rendements sur le court terme.

L'humidité des sols est corrélée à leur teneur en matière organique qui elle-même influence leur capacité de rétention. La matière organique du sol est principalement issue des résidus de végétaux mais aussi des exsudats racinaires, majoritairement métabolisés par les organismes de la rhizosphère et dont une partie est transformée en exo-polysaccharides (EPS). En effet cette rhizodéposition de carbone organique qui représente environ 17% des photosynthétats (Nguyen, 2003) stimule intensément les bactéries du sol parmi lesquelles celles productrices d'EPS. La biodiversité de ces bactéries productrices d'EPS est très grande et est bien documentée dans divers types de sols (incluant les sols des régions arides) et en lien avec diverses espèces de plantes (Achouak et al., 1999; Alami et al., 2000; Amellal et al., 1998; Ashraf et al., 2004; Berg and Smalla, 2009; Guemouri-Athmani et al., 2000; Hebbar et al., 1992; Heulin et al., 2003). La contribution des EPS bactériens à l'agrégation du sol a été mise en évidence par une approche génétique en utilisant une souche mutante incapable de produire du lévane (Bezzate et al., 2000; Santaella et al., 2008). Mais également, les impacts positifs de ces bactéries sur l'agrégation du sol, sur la croissance des plantes (meilleur approvisionnement en eau et en minéraux) et sur la tolérance au stress hydrique ont été démontrés dans plusieurs situations (Alami et al., 2000; Amellal et al., 1998; Bezzate et al., 2000; Gouzou et al., 1993). En servant de substrats aux bactéries productrices d'EPS, l'exsudation racinaire contribue ainsi à la structuration (agrégation) du sol et par conséquent à son fonctionnement (dynamique de l'eau, du carbone et des nutriments). Donc on peut imaginer que sa variabilité d'une plante à l'autre puisse avoir un effet différencié sur la diversité et l'activité de ces bactéries productrices d'EPS et ainsi sur la nutrition hydro-minérale des plantes.

L'impact des traits génétiques intra-spécifiques de diverses espèces végétales sur la diversité des communautés microbiennes rhizosphériques est un sujet très discuté. En effet de nombreuses études ont mis en évidence un effet lignée (variété) sur la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques chez le maïs (Aira et al., 2010; Bouffaud et al., 2012; Peiffer et al., 2013), chez *Arabidopsis thaliana* (Micallef et al., 2009), chez *Medicago truncatula* (Zancarini et al., 2012) de même que sur les communautés fongiques (Yu et al., 2016). Par ailleurs, chez le blé et chez l'orge, il a été mis en évidence un effet génétique (effet lignée) sur l'agrégation du sol rhizosphérique (Delhaize et al., 2012; George et al., 2014). Cette

agrégation rhizosphérique était corrélée à une tolérance en Aluminium chez le blé et à une résistance face au stress hydrique et au déficit en phosphore dans le cas de l'orge.

Cependant, il n'y a pas d'étude sur les relations entre la variabilité génétique de l'allocation de carbone dans la rhizosphère, la diversité et l'activité des communautés microbiennes rhizosphériques (y compris les bactéries productrices d'EPS, champignons...) et les performances agronomiques chez les céréales. En effet, cette question du déterminisme génétique de ces paramètres et de ses implications sur les paramètres agro-écologiques devrait au préalable trouver une réponse. En effet si de telles variabilités existent chez les céréales, il serait possible de déterminer par génétique d'association les régions du génome impliquées (QTLs) avant d'envisager la possibilité d'une intégration dans les programmes de sélection.

Partant de ces diverses observations, nous avons posé l'hypothèse qu'il pourrait exister une variabilité génétique intra-spécifique de l'exsudation racinaire chez le mil et que celle-ci induirait une variabilité de la diversité des communautés microbiennes rhizosphériques ; ceci aurait un effet sur l'activité microbienne et donc influencerait sur l'agrégation du sol rhizosphérique mais également sur le cycle des nutriments et sur la physiologie de la céréale.

Ainsi ce travail a pour objectif d'évaluer l'impact des traits génétiques intra-spécifiques du mil sur les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de la rhizosphère ainsi que leurs répercussions éventuelles sur les performances agronomiques de plante elle-même. Pour ce faire une revue bibliographique sera présentée dans le premier chapitre. Il donnera quelques généralités sur le mil, les caractéristiques des relations sol-plante-micro-organismes au sein de la rhizosphère et les différentes techniques d'étude de la diversité microbienne dans les sols. Ensuite, le second chapitre sera dédié à un criblage d'une collection de 86 lignées de mil sur l'agrégation du sol rhizosphérique (un indicateur de l'intensité de l'exsudation racinaire) mais aussi à l'étude des bactéries productrices d'exo-polysaccharide cultivables dans la rhizosphère de quelques lignées contrastées. Le troisième chapitre se penchera sur l'impact des traits génétiques de la céréale cultivée en conditions semi-contrôlées sur la diversité et sur l'activité des communautés microbiennes rhizosphériques, à partir d'une étude sur quelques lignées sélectionnées. Le quatrième chapitre portera sur l'impact des caractéristiques génétiques du mil sur la diversité et sur les activités microbiennes rhizosphériques lorsqu'il est cultivé au champ. Enfin, une discussion générale des résultats sera présentée et des perspectives seront dégagées.

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1- Généralités sur les mils

Sous le terme générique mil ou millet se regroupent plusieurs graminées à petits grains qui sont des cultures vivrières des régions chaudes et sèches appartenant à la famille des graminées dont les genres principaux sont *Pennisetum*, *Setaria* et *Panicum*, (Larousse, 2002). Ce sont des céréales des régions tropicales sèches plus rustiques et moins exigeantes que le maïs et le sorgho. Il en existe plusieurs genres :

- Les mils du genre *Setaria* portent une longue panicule cylindrique, incurvée ou retombante en queue de renard. Ils sont cultivés en Extrême-Orient où ils comptent pour environ le quart des superficies cultivées. On trouve dans ce genre le mil des oiseaux (*Setaria italica*) aux grains très petits, elliptiques et aplatis, autrefois fréquent en France, ainsi que d'autres espèces d'origines géographiques diverses dont *S. germanica* ou *S. moha* (le moha), cultivé comme fourrage.
- Les mils du genre *Panicum* dans lesquels nous avons le mil commun ou mil à grappes (*Panicum miliaceum*) qui se distingue par une panicule rameuse et tombante, jadis cultivé en France.
- Les mils du genre *Pennisetum* (*P. typhoides*, *P. glaucum*) qui regroupent les mils à chandelles qui sont caractérisés par une panicule dense, longue et étroite qui évoque la forme d'une chandelle. Les grains sont petits et arrondis, ressemblant à des perles, d'où l'autre appellation anglo-saxonne de *Pearl millet*. Les mils à chandelles sont cultivés en Asie méridionale et en Afrique sub-saharienne.

I.1.1- Le mil à chandelles

Le petit mil ou millet perle (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. encore appelé *Pennisetum americanum* (L.) Leake, *Cenchrus americanus* (L.) Morrone...) est une plante annuelle monocotylédone cultivée essentiellement dans les pays d'Afrique de l'Ouest et de l'Asie. Il serait originaire de l'Afrique de l'Ouest (Tostain and Marchais, 1993). C'est une graminée très proche de Sorgho avec lequel il partage souvent le terme générique de mil. Sa classification taxonomique est la suivante : Règne : Plantae > Division : Magnoliophyta > Classe : Liliopsida > Ordre : Cyperales > Famille : Poaceae > Tribu : Paniceae > Genre : *Pennisetum* > Espèce : *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. C'est une plante annuelle sexuée diploïde ($2x=2n=14$). Les fleurs sont hermaphrodites, l'allogamie est favorisée grâce à une floraison mâle précoce et la pollinisation est essentiellement anémophile. C'est une céréale bien adaptée à la sécheresse

caractérisant sa zone de culture, faisant face au déficit hydrique par une fermeture des stomates, une diminution des surfaces foliaires et le développement du système racinaire (Tostain, 1998). Selon (Bezançon, 2004) c'est la céréale la plus résistante à la sécheresse. Elle est ainsi cultivée dans des régions où la pluviosité se situe entre 150 et 800 millimètres. Ainsi c'est une céréale courante des zones semi arides d'Afrique occidentale et des régions les plus sèches d'Afrique orientale et d'Australie ainsi que du sous-continent indien. Il a été domestiqué au Sahel il y a 4000 - 5000 ans à partir de *Pennisetum violaceum* (Lam) Rich (Brink et al., 2006). Il s'est répandu jusqu'en Afrique de l'Est et de là en Afrique australe, puis a gagné le sous-continent indien il y a environ 3000 ans. C'est par la suite qu'il a atteint l'Amérique du sud au 18^{ème} siècle et les Etats Unis au 19^{ème} siècle. Il est cultivé aussi au Brésil, aux Etats unis, en Australie et en Afrique du sud pour le fourrage mais en Afrique sahélienne et en Inde il est cultivé pour l'alimentation humaine.

I.1.2- Importance économique et distribution géographique du mil

Le mil est une céréale commune au Sahel et constitue la base alimentaire de la majorité de la population rurale. Il est la sixième céréale la plus cultivée dans le monde, après le riz, le blé, le maïs, l'orge et le sorgho (Sehgal et al., 2015). On estime que 500 millions de personnes dans le monde dépendent du mil pour leur survie (National Research Council, 1996). Il est essentiellement produit dans le monde dans deux principales zones à savoir l'Afrique sahélienne et l'Asie (Inde et Chine). En Asie, l'Inde est le plus grand producteur ensuite vient la Chine. En Afrique, les principaux producteurs sont le Nigeria, le Niger, le Mali, Burkina Faso, le Sénégal et le Soudan, l'Ethiopie, le Tchad etc. En 2014, la production mondiale était estimée à 28,4 millions de tonnes dont 52,3% produit en Asie, 43,7% produit en Afrique, 2,8% en Europe et 1,1% en Amérique (FAO, 2014). Sa production est généralement destinée à l'autoconsommation car seule une faible part de la production est écoulee dans les marchés. En effet, décortiqué et réduit en farine, il se consomme sous différents types de préparations : bouillie, couscous, galette, boisson alcoolisée en Afrique, pain non levé ou « chapatti » en Inde. Par ailleurs en Inde les graines grillées sont utilisées dans plusieurs préparations (Brink et al., 2006). En outre dans certain village en Afrique, les tiges sont souvent utilisées dans la construction des habitations et des enclos (« sakète » en wolof). Les feuilles sèches sont aussi utilisées comme fourrage pour l'alimentation du bétail.

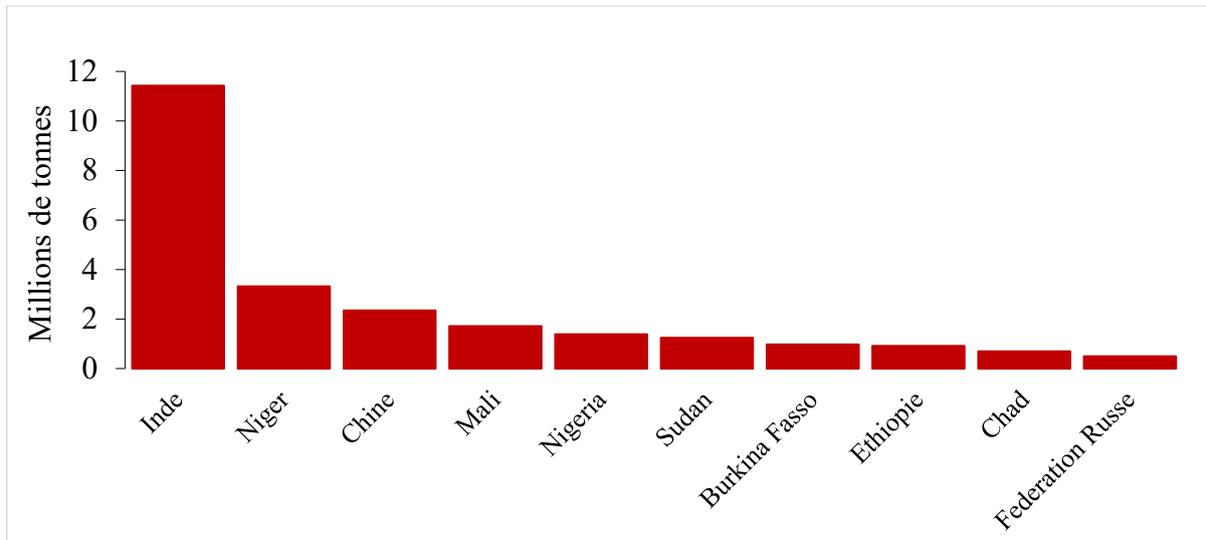


Figure 1: Production des 10 premiers pays producteurs de mils dans le monde en 2014

I.1.3- Le mil en Afrique sahélienne :

Dans le sahel, environ 50 millions de personnes dépendent du mil. Il constitue une céréale très importante pour la sécurité alimentaire des populations pauvres de cette bande soudano-sahélienne (Haussmann et al., 2012). Dans cette zone aride, le mil assure la sécurité alimentaire en apportant des calories mais aussi certains nutriments essentiels (protéines et lipides) mieux que beaucoup d'autres céréales comme le blé et le riz (Goswami et al., 1969; Sawaya et al., 1984; Sehgal et al., 2012; Stich et al., 2010). Malgré cette importance, sa production fait face à de nombreuses contraintes qui font que les rendements moyens sont inférieurs à une tonne/hectare (FAO, 2014). Ce qui est très faible si on les compare à ceux des autres céréales.

I.1.4- Les limites de la production du mil

La zone de culture du mil est caractérisée par une forte aridité avec une pluviosité annuelle qui varie entre 150 et 800 mm (Bezançon, 2004). Les sols y sont majoritairement sableux et contiennent une faible quantité de matières organiques, ce qui fait que l'eau s'infiltré très rapidement dans les horizons profonds. Ainsi, plusieurs facteurs contribuent à la faiblesse de sa productivité

Le premier facteur qui intervient est le stress hydrique dû à la variabilité du régime des précipitations. Dans le sahel, on a une saison pluvieuse qui dure entre 2 et 4 mois et une saison sèche qui dure tout le reste de l'année avec une variabilité interannuelle. Certaines simulations prédisent une augmentation de la fréquence des événements extrêmes comme les fortes pluies, les sécheresses et les inondations mais également une recrudescence de la variabilité

interannuelle des précipitations (Sultan and Gaetani, 2016). Ceci peut conduire à des déficits hydriques qui sont souvent très dommageables en début de cycle (établissement de la culture) et en fin de cycle (remplissage des graines) (Eldin, 1993). En effet, les semis se font juste après les premières pluies et il s'en suit la germination des graines. Ainsi lorsque les pluies suivantes tardent à venir, les jeunes pousses peuvent subir un stress hydrique durant plusieurs jours.

Un deuxième facteur abiotique qui limite la production du mil est la pauvreté des sols (Brück et al., 2003) dans un contexte où la culture se fait souvent sans apport d'engrais et les résidus des récoltes sont exportés des champs. Dans la plus grande partie de la zone ouest africaine, le premier élément nutritif limitant la production est le phosphore (Muehlig-Versen et al., 2003; Payne et al., 1991; Rebařka et al., 1994). Après le phosphore, l'azote constitue le second élément minéral limitant la production mais il ne compromet pas l'installation de la culture comme le font l'eau et le phosphore. Par ailleurs, il est souvent admis que le déficit en nutriments est le premier facteur limitant la production agricole car il peut accentuer l'effet du déficit hydrique. En effet, la carence en nutriments entraîne un faible développement du système racinaire et par conséquent aboutit à une réduction du volume de sol exploré pour le prélèvement de l'eau (Payne et al., 1991).

Il existe également un certain nombre de facteurs biotiques qui influent négativement sur la productivité du mil. On peut en citer :

- Les mauvaises herbes parmi lesquelles nous avons le striga (*Striga hermonthica*) qui est une plante parasite dont l'incidence est souvent accentuée par le déficit en phosphore. En effet, elle s'attache aux racines de la plante hôte et y prélève des éléments nutritifs. Cette adventice affecte environ 40% des zones de culture céréalière en Afrique subsaharienne (Kountche et al., 2013) et réduit considérablement la production.
- Les maladies d'origine fongique et pseudo-fongique comme le mildiou (causée par *Sclerospora graminicola* et *Plasmopara penniseti*), l'"explosion" (causée par *Pyricularia grisea*), le charbon (causé par *Moesziomyces penicillariae*), l'"ergot" encore appelé maladie sucrée causé par *Claviceps fusiformis* qui attaque les épillets et provoque la formation d'un exsudat sucré sur les fleurs et la rouille (causée par *Puccinia Substriata* var. *Penicillariae*);
- Les pathologies d'origine bactérienne causées par *Pseudomonas syringae* et *Xanthomonas campestris* pv. *Pennamericanum*.
- L'attaque des insectes nuisibles comme les mineurs des épis et les foreurs des tiges.

I.1.5- Cycle de développement du mil :

Le cycle de développement du mil comprends trois phases selon Maiti and Bidinger (1981) : la phase végétative qui va de la germination à l'initiation paniculaire, la phase reproductive qui va de l'initiation florale à la floraison et la phase de fructification qui va du remplissage des graines à la fin du cycle. Les durées relatives de ces trois différentes phases peuvent dépendre de la variété mais généralement, elles sont plus ou moins égales pour une même variété.

I.1.5.1- Phase végétative

Cette phase peut aller jusqu'à 50 jours après semis (JAS). Elle débute par l'émergence de la plantule et se poursuit jusqu'à l'initiation de la panicule. La germination du mil est hypogée et se produit environ 48 heures après le semis si les conditions sont favorables. La levée a lieu avec l'apparition de la première feuille, 4 à 5 JAS. A la fin de la levée, les bourgeons de toutes les feuilles apparaissent et chez les variétés précoces, 6 à 7 feuilles sont déjà développées (Maiti et Bidinger, 1981). La plantule développe son système racinaire primaire et forme de nombreuses racines adventives encore appelées racines coronaires.

Le tallage débute environ 15 jours après la levée et se poursuit durant 10 à 20 jours chez les variétés précoces et est généralement plus long chez les variétés semi-tardives et tardives. Généralement les talles produits tardivement ne forment pas d'épis ; Et même s'ils en donnent, ceux-ci parviennent rarement à la maturité. Pendant la phase active du tallage, la taille de la plante reste réduite (plante en rosette) car l'allongement des entre-nœuds n'est pas encore entamé. Durant toute la phase végétative, l'accumulation de biomasse concerne essentiellement les feuilles et les racines. L'initiation de la panicule est marquée par l'élongation du dôme apical et permet l'entrée dans la phase suivante.

I.1.5.2- Phase reproductive

La phase reproductive s'observe souvent entre le 50^{em} et le 75^{em} JAS. Elle commence avec l'initiation paniculaire et marque souvent le début de la montaison, c'est-à-dire l'allongement des entre-nœuds des tiges à partir de la base. Les talles entament la montaison de la même manière que la tige principale, mais avec un certain décalage dans le temps. Pendant la phase reproductive, l'accumulation de la biomasse concerne les tiges et les panicules, en plus des racines et des feuilles. La panicule développe des épillets sur lesquels émergent des fleurs mâles et femelles. La floraison a lieu deux à trois jours après l'apparition effective de la panicule. Les

fleurs femelles s'épanouissent avant les mâles et leur apparition se fait progressivement du sommet de la panicule à la base. Cinq à six jours plus tard, la floraison et la fécondation de la panicule sont terminées (Maiti and Bidinger, 1981).

I.1.5.3- Phase de remplissage des graines

Cette phase commence après la fécondation des fleurs de l'inflorescence principale, à partir du 75^{ème} JAS chez les variétés précoces et semi-tardives. Elle peut intervenir avant cette date chez les variétés ultra précoces et se poursuit jusqu'à la maturité totale des épis (épis de la tige principale et des talles). Pendant cette phase, l'accumulation de biomasse concerne surtout les caryopses ainsi que les feuilles et les tiges des talles susceptibles de produire des épis. L'accumulation de la biomasse des grains (remplissage des grains) se fait souvent au détriment des feuilles plus âgées et des jeunes talles non productives qui se dessèchent par sénescence. La sénescence des feuilles se poursuit jusqu'aux 2 ou 3 dernières feuilles, vers le sommet de la tige. Les grains traversent une phase laiteuse, une phase cireuse ou vitreuse avant de parvenir à la maturité physiologique, environ 20 à 25 jours après la floraison selon les variétés (Maiti et Bidinger, 1981).

I.1.6- Diversités des mils à chandelles

Les mils à chandelles font partie d'un complexe de 3 taxons qui se croisent librement. Ces 3 taxons sont considérés par certains auteurs comme des sous espèces de *Pennisetum glaucum* (Brink et al., 2006). D'après ces auteurs, il est pertinent, à l'état actuel des connaissances sur la diversité génétique du mil, de distinguer les 3 formes suivantes :

I.1.6.1- Les formes sauvages : *Pennisetum glaucum* ssp. *violaceum*

Il s'agit des types sauvages de morphologie variable, aux involucre caducs et sessiles, qui ne contiennent jamais plus d'un épillet. Ces formes sont répandus du sahel d'Afrique occidentale jusqu'en Erythrée dans des milieux très secs souvent non cultivés (Brink et al., 2006).

I.1.6.2- Les formes intermédiaires : *Pennisetum glaucum* ssp. *sieberianum*

Ce sont les types adventices résultant d'introgression entre *Pennisetum glaucum* ssp *glaucum*, la forme cultivée et *Pennisetum glaucum* ssp *violaceum*, la forme sauvage (Brink et al., 2006). Selon (Clément et al., 1993), dans les champs de mil cultivés il existe des plantes appartenant à ce groupe qui tout en mimant le phénotype cultivé, expriment certaines caractéristiques des

formes sauvages : petites graines enfermées dans des glumelles, tiges fines, ramifications nombreuses, feuilles étroites, épillets caducs à maturité etc.

I.1.6.3- Les formes cultivées : *Pennisetum glaucum* ssp. *glaucum*

Les formes cultivées sont à involucre stipités et persistants ; les inflorescences sont nettement denses et non égrenantes. La caractéristique principale de cette forme réside dans le fait que les graines ne tombent pas spontanément dès que l'épi arrive à maturité : cette non-caducité est le résultat de la domestication effectuée par les premiers agriculteurs (Tostain, 1998). D'après les études de Clément et al (1993), en Afrique de l'Ouest, on peut noter une grande diversité de formes et de comportements, moins marquée dans la zone sud de la culture que dans les régions traditionnellement grosses productrices. Le comportement photopériodique est d'une grande influence sur le choix du lieu d'implantation des cultivars. Si d'une façon générale la diminution de la pluviométrie dans la zone de culture des mils entraîne une perte de certaines variétés traditionnelles, le bilan des collectes de 1975-1990 effectué par les mêmes auteurs montre que les variétés semi tardives et tardives restent encore les plus nombreuses, même si de toute évidence les formes précoces prédominent dans la zone climatique typiquement sahélienne. Sans entrer dans le détail de la dénomination des variétés, ces auteurs avaient néanmoins cité quelques exemples de cultivars les plus connus et les plus répandus. Au Sénégal, ont été distingués deux grands groupes sur la base de la longueur des cycles : les **Sounas**, formes précoces qui peuvent être utilisés pour les périodes de soudure (80-100 jours du semis à la récolte) et les **Sanios** qui regroupent les formes tardives (130-150 jours). Mais aussi on trouve également un troisième groupe de variétés appelé **Tiotandés** qui sont cultivés sur les terres du lit du fleuve Sénégal (culture de décrue) et qui ont tendance à disparaître. **Au Mali** où la diversité variétale est très importante on retrouve également les *sounas* et les *sanios* mais dans ce groupe des *sanios*, certaines variétés peuvent présenter des cycles très longs (supérieurs à 150 jours). **Au Burkina Faso** se situe le centre de l'aire de culture des mils en Afrique de l'Ouest. En grande majorité les mils burkinabés sont semi tardifs ou tardifs. Cependant dans ce pays, des ethnies différentes peuvent donner des noms différents à un même cultivar, d'où certaines confusions possibles. Malgré cela on retiendra les appellations suivantes : *le Hani* (en songhaï) qui est une variété précoce du nord, le *Kazouya* (en Mossi), variété semi tardive du centre et le *Doufoua* (en bobo), variété tardive de l'ouest. **Au Niger**, on distingue d'Est en Ouest de grands types de cultures qui peuvent se superposer, caractérisés principalement par la variété *Boudouma* (50-60 jours) et au centre par la variété *Zongo* (110 jours).

Par ailleurs, une autre classification des mils cultivés définit quatre groupes de cultivars (décrits au départ comme des races) chez le *Pennisetum glaucum* selon la morphologie du grain et selon leur répartition géographique (Brink et al., 2006):

- Le groupe Typhoïdes ; graine ovoïde, à section circulaire, inflorescence cylindrique ou elliptique, généralement de moins de 0,5 m de long : C'est le groupe le plus primitif, le plus variable et à la répartition la plus vaste. Il est présent dans toute l'aire du mil en Afrique et en Inde, c'est probablement l'ancêtre des autres groupes.
- Le groupe Globosum : Grain globuleux, de plus de 2,5 mm de diamètre, inflorescences cylindriques, dépassant souvent 1 m ; très répandu dans le Sahel à l'ouest du Nigeria.
- Groupe Leonis : grain à contour oblancéolé, à section circulaire, apex aigu, inflorescence cylindrique. Il s'agit du groupe dont l'aire est la plus restreinte, cultivé en Mauritanie, au Sénégal et au Sierra Léone.
- Groupe Nigritarium : Grain obovoïde mais à section anguleuse, inflorescence cylindrique ; très répandu dans les régions semi-arides du Nigéria au Soudan.

I.1.7- Caractéristiques Morphologiques et Physiologiques des mils cultivés

La hauteur des plants de mil varie entre 0,5 et 3 mètres à maturité. Dans les zones humides, elle peut atteindre 4 mètres. La tige présente plusieurs talles mais celles-ci sont moins nombreuses que chez les parents sauvages. Les feuilles sont en forme de lance (feuille lancéolée) dont la longueur varie entre 20 et 100 cm et les largeurs varient entre 5 à 50 millimètres. Les graines sont fixées sur l'épi souvent appelé panicule qui mesure entre 10 et 100 cm de long. La taille de ses graines est souvent très variable (entre 2 et 5 mm) (Brunken et al., 1977). Les graines montrent une diversité de forme qui va de la forme globulaire à celle lancéolée avec des poids qui varient entre 5 et 20 mg (Andrews and Kumar, 1992).

Le mil cultivé est la céréale la plus résistante à la sécheresse (Bezançon, 2004). Cette caractéristique vient certainement en partie du fait qu'il possède un système racinaire bien développé qui peut aller jusqu'à 2 m en profondeur chez certaines variétés. Ainsi plusieurs études se sont penchées sur la dynamique du système racinaire au cours de sa croissance et notamment sur sa réaction face aux déficits hydriques précoce et tardif. Ainsi il a été démontré chez plusieurs cultivars que le stress hydrique précoce ou tardif stimule l'avancement du front racinaire visant la colonisation des horizon plus humides (Daouda Ousmane et al., 1993). Par

ailleurs, ces mêmes auteurs ont mis en évidence deux types d'enracinement en fonction des accessions : un enracinement profond qui colonise le sol en profondeur quelles que soient les conditions hydriques, et un enracinement superficiel mais capable de s'étendre en profondeur au cours de l'installation d'un déficit hydrique. D'autres études plus récentes ont également identifié 3 types de racines latérales qui diffèrent par leur diamètre mais aussi par la présence de vaisseau conducteur central ou métaxylème (Passot et al., 2016). En outre, dans les phases précoces du développement ces mêmes auteurs ont mis en évidence une colonisation très rapide des horizons profonds du sol. Ainsi les racines pouvaient atteindre plus de 60 cm, 11 jours seulement après la germination. Une variabilité génétique de ces traits morpho-anatomiques a été également mise en évidence par ces auteurs sur une collection de 16 lignées de mil. Ceci constitue ainsi un potentiel très intéressant pour l'amélioration variétale.

I.2- Généralité sur la rhizosphère des plantes

Le sol constitue pour les plantes un support et une source de nourriture (eau et éléments minéraux). Ces éléments transitent du sol vers la plante via une interface appelée la rhizosphère. Cette dernière a été définie par (Hiltner, 1904) comme étant la région du sol autour des racines des légumineuses et qui abrite une intense activité microbienne. Dans cette zone, il se produit des processus biologiques et écologiques très complexes liés aux interactions entre la racine, le sol et les micro-organismes. Par la suite, cette définition a été étendue à la proportion du sol susceptible de subir les modifications mécaniques, physico-chimiques et biologiques dues à la croissance et à la respiration de la plante, à la rhizodéposition, aux échanges d'ions, au prélèvement d'eau et de nutriments, et qui subit aussi l'influence des micro-organismes qui y vivent (Darrah, 1993). Cependant, certains auteurs la définissent de manière plus précise en la subdivisant en plusieurs zones. Ainsi il existe trois zones distinctes dans la rhizosphère selon Morgan et al (2005), Nihorimbere et al (2011): la rhizosphère au sens strict (sol à proximité des racines), le rhizoplan correspondant à la surface de la racine y compris les particules fortement adhérent à la racine, et la racine elle-même qui abrite des micro-organismes endophytiques.

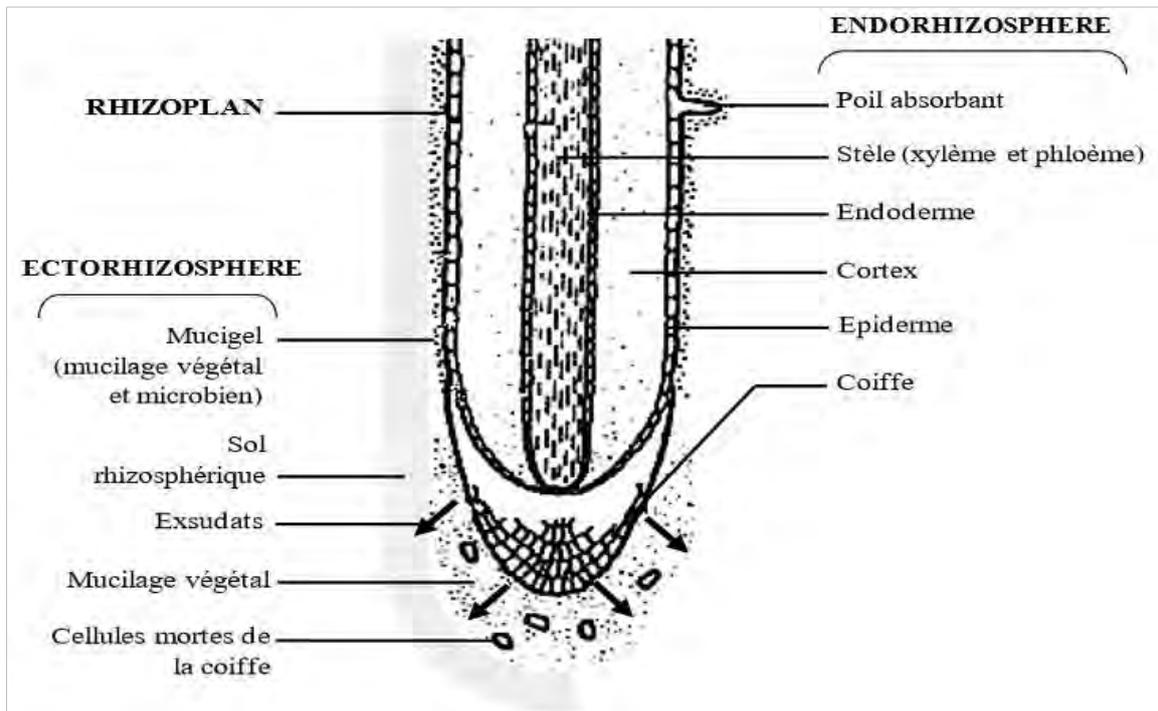


Figure 2 : Schéma général des trois zones qui constituent la rhizosphère (Lynch 1983).

Les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de cette rhizosphère sont très importantes pour la croissance de la plante du fait qu'elle constitue un pont qui assure les transferts de matière et d'énergie entre la plante et son milieu (Czarnes et al., 2000). L'une des principales caractéristiques de cette rhizosphère est qu'elle est le siège de l'exsudation racinaire de matières organiques qui est à la base de nombreux processus complexes qui s'y déroulent.

I.2.1- L'exsudation racinaire

Durant la photosynthèse, il se produit une transformation du CO_2 en glucides, dont les formes finales sont généralement de l'amidon et/ou du saccharose et plus rarement des sucres simples tels que le glucose et le fructose (Heller et al., 1993). Ces glucides vont constituer des réserves temporaires puis une partie servira de matière de base pour la production de molécules plus complexes (protides, lipides, acides aminés, acides organiques, ...) permettant à la plante de synthétiser sa biomasse aérienne et racinaire. La partie restante sera stockée dans les racines sous forme de réserves (Heller et al., 1993). Cependant, une fraction des photosynthétats, estimée en moyenne à 17 % du C net fixé par la photosynthèse, n'est pas utilisée par la plante pour sa croissance mais va être acheminée jusqu'aux racines et libérée dans le sol : c'est ce qu'on appelle exsudation racinaire (Nguyen, 2003). Ainsi cette exsudation fait référence à la libération de composés organiques par les racines des plantes vivantes dans le sol environnant.

Les racines libèrent des composés à travers plusieurs mécanismes et les taux d'exsudation peuvent varier considérablement selon les espèces et les conditions environnementales (Kochian et al., 2005). D'après Nguyen (2003), c'est un processus écologique majeur qui fait l'objet de nombreuses interrogations du fait qu'elle représente une entrée de matière organique dans le sol qui constitue le deuxième réservoir de carbone avec $1,5 \cdot 10^{12}$ t C juste après les océans avec $3,8 \cdot 10^{13}$ t C. La quantité annuelle de carbone qui retourne dans l'atmosphère via la respiration du sol est estimée à $7,5 \times 10^{10}$ tonnes. Ainsi dans le contexte actuel de l'augmentation du taux de CO₂ dans l'atmosphère, le processus de rhizodéposition est d'une importance particulière dans la perspective de séquestration de carbone dans le sol. Mais son intérêt réside aussi dans le fait qu'elle représente une perte d'énergie pour la plante. Ainsi à première vue, la libération de composés organiques de racines dans le sol pourrait être perçue comme une perte de carbone réduit au détriment de la production de biomasse. Toutefois, il est bien établi que ces rhizodépôts stimulent l'activité microbienne dans la rhizosphère entraînant ainsi diverses effets positifs sur les plantes comme l'augmentation de la disponibilité des nutriments, la croissance, la réduction de la susceptibilité face aux pathogènes, la résistance aux métaux lourds et la dégradation des germes xénobiotiques (Barea et al., 2005). Cependant, aucune étude ne s'est encore penchée sur l'efficacité réelle de la rhizodéposition pour les plantes en faisant le bilan entre les pertes en carbone et les gains de croissance liés à la stimulation de l'activité microbienne. Les rhizodépôts sont composés des exsudats racinaires issus des photosynthétats (sucres, acides organiques, acides aminés, hormones, vitamines), de sécrétions de mucilage (sucres polymérisés, enzymes) et de cellules sénescents (cellules de la coiffe racinaire, cellules corticales et épidermiques). Mais aussi à ces diverses substances s'ajoutent les débris racinaires qui restent dans le sol à la mort de la plante (Lynch and Whipps, 1990; Nguyen, 2003).

I.2.1.1- Les différents types d'exsudats racinaires

Ces composés libérés par les racines peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur mode d'utilisation par les micro-organismes. En effet, on distingue les composés organiques de faibles masses moléculaires (tels que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les composés phénoliques et divers autres métabolites secondaires) qui peuvent être facilement assimilés par des micro-organismes du sol et les exsudats organiques de fortes masses moléculaires (tels que les protéines, les pigments, les mucilages et diverses autres substances) qui nécessitent une activité enzymatique extracellulaire pour les décomposer avant leur assimilation (Meharg, 1994). En plus, des composés inorganiques (ions inorganiques, H⁺, eau et électrons) sont également libérés par les racines des plantes dans la rhizosphère (Bertin et al.,

2003). Les composés organiques de faible poids moléculaire représentent la majorité des composés exsudés par les racines des plantes (Bais et al., 2006; Bertin et al., 2003). Les acides organiques sont encore appelés anions organiques puisqu'ils sont partiellement ou complètement dissociés dans la plupart des conditions du sol (Jones et al., 2003). En fonction de leur mode de libération dans le sol, Nguyen (2003) distingue 4 catégories de rhizodépôts:

- Les cellules de la coiffe racinaire : les méristèmes apicaux des racines sont couverts par des cellules disposées en couches formant la coiffe. Une partie ou la totalité de cette coiffe peut être perdue en cas d'attaque de pathogène ou bien même spontanément comme cela a été observé chez le maïs cultivé au champ (Brigham et al., 1995).
- Les sécrétions de mucilage : Une couche mucilagineuse a été observée fréquemment sur la surface de nombreuse racines de plantes (Oades, 1978) et plus particulièrement au niveau de la zone apicale où elle forme de petites gouttelettes en présence d'eau. Ce mucilage est composé de protéines et de différents sucres polymérisés dont les principaux identifiés sont l'arabinose, le galactose, le fructose, le glucose et le xylose (Bacic et al., 1987). Pour la plupart des plantes examinées, le mucilage est sécrété par les cellules de la couche externe de la coiffe (Paul and Jones, 1975).
- Les cellules épidermiques sénescents : Juste derrière la coiffe, certaines cellules épidermiques se différencient en poils absorbants ou trichoblastes (qui forment le chevelu racinaire), impliqués dans l'encrage au sol, la nutrition en eau et en minéraux et également dans les symbioses avec les micro-organismes (Peterson and Farquhar, 1996). La durée de vie de ces cellules a été estimée entre 2 et 3 semaines chez le blé l'orge et le maïs (Fusseder, 1987; Holden, 1975) et ainsi, elles entrent de façon continue dans le pool de carbone du sol.
- L'exsudation *sensu stricto* : Elle est constituée des molécules de faible masse moléculaire diffusant de manière passive des cellules vivantes de la racine vers la solution du sol (Rovira et al, 1979). Les principales molécules libérées de manière passive à partir des racines sont les sucres, les acides aminés et les acides organiques. Généralement ces substances sont 3 fois plus concentrées dans le cytoplasme que dans le sol (Neumann et al, 2000). Il existe également une variabilité de l'intensité de cette exsudation le long de la racine. Ceci est dû à l'existence d'un gradient faisant que ces diverses substances (sucres et acides aminés) sont beaucoup plus abondantes du côté de l'apex racinaire qu'au niveau de la partie basale (Jones, 1998).

I.2.1.2- Le rôle de l'exsudation racinaire

L'exsudation racinaire représente un coût important en carbone pour la plante. De ce fait, il est tout à fait concevable qu'elle ait des fonctions importantes dans la régulation de la croissance de la plante en agissant directement et/ou indirectement. Certains exsudats racinaires comme les phytoalexines peuvent être secrétés dans le sol dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes et peuvent stimuler ou inhiber les interactions avec d'autres organismes du sol (Bais et al., 2004; Bertin et al., 2003; Rengel, 2002). Les composés carbonés rapidement assimilables (composés de faibles poids moléculaires tels que les sucres et les acides organiques) constituent des sources de carbone pour les micro-organismes du sol et stimulent leur croissance et leurs activités (Lynch and Whipps, 1990). En outre, ces exsudats peuvent agir comme un stimulus pour la dégradation de la matière organique intrinsèque du sol (Dormaar, 1990). Certains composés comme les malates interviennent dans la chélation des cations qui peuvent être phyto-toxiques pour les plantes (Exemple Al^{3+}) (Delhaize et al., 1993; Rengel, 2002; Ryan et al., 2001). D'autres composés peuvent intervenir dans la mise à disponibilité des micronutriments comme le fer, le manganèse, le cuivre et le zinc en agissant également comme des chélateurs (Dakora and Phillips, 2002). Par ailleurs, les exsudats racinaires jouent un rôle important dans les interactions plante-plante. En effet, ces interactions peuvent être positives comme négatives (allélopathie). Dans le premier cas, on peut citer l'induction de la défense des plantes par sécrétion d'exsudats racinaire (agissant comme signal) par une autre plante voisine (Bais et al., 2006). Quant au phénomène d'allélopathie, elle peut se produire par l'intermédiaire de différentes phytotoxines qui peuvent affecter la production de métabolites, la photosynthèse, la respiration, le transport membranaire, la germination, la croissance racinaire la lyse cellulaire chez les plantes sensibles (Einhellig, 1994; Weir et al., 2004).

I.2.1.3- Les facteurs affectant l'exsudation racinaire

Le carbone alloué au compartiment souterrain est partagé entre 3 pools : un premier est destiné à former les tissus racinaires, un deuxième est utilisé par la respiration rhizosphérique (respiration racinaire + respiration des rhizobactéries) et le troisième constitue les résidus qui entrent dans la matière organique du sol. Les facteurs affectant l'exsudation de carbone dans le sol sont nombreux. De manière globale, tous les facteurs agissant sur l'écophysiologie de la plante sont à prendre en compte.

- Un des facteurs les plus importants qui intervient dans ce mécanisme est l'âge de la plante. D'après Nguyen (2003) l'exsudation est intense au stade jeune plante et décroît ensuite au

fur et à mesure du développement de la plante. Ainsi, au cours de la croissance, la réduction de l'allocation du carbone (issu de la photosynthèse) au sol, estimée par traçage au ^{14}C , peut aller jusqu'à -43% entre plantes âgées et jeunes plantes.

- Ensuite les micro-organismes du sol peuvent moduler cette allocation de carbone des plantes vers le sol (Nguyen, 2003). En effet, la part du carbone provenant de la photosynthèse sous atmosphère enrichie en $^{14}\text{CO}_2$ radioactif augmente de 249% dans la respiration rhizosphérique des plantes qui poussent dans un sol non stérile (avec des micro-organismes), comparée à celle des plantes qui poussent sur un sol stérile. Quant au carbone entrant dans les résidus de matières organiques du sol, il augmente de 37 %. Ceci est compréhensible dans la mesure où certains micro-organismes tels que les champignons peuvent établir des symbioses avec les racines et développant du coup des réseaux d'hyphes qui ont un coût en carbone pour la plante.
- En outre, les caractéristiques génétiques de la plante peuvent modifier la quantité et/ou la qualité des exsudats racinaires. Cela a été démontré chez *Arabidopsis thaliana* par la technique HPLC (High Performance Liquide Chromatographie). En effet, Micallef et al (2009) ont mis en évidence différents profils d'exsudats racinaires à partir de 8 accessions de la plante modèle. De même, chez le riz et chez le sorgho, une variabilité génétique des profils de l'exsudation racinaire a été démontrée sur plusieurs accessions (Aulakh et al., 2001; Czarnota et al., 2003).
- Par ailleurs, il a été rapporté l'effet de divers autres facteurs environnementaux sur cette exsudation racinaire. On peut citer entre autres : la texture du sol, le pH, la teneur en Azote, le taux de CO_2 dans l'atmosphère etc... (Neumann et al., 2014; Nguyen, 2003).

En somme plusieurs déterminants peuvent agir sur la qualité ou bien la quantité des substances carbonées transférées de la plante vers le compartiment souterrain. Dans la mesure où une grande part des micro-organismes du sol tel que les bactéries sont hétérotrophes pour le carbone, ce pool de carbone organique représente un gain énorme qui fait que cette zone est une niche écologique privilégiée. Ainsi, toute modification de ce flux pourrait avoir des répercussions sur la diversité, la structure ou l'activité de ces populations microbiennes.

I.2.2- La communauté microbienne de la rhizosphère

La rhizosphère est une zone de choix pour les bactéries et champignons du sol. En effets ces micro-organismes y sont plus abondants que dans les parties du sol non explorées par les racines (Kielak et al., 2008). En effet, son étude s'est beaucoup développée ces dernières décennies avec la mise au point de techniques de plus en plus pointues et résolutive permettant de caractériser sa diversité microbienne et de déterminer ainsi sa réponse face à différents types de facteurs. Ainsi dans cette rhizosphère ces micro-organismes sont influencés par des facteurs biotiques (essentiellement en connexion avec l'exsudation racinaire des plantes) et des facteurs abiotiques (les propriétés physico-chimiques du sol) qui constituent les principales sources de variabilité de la structure et de la diversité des communautés microbiennes.

I.2.2.1- Les techniques d'étude de la diversité microbienne des sols

I.2.2.1.1- Les méthodes culture-dépendantes

- Les comptages sur boîte : Ces méthodes d'étude des communautés microbiennes se basent essentiellement sur le décompte du nombre de colonie (CFU) sur boîte de Pétri ou bien le « Most Probable Number » (Bakken, 1997; Brimecombe et al., 2001; Johnsen et al., 2001). Elles ont permis de suivre les modifications de l'abondance de groupes taxonomiques ou fonctionnels en utilisant différents milieux gélosés (Vandamme et al., 1996). Avec ces techniques, il a été montré que les sols amendés avec des exsudats artificiels (glucose, fructose, sucrose, acide citrique, acide lactique, alanine...) avaient une densité microbienne plus importante que les sols non amendés (Baudoin et al., 2003). L'avantage de ces techniques réside dans le fait que les bactéries ou champignons isolés et caractérisés pourront être utilisés en application pour résoudre des problèmes d'ordre agronomique ou médical. C'est le cas des bactéries dites PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria). Cependant, il est estimé que ces techniques d'étude directes culture-dépendantes ne pouvaient détecter qu'entre 1 et 10% des micro-organismes vivant dans le sol (Torsvik et al., 1996). Cela est dû au fait que ces cultures se font dans des milieux très différents de l'environnement naturel des micro-organismes, au fait que certains d'entre eux ne peuvent être cultivés que dans des conditions physiologiques bien définies, mais aussi à l'interdépendance de certains micro-organismes (Bakken, 1997; Muyzer and Smalla, 1998), ce qui constitue leur limite.
- Par ailleurs, il existe aussi des méthodes de comptage utilisant la microscopie à fluorescence. Celles-ci peuvent donner des nombres 100 à 1000 fois supérieurs à ceux

trouvés par le comptage direct sur boîte (Johnsen et al., 2001). Plusieurs colorants spécifiques aux protéines ou aux acides nucléiques sont utilisés ; ils comprennent l'isothiocyanate de fluorescéine, l'acridine orange, le bromure d'éthidium (BET) et le chélate d'euporium qui donnent des motifs fluorescents différentiels pour les bactéries (Nannipieri et al., 2003). Le phénol-aniline-bleu (PAB) a été utilisé pour marquer les hyphes dans les films d'agar et sur les filtres à membrane, alors que les hyphes métaboliquement actifs ont été comptés après leur coloration avec du diacétate fluorescent (FDA) (Bloem et al., 1995). Cependant, cette procédure ne permet pas de compter spécifiquement des espèces microbiennes, et certaines des colorations utilisées ne font pas de discrimination entre les cellules microbiennes vivantes et mortes.

- Analyse de profils cataboliques par CLPP (Community level physiological profil) : Cette méthode est basée sur l'analyse des profils d'utilisation de différents substrats par la communauté microbienne d'un échantillon de sol a été développée par Garland et Mills (1991). Cette technique utilise des microplaques qui contiennent jusqu'à 95 sources de carbone différentes contenues dans les puits de la plaque. Les échantillons de sol sont mis dans ces puits et ces substrats seront dégradés par les micro-organismes. A titre d'exemple, on a la plaque commerciale Biolog™ (*Biolog Inc. Hayward Cal. USA*) qui contient 95 sources de carbone différentes et un colorant au tétrazolium qui permet de doser leur utilisation par dosage au spectrophotomètre à 595 nm. Ainsi, le profil d'utilisation de ces substrats donne des informations sur la diversité potentielle des fonctions microbiennes d'un échantillon à travers le calcul d'indices de diversité tel que celui de Shannon (Lynch et al., 2004).

1.2.2.1.2- L'analyse des acides gras des phospholipides membranaires : PLFA

L'analyse des PLFA (Phospholipid-linked fatty acids) est basée sur l'extraction, le fractionnement, la méthylation et le dosage chromatographique des phospholipides des cellules microbiennes permettant d'avoir des informations globales sur les modifications de la structure des communautés microbiennes (Lynch et al., 2004). En effet les changements dans les profils de phospholipides sont généralement liés à la variation de l'abondance des groupes microbiens et peuvent être interprétés en référence à une base de données de cultures pures et de voies de biosynthèse connues (Zelles, 1999). Ainsi, cette technique est capable de déceler les modifications de la composition microbienne (abondance relative des gram-positifs et des gram-négatifs) susceptibles d'avoir lieu par exemple entre sol non rhizosphérique et sol rhizosphérique (Johansen and Olsson, 2005). Cependant cette méthode ne peut déceler que les

modifications globales de la structure des communautés microbiennes et donc ne peut pas nous indiquer de manière précise les genres, familles et espèces qui sont impactés (Zelles, 1999).

1.2.2.1.3- Les méthodes moléculaires basées sur l'extraction d'ADN du sol

Ces méthodes impliquent une extraction directe ou indirecte des acides nucléiques à partir du sol et donnent des informations sur les familles, les genres ou même les espèces microbiennes en fonction de leur résolution. Ils comprennent globalement :

❖ Les méthodes de faible résolution

Elles sont basées essentiellement sur la distribution des bases azotées (pourcentage de G-C) de l'ADN et des pourcentages d'hybridation (à 25° C en dessous de leur point de fusion) des brins d'ADN séparés par la chaleur (Torsvik et al., 1996).

❖ Les méthodes intermédiaires

Ce sont des méthodes d'empreintes génétiques qui permettent l'analyse de plusieurs échantillons rendant ainsi possible la caractérisation des variations spatio-temporelles de la composition de la microflore du sol (Muyzer and Smalla, 1998). Parmi ces méthodes, on peut en citer la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) qui en sont les plus utilisées dans l'étude des interactions rhizosphériques (Nannipieri et al., 2007). Elles sont basées sur les différences de séquences des régions conservées des gènes codant pour les ARNs ribosomiques. Ces gènes sont amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques et les amplicons sont séparés dans des gels donnant ainsi des profils variables en fonction des caractéristiques de l'ADN amplifié (Johnsen et al., 2001; Lynch et al., 2004). En effet, La mobilité électrophorétique des fragments d'ADN (obtenus après amplification par PCR) dans des gels polyacrylamide avec un gradient de dénaturation linéaire (due à des produits chimiques : DGGE ou à une augmentation de la température : TGGE) dépend de la composition de base de l'ADN (Heuer et al., 2001; Muyzer and Smalla, 1998). Ces techniques permettent de différencier deux molécules qui ne diffèrent que d'une seule base. En plus de la simplicité et de la rapidité, un autre avantage de la DGGE ou de la TGGE est que l'identité des bandes peut être étudiée par hybridation avec des sondes spécifiques ou par extraction et séquençage (Muyzer and Smalla, 1998). Cependant mis à part les biais liés à la PCR (contamination, la production de chimères, les multiples couples d'amorces utilisées...) la DGGE et la TGGE présentent un certain nombre de limites : (i) Seules les populations dominantes sont révélées (>1%) ; (ii) Les séquences de plusieurs espèces

peuvent être cachées derrière une seule bande, ce qui entraîne une sous-estimation de la diversité bactérienne (Heuer et al., 2001) ; (iii) la même espèce peut être représentée par plusieurs bandes si elle possède plusieurs copies de l'opéron dans son génome (Heuer et al., 2001).

❖ Les méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS)

Ces méthodes se basent également sur l'utilisation de marqueurs moléculaires tels que le gène 16S codant les ARN ribosomiques (Flanagan et al., 2007; Sogin et al., 2006) et l'espaceur interne transcrit de l'ADN ribosomique fongique (ITS) (Nilsson et al., 2008). La grande innovation de ces techniques de séquençage par rapport au séquençage Sanger (Sanger et al., 1977) réside dans le fait qu'elles permettent de lire en parallèle des séquences d'ADN de milliers d'espèces différentes provenant d'un ou de plusieurs échantillons environnementaux (Shokralla et al., 2012). Ainsi, en comparant les séquences obtenues à des séquences de référence déposées dans des banques de séquences, les taxons présents dans un échantillon environnemental peuvent être identifiés avec une grande précision. Des méthodes de calcul avancées ont permis d'inférer des mesures de biodiversité dans le temps et l'espace en annotant et en regroupant des séquences d'ADN par l'usage d'une combinaison de techniques d'affiliation et de techniques phylogénétiques (Hajibabaei et al., 2011). L'explosion récente du nombre d'études utilisant des plates-formes NGS démontre un changement de paradigme dans la recherche écologique vers l'utilisation de volumes élevés de données de séquences (Shokralla et al., 2012). Il existe à l'état actuel plusieurs technologies de séquençage mais elles partagent toutes au moins deux étapes : la phase de préparation/fragmentation des amplicons et la phase de détection de l'incorporation des bases azotées à la molécule d'ADN. Ainsi, Shokralla et al (2012) ont classé ces NGS en deux groupes : un groupe comprenant les méthodes qui se passent de l'étape de la PCR avant l'étape de séquençage, encore appelée « SMS : pour single-molecule sequencing ». Il s'agit de la technologie de séquençage à une seule molécule de HeliScope (Helicos BioSciences Corp., Cambridge, MA, USA) et le système PacBio RS SMRT (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, États-Unis) ; un autre groupe est constitué des méthodes qui font recours à une étape de PCR avant l'étape de séquençage développées par 4 plateformes commerciales :

- La méthode Roche 454 Genome Sequencer (Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA),
- La méthode HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA),
- La méthode AB SOLiD™ System (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) et

- La méthode Ion torrent ou Personal Genome Machine (Ion PGM) (Life Technologies, South San Francisco, CA, USA). Cette technologie de séquençage a un très bon rapport qualité/prix mais aussi ses caractéristiques techniques (longueur des « reads » entre 100 et 200 paire de bases, nombre de lectures variant entre 1×10^6 et 11×10^6) sont bien adaptées à l'étude de la diversité des communautés microbiennes rhizosphériques.

Principe de la méthode Ion Torrent : Cette méthode a été introduite en 2010 par la compagnie Life technologie avec la machine Ion Personal Genome Machine (PGM) (Shokralla et al., 2012). Elle comprend deux phases :

- La préparation de l'ADN : Les molécules d'ADN issues de la PCR sont fragmentées, dissociées en ADN simple brin. Ensuite ces fragments d'ADN simple brin sont accrochés à des billes dont la surface contient des oligonucléotides complémentaires aux adaptateurs fixés sur les molécules d'ADN. Ces billes seront chargées dans une plaque percée de micro-puits sensibles à une variation du pH où se déroulera la PCR en émulsions. En effet, chaque puits ne peut recevoir qu'une seule bille et contient les composés nécessaires à la PCR.
- Le séquençage proprement dit : Elle consiste à une PCR pendant laquelle les 4 nucléotides sont ajoutés de manière séquentielle dans les puits. En effet, l'incorporation d'un nucléotide à la chaîne nucléotidique par la polymérase libère un ion H^+ modifiant ainsi le pH à l'intérieur du puits. Cette variation du pH qui est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés est détectée en temps réel par la couche sensible aux ions et un capteur ionique spécifique situés sous la plaque (Rothberg et al., 2011). Ces changements de pH seront analysés par un processeur qui permettra d'avoir la succession des nucléotides des fragments d'ADN et grâce à des algorithmes dédiés, la séquence de l'ADN de départ pourra être reconstituée.

I.2.2.2- Les facteurs influant sur la diversité microbienne rhizosphérique

❖ Les propriétés du sol

Les caractéristiques physico-chimiques du sol constituent des facteurs primordiaux dans la structuration des communautés microbiennes du sol rhizosphérique. Cela a été démontré à travers de nombreuses études. Ainsi, en étudiant sur le maïs l'effet combiné de la lignée, du site de prélèvement et de la nature du sol (sol nu ou sol rhizosphérique), Peiffer et al (2013) ont montré que les caractéristiques physico-chimiques du sol, constituaient la première source de variation de l'alpha-diversité et de la bêta-diversité des communautés microbiennes

rhizosphériques. De manière spécifique, une modification de la structure de la communauté microbienne a été noté sous l'influence de la texture (Girvan et al., 2003) de la teneur en azote (Frey et al., 2004) de la teneur en phosphore (Faoro et al., 2010) et surtout du pH du sol (Fierer and Jackson, 2006; Lauber et al., 2008; Rousk et al., 2010). Par ailleurs, le travail du sol (labour) diminue non seulement la biomasse microbienne, la densité des bactéries et des champignons, mais aussi modifie la structure des communautés microbiennes (Lienhard et al., 2012).

❖ L'action de la plante hôte

Le contrôle des plantes sur la structure et/ou la composition des communautés microbiennes du sol se fait à travers l'exsudation racinaire. En effet, de nombreux études ont mis en évidence une modification de la structure des communautés microbiennes rhizosphériques en relation avec une variabilité de l'exsudation racinaire (Aira et al., 2010; Carvalhais et al., 2015; Micallef et al., 2009). Ce contrôle des caractéristiques microbiennes rhizosphériques par l'exsudation racinaire peut s'effectuer à différents niveaux :

L'espèce végétale est l'un des facteurs qui déterminent les caractéristiques d'une communauté microbienne dans la rhizosphère. En effet Costa et al (2006) ont démontré que la fraise (*Fragaria ananassa* Duch.) et le colza oleagineux (*Brassica napus* L.) présentaient des signatures différentes sur la structure des communautés bactériennes totales et fongiques étudiées par la technique PCR-DGGE. Le clonage et le séquençage des bandes dominantes sur les profils DGGE ont révélé que *Streptomyces* sp et *Rhizobium* sp ont été les 2 espèces dominantes dans la rhizosphère de la fraise alors que celle du colza était dominée par *Artrobacter* sp. De même, une autre étude a démontré que la variabilité de l'exsudation racinaire tracée par un marquage au carbone radioactif chez le Blé, le maïs, le colza, et chez la luzerne avait un impact différent sur la composition des communautés microbiennes de la rhizosphère en fonction de l'espèce végétale (Haichar et al., 2008). Un résultat similaire a également été obtenu par Turner et al (2013) qui ont rapporté des différences significatives entre les microbiomes rhizosphériques du blé, du pois et de l'avoine. Dans leur étude, ils ont remarqué que la sélection exercée sur les eucaryotes était plus forte chez les 2 dernières plantes que chez le blé.

Par ailleurs, le stade de développement de la plante joue un rôle très important dans l'assemblage du microbiome rhizosphérique. Cet effet de l'âge de la plante sur la diversité des communautés microbiennes rhizosphérique a été démontré sur les racines de maïs (Baudoin et al., 2002) chez le pois (*Pisum sativum*), sur *Medicago truncatula* (Mougel et al., 2006) et sur

Arabidopsis thaliana (Micallef et al., 2009). Chez cette plante modèle, il a été également rapporté une modification significative de la diversité de la communauté bactérienne touchant principalement les Acidobactéries, les Actinobactéries, les Bactéroïdes et les Cyanobactéries en fonction de son stade de développement (Chaparro et al., 2014).

En plus de ces facteurs, il a été noté un effet des caractéristiques génétiques intra-spécifiques de la plante sur la structure des communautés microbiennes. Cet effet du cultivar/lignée a été étudié par plusieurs approches :

- La première consistait à comparer la structure de la communauté microbienne de plusieurs variétés ou lignées de plante. C'est le cas chez le maïs, plante chez laquelle la structure des communautés bactériennes rhizosphériques variait non seulement en fonction de la lignée (Aira et al., 2010; Bouffaud et al., 2012; Peiffer et al., 2013) mais aussi en fonction du groupe génétique (5 principaux) créé lors de la diversification (Bouffaud et al., 2012). Un résultat similaire a été obtenu sur différents génotypes de luzerne (*Medicago truncatula*) chez laquelle Zancarini et al (2012) ont observé une variation de la structure des communautés bactériennes rhizosphériques. Dans la même lancée, une autre étude réalisée chez diverses variétés de patate douce (*Ipomea batatas*) a montré qu'en plus de l'effet du stade de développement, le microbiome était également influencé par le génotype de la plante (Marques et al., 2014).
- La deuxième approche concerne l'étude de la structure des communautés microbiennes des plantes génétiquement modifiées (PGM) qui présentent souvent une altération de leur exsudation racinaire. Ces PGM constituent de bons modèles pour étudier l'effet spécifique des cultivars sur les communautés microbiennes, ce qui justifie leur utilisation à travers de nombreuses études (Castaldini et al., 2005; Mansouri et al., 2002; Oliver et al., 2008). La pomme de terre transgénique produisant le lysozyme T4 (Düring et al., 1993) constitue l'un des meilleurs exemples à ce sujet. En effet, Ahrenholtz et al (2000) ont montré une diminution de 1,5 à 3,5 fois de l'abondance de *Bacillus subtilis* après son inoculation dans la rhizosphère de la pomme de terre transgénique sécrétant le lysozyme T4, comparé aux cultivars témoins (non transgénique et transgénique ne sécrétant pas le lysozyme T4). Une autre étude a également mis en évidence une variabilité de l'abondance relative des champignons endophytes entre ce modèle de PGM et la lignée parentale non transgénique aussi bien par des techniques de culture et que d'empreintes génétiques du genre PCR-DGGE (Götz et al., 2006). Ce résultat a été également confirmé par Rasche et al (2006) qui

ont montré une modification de la diversité et de l'activité microbienne rhizosphérique de cette plante comparée à des génotypes sauvages.

I.2.2.3- Impact du microbiome rhizosphérique sur la plante hôte

Les micro-organismes du sol sont capables de modifier directement ou indirectement la productivité des plantes à travers plusieurs mécanismes. Le premier mécanisme consiste en la suppression de l'effet pathogène de certains micro-organismes. Comme exemple on peut se référer à l'étude de Mendes et al (2011) qui ont montré que l'inhibition de l'effet pathogène pour la betterave sucrière cultivée dans un sol infesté était associée à une modification de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques. En effet selon cette étude, la suppression de cet effet pathogène était liée à une augmentation de l'abondance des gamma- et alpha-proteobactéries (Pseudomonaceae, Burkholderiaceae et Xanthomonadales) et des firmicutes (Lactobacillaceae).

Une autre influence du microbiome rhizosphérique sur la plante est qu'il est capable de lui conférer une tolérance plus ou moins importante face au stress abiotique, en fonction de ses caractéristiques. En effet, l'inoculation d'un sol témoin avec 3 microbiomes provenant de sols rhizosphériques de 3 espèces végétales différentes a entraîné une augmentation significative de la biomasse aérienne chez *A. thaliana* cultivée dans des conditions de déficit hydrique (Zolla et al., 2013).

En outre, la communauté microbienne du sol rhizosphérique peut influencer sur la date de floraison de la plante hôte. A titre d'exemple nous pouvons citer les cas d'*A. thaliana* et de *Brassica rapa* qui modulent leur date de floraison en fonction de l'origine de l'inoculum qu'elles reçoivent. Ainsi pour *A. thaliana*, les plantes inoculées avec un microbiome provenant de sol rhizosphérique de variété à floraison tardive fleurissent au bout d'une durée 15 à 17% plus longue que celle inoculées avec un microbiome issu de la rhizosphère des variétés d'arabettes précoces ; mieux, chez *B. rapa*, cet allongement de la date de floraison peut aller jusqu'à +56 %. Ce retard de la floraison s'est accompagné chez les 2 espèces d'une augmentation de la biomasse aérienne (Panke-Buisse et al., 2015).

Cependant, d'autres études ont montré qu'une diminution de la diversité microbienne du sol (par diminution de la richesse spécifique) n'avait pas d'effet sur les fonctions écosystémiques (Nannipieri et al., 2003). Ceci est certainement dû à la redondance fonctionnelle c'est-à-dire le fait que certaines espèces puissent assurer les mêmes fonctions que d'autres dans le sol.

I.3- La structure du sol : importance et déterminants de l'agrégation

La structure du sol est définie comme l'arrangement tridimensionnel des particules minérales, organiques et des pores dans le sol. Les agrégats constituent les éléments structuraux de base du sol. Ils résultent de l'association entre les particules (sables et limons), les ciments minéraux (argiles) et les liants organiques. L'agrégation des particules du sol ainsi que l'incorporation de la matière organique résultent à la fois de phénomènes abiotiques (physico-chimiques) et biotiques qui peuvent en modifier les caractéristiques. La stabilité des agrégats ou leur capacité de résistance à des forces disruptives comme le vent ou l'eau est un bon indicateur de la stabilité physique du sol; elle est positivement corrélée à la diversité des plantes qui poussent sur le sol (Pohl et al., 2009) et est également liée aux propriétés physiques du sol telles que la capacité de rétention en eau, le taux d'infiltration, la résistance à l'érosion. Elle joue également un rôle très important dans la séquestration de carbone du sol (Bronick and Lal, 2005; Six et al., 2006).

Ainsi, les facteurs qui peuvent influencer sur la structure du sol sont très nombreux et incluent : la texture, la minéralogie, le climat, l'apport de MO, les résidus végétaux, les perturbations liées au travail du sol, le parcage animal et l'utilisation des machines agricoles (Six et al., 2004). Cette structure du sol est très importante pour la rétention de l'eau et des éléments nutritifs dont la plante a besoin pour sa croissance. Dans le cas particulier de la rhizosphère des plantes, ces facteurs peuvent être regroupés en 2 catégories selon leur origine :

I.3.1- les facteurs abiotiques de l'agrégation rhizosphérique

Les propriétés du sol qui influencent la stabilité des agrégats sont la texture (Ritz and Young, 2011), la taille des argiles (Denef and Six, 2005), la concentration en cations, la concentration en oxydes d'aluminium et de fer mais aussi la teneur en matière organique du sol (Abiven et al., 2009).

I.3.2- Les facteurs biotiques de l'agrégation rhizosphérique

Les facteurs biotiques sont essentiellement liés à l'anatomie/morphologie et à la physiologie des organismes vivant dans la rhizosphère. Ils peuvent être d'origine végétale, microbienne ou même mixte comme dans le cas des mycorhizes.

I.3.2.1- Influences directes de la plante sur l'agrégation rhizosphérique

L'activité souterraine des plantes, notamment l'architecture racinaire est un paramètre déterminant pour la structure du sol. On peut prendre comme exemple l'action mécanique des

racines. En effet, celles-ci agissent directement par liaison et compression des particules minérales favorisant non seulement l'agrégation mais aussi la stabilité des agrégats (Gyssels et al., 2005; Six et al., 2004). La diversité végétale joue également un rôle très important sur l'agrégation du sol. En effet il a été démontré que l'augmentation de la diversité spécifique des plantes conduit à une augmentation de la stabilité des agrégats (Gould et al., 2016) et ainsi de la résistance du sol à l'érosion (Berendse et al., 2015). De même, Pérès et al (2013) ont montré que la stabilité des agrégats augmentait en passant des monocultures aux associations de plantes. De plus, ces derniers auteurs ont rapporté que la présence de graminées entraînait une augmentation de la stabilité structurale, contrairement celle des légumineuses. La densité du chevelu racinaire a été également identifiée comme un facteur pouvant affecter l'agrégation du sol au niveau de la rhizosphère. En effet, Moreno-Espíndola et al (2007) ont montré que le Chiendent pied-de-poule « Bermuda grass en anglais » (*Cynodon dactylon*) et le maïs (*Zea mays*), avec de fortes densités du chevelu racinaire, avaient des ratios entre masse de sol adhérent et biomasse racinaire (MSA/BR) plus importants que ceux de l'amaranthe (*Amaranthus hypochondriacus*) et du tournesol (*Helianthus annuus* L.) qui avaient montré de plus faibles densités de leur chevelu racinaire au niveau de leur rhizosphère.

I.3.2.2- L'influence de l'activité microbienne sur l'agrégation rhizosphérique

Les micro-organismes du sol sont capables d'agir sur la stabilité des agrégats à travers plusieurs mécanismes (Ritz and Young, 2011). En effet, les champignons agissent principalement en piégeant les particules solides du sol grâce à leur hyphes (Degens et al., 1996), tandis que les bactéries et certains champignons exsudent des polysaccharides qui adhèrent aux particules minérales du sol. Cependant, l'effet des micro-organismes sur l'agrégation dépend aussi de la qualité intrinsèque de la matière organique présente dans le sol. En effet, l'apport de résidu frais de matière organique stimule la production de polysaccharides labiles par les champignons et bactéries alors que l'apport de matière organique récalcitrante impacte principalement à travers les hyphes mycéliens. Ce qui démontre que la nature biochimique de la matière organique joue un rôle très important dans l'agrégation. Dans le cas particulier de la rhizosphère, plusieurs études se sont intéressées à l'effet des bactéries et des champignons sur cette agrégation.

❖ Rôle des rhizobactéries sur l'agrégation du sol

L'une des activités bactériennes les plus importantes impliquées dans l'agrégation du sol est la production de polysaccharides (Lynch and Bragg, 1985). Ces polysaccharides par leurs propriétés physico-chimiques contribuent fortement à l'agglomération des particules minérales

en unités plus stables que sont les agrégats. En fait, le rôle des bactéries productrices d'exopolysaccharides (EPS) sur l'agrégation du sol rhizosphérique est largement documenté :

En effet, les travaux de Amellal et al (1998) sur le blé ont montré que le ratio entre masse de sol adhérent aux racines et biomasse racinaire (MSA/BR) augmentait de 50% après l'inoculation d'une souche de *Pantoea agglomerans* NAS206 productrice d'exopolysaccharides à des plants poussant dans un vertisol marocain. En plus, une amélioration de la macroporosité (pores de diamètre compris entre 10 et 30 μm) du sol adhérent aux racines a été notée, démontrant ainsi l'importance de l'activité bactérienne dans la régulation du contenu en eau du sol rhizosphérique. Un résultat semblable a été obtenu avec cette même céréale après l'inoculation par *Paenibacillus polymyxa* (Bezzate et al., 2000). Cet effet de *Paenibacillus polymyxa* sur l'agrégation a été imputé à sa capacité à produire du lévane car l'inoculation des plantes avec une souche de *Paenibacillus polymyxa* mutante incapable de produire cette substance est restée sans effet sur l'agrégation. Ce qui démontre ainsi que la production de lévane par cette bactérie est responsable pour une grande part de l'agrégation du sol adhérent aux racines dans ce système. Sur cette même plante, une autre étude plus récente de Kaci et al (2005) a montré une augmentation du ratio MSA/BR de 137% après inoculation avec une souche de *Rhizobium*. En outre sur le tournesol, l'inoculation d'une souche de *Rhizobium sp.* YAS34 produisant un EPS modifie également la structure du sol aux alentours des racines et corrige l'effet d'un déficit hydrique sur la croissance des plantes. Cette contribution de l'activité bactérienne dans l'agrégation au voisinage de la surface racinaire a des effets positifs en termes de disponibilité en eau et en minéraux pour les plantules de tournesol (Alami et al., 2000).

❖ Rôle des champignons mycorhiziens à arbuscule (CMA) sur l'agrégation du sol

Dans la nature, Il existe deux groupes de champignons qui entretiennent des relations mutualistes avec les plantes : les champignons ectomycorhiziens et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Les CMA constituent un groupe monophylétique et vivent en association avec 80% des plantes terrestres (Smith and Read, 2008). A travers cette association, ces mycorhizes dérivent entre 4 et 20% de la quantité des composés carbonés élaborés par la plante pour étendre le réseaux d'hyphe au-delà de la zone de déplétion en nutriments (notamment le P) au profit des racines de la plante (Phillips et al., 2013), mais également jouent un rôle très important dans l'acquisition de l'azote (Fellbaum et al., 2012). Parallèlement à ces effets positifs sur la croissance de la plante, il a été rapporté des effets bénéfiques de ces champignons mycorhiziens à arbuscules sur les propriétés physiques du sol.

En effet, il a été montré que ces champignons contribuent à la stabilité du sol rhizosphérique directement par le prolongement de la racine par les hyphes et indirectement par la libération dans le sol rhizosphérique de glycoprotéines spéciales connues sous le nom de GSPR (glomaline-related soil protein) qui ont la propriété d'agréger les micro agrégats du sol (Bedini et al., 2009; Peng et al., 2013). A titre d'exemple, il a été rapporté que l'une inoculation de *Poncirus trifoliata* avec les champignons mycorhiziens à arbuscules (*Funneliformis mosseae* et *Paraglomus occultum*) augmentait de manière significative la quantité de GSPR et la stabilité des agrégats (augmentation du diamètre moyen pondéré) entraînant ainsi une amélioration de la croissance de la plante (Wu et al., 2014).

Chapitre II : Effet de la variabilité génétique du mil sur l'agrégation du sol rhizosphérique : Rôle des bactéries productrices d'exo-polysaccharide

Introduction

Selon le rapport des Nations Unies sur les sols (Status of the World Soil Resources), un tiers des sols de la planète souffre de dégradation et l'une des principales causes est la détérioration de leurs propriétés physiques et notamment de leur structure (FAO, 2015). La structure du sol dépend largement de sa teneur en matière organique (MO), un facteur qui joue un rôle important sur l'agrégation du sol. En effet, la formation d'agrégats et leur stabilité est sous le contrôle de plusieurs facteurs abiotiques comme la texture, le climat, la teneur en MO du sol, la concentration en fer et en aluminium (Six et al., 2004) et biotiques tels que la morphologie des racines des plantes (Bardgett et al., 2014; Gould et al., 2016) et l'exsudation racinaire qui agit sur les activités microbiennes (Graf and Frei, 2013; Kuzyakov, 2010; Oades et al., 1991). Parmi ces activités microbiennes, la production d'exo-polysaccharides (EPS) microbiens par les bactéries et les champignons agit sur la structure en constituant des sortes de ciments pour les particules minérales du sol (Chenu and Guérif, 1991). A titre d'exemple, plusieurs études ont mis en évidence l'effet de l'inoculation de souches bactériennes productrices d'EPS, isolées de divers environnements rhizosphériques sur l'agrégation du sol rhizosphérique et sur le développement du blé (Kaci et al., 2005) et du tournesol (Alami et al., 2000).

Par ailleurs, il a été également rapporté que les plantes exercent une sélection sur les communautés microbiennes rhizosphériques à travers la sécrétion d'exsudats racinaires (Lloyd et al., 2016; Paterson et al., 2007). Or de récentes études ont révélé que les traits génétiques intra-spécifiques de différentes espèces végétales peuvent impacter sur la structure des communautés microbiennes rhizosphériques par modification des profils de l'exsudation racinaire (Micallef et al., 2009; Peiffer et al., 2013).

Ainsi, dans une perspective de maintien de la qualité physique des sols, nous nous sommes posé la question de savoir s'il y avait chez le mil un lien entre les traits génétiques de la plante et l'agrégation au niveau de la rhizosphère et le cas échéant quel serait le rôle des bactéries productrices d'exo polysaccharides dans cette relation. L'objectif de ce chapitre est donc de tester en conditions semi-contrôlées (serre) l'effet de la variabilité génétique du mil sur l'intensité de l'agrégation rhizosphérique et de déterminer par des procédés de microbiologie classique (culture, isolement) et moléculaire (identification par PCR-séquençage) la présence et l'abondance de bactéries productrices d'EPS dans le sol rhizosphérique de quelques lignées de mil.

Pour ce faire nous nous appuyerons sur une collection de 86 lignées de mil qui seront criblées en serre pour la caractérisation de l'intensité de l'agrégation rhizosphérique. Nous utiliserons comme critère de phénotypage le ratio entre la Masse de Sol Adhérent aux racines et la Biomasse Racinaire (MSA/BR). En effet, ce ratio a été utilisé par Alami et al (2000), Bezzate et al (2000) et Kaci et al (2005) pour déterminer l'effet de l'inoculation de bactéries productrices d'EPS sur l'agrégation rhizosphérique de différentes espèces végétales.

Afin de déceler un lien éventuel entre cette agrégation racinaire et la présence des bactéries productrices d'EPS, une culture de bactéries a été effectuée à partir du sol rhizosphérique de 9 lignées de mil qui présentent des phénotypes d'agrégation contrastés. Ainsi, une comparaison du nombre de CFU et un isolement de souches potentiellement productrices d'EPS ont été faits à partir de ces échantillons de sol sur un milieu de culture adapté aux bactéries du sol (milieu TSA) supplémenté en glucose ou en saccharose pour stimuler la production de polysaccharides. L'identification de ces souches isolées a été effectuée par séquençage de l'ADN ribosomique 16S et comparaison de leurs séquences avec des séquences références de la base de données nucléotidiques du « National Center for Biotechnology Information (NCBI) » (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

II.1- Matériel et Méthodes

II.1.1- Les accessions de mil

Les 86 accessions de mil criblées sont des lignées recombinantes de la collection ISRA/IRD (maintenue à l'UMR DIADE, Montpellier). Elles sont originaires du Niger, du Togo, du Sénégal, du Zimbabwe et du Cameroun, et sont issues d'accessions de l'ICRISAT, du CIRAD et de l'université d'Orsay (Saïdou et al, 2009). L'**annexe 1** donne la liste complète de ces 86 lignées de mil et quelques informations complémentaires.

II.1.2- Mise au point de la méthodologie de phénotypage

Dans la mesure où les différentes études utilisant le ratio MSA/BR (Alami et al., 2000; Bezzate et al., 2000; Kaci et al., 2005) ont été effectuées sur des sols aux propriétés physico-chimiques différentes des nôtres, nous avons effectué un test sur 2 échantillons de sols sableux représentatifs de la zone de culture du mil (un sol provenant de Bambey et un sol provenant de Sangalkam avec des teneurs en argiles respectives de 2,7 et 5,4%) pendant la période Avril/Mai 2013 avec 3 lignées de mil (L82, L111 et L114). Les résultats avaient montré une différence

significative du ratio MSA/BR entre les lignées L82 et L114 uniquement sur le sol de Bambey. C'est ce qui a motivé notre choix de continuer nos expérimentations avec ce sol d'autant plus que ce sol est prélevé en plein cœur du bassin arachidier, la principale zone de culture du mil au Sénégal.

II.1.3- Echantillonnage et analyse chimique du sol de Bambey

Le sol a été prélevé pendant les saisons sèches des années 2013 et 2014 dans un champ d'essai de la station ISRA de Bambey puis tamisé à 4 millimètres. Ses caractéristiques physico-chimiques sont indiquées dans le tableau suivant.

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques du sol de Bambey

Granulométrie	Argile	2,70%
	Limon	3%
	Sable	94,50%
pH	H ₂ O	7,7
	KCl	7,6
C and N	N(NO ₃) mg/kg	2,55
	N(NH ₄) mg/kg	5,66
	Total N	0,04%
	Total C	0,69%
P	C / N	16
	P total mg/kg	138
Cations échangeables	P assimilable mg/kg	18
	Ca ²⁺ mé/100 g	3,65
	Mg ²⁺ mé/ 100 g	1,44
	Na ⁺ mé/ 100g	0,10
CEC	K ⁺ mé / 100 g	0,22
	mé / 100g	4,30

II.1.4- Le criblage des lignées

- Dispositif expérimental :

Le phénotypage des différentes lignées de mil a été effectué en 7 blocs successifs dont les semis étaient décalés de 15 jours afin de permettre aux récoltes de pouvoir s'effectuer correctement. Les 6 premiers comptaient 12 lignées et le dernier compte 14 lignées. Dans chaque bloc, chaque lignée comptait 5 répétitions. Au cours du criblage des blocs 5 et 6 nous avons maintenu les 2

lignées L82 et L114 qui nous avaient servi de lignées test lors de la mise au point, comme témoins pour déceler éventuellement des variabilités inter-bloc (**Planche 1**).



Planche 1: Dispositif expérimental du phénotypage des lignées en "serre"

- **Semis, entretien et récolte du sol adhérent aux racines**

L'expérimentation a été conduite en serre dans des pots dédiés de forme "WM" sans fond. Ces pots ont été remplis de sol tamisé et installés dans des cageots en plastique sur une toile de moustiquaire pour maintenir leurs fonds. Dans chaque pot, 1,5 kg de sol a été humidifié à 8% correspondant à la capacité de rétention du sol préalablement mesurée. Les graines des différentes lignées ont ensuite été semées de manière aléatoire dans chaque bloc et un démariage à un pied a été effectué 7 jours après semis. L'arrosage des jeunes plants a été effectué de manière journalière avec 20 mL d'eau pour chaque pot (correspondant à la perte en eau journalière du sol que nous avons déterminée dans une manipulation préliminaire) jusqu'à la veille de la récolte qui a été effectuée après 4 semaines de croissance.

Cette récolte a été faite par détachement des 2 pièces de chaque pot de manière délicate afin de garder au mieux les racines intactes avec leur sol adhérent (**Planche 2A**). Puis, l'ensemble (plante + sol) a été fixé au collet à un appareil agitateur électrique de type CAT S50 capable d'induire des vibrations mécaniques dont on peut Contrôler l'intensité et durée. Ainsi toutes les plantules ont été secouées avec une vitesse de 1100 rpm/min pendant une minute pour garder le sol adhérent aux racines et éliminer le sol non adhérent aux racines de manière uniforme (**Planche 2B**).

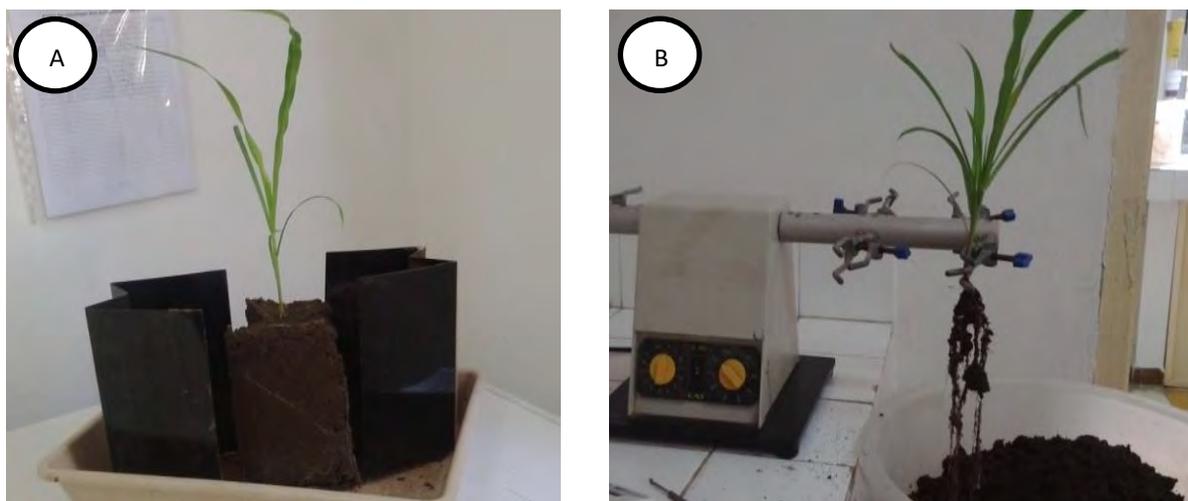


Planche 2: Dépotage des plantes et secouement des racines

Le sol adhérent a ensuite été récupéré dans des coupelles en aluminium par rinçage des racines à l'eau déminéralisée avant d'être séché à l'étuve à 105°C pendant 3 jours. De plus, les racines et les parties aériennes ont été récupérées et mises à sécher à l'étuve à 65 °C pendant 3 jours afin de déterminer les biomasses aériennes et racinaires. Pour chaque échantillon, un prélèvement de sol non adhérent a été également effectué et pesé puis mis à l'étuve à 105°C afin de pouvoir déterminer l'humidité du sol dans le pot au moment de la récolte.

- **Comparaison du ratio MSA/BR et sélection de lignées contrastées :**

Après le criblage des 86 lignées, nous avons sélectionné des lignées contrastées en deux phases. Dans un premier temps, 16 lignées contrastées ont été choisies dans les 7 blocs en tenant en compte de leur croissance, de la disponibilité des graines et de l'homogénéité de leur phénotype entre les répétitions. Ensuite, elles ont été semées et phénotypées selon le même protocole que celui du criblage. Dans un deuxième temps nous avons ensuite sélectionné parmi ces 16 lignées les 9 qui présentaient des différences significatives du ratio MSA/BR (3 lignées à faible agrégation [ratio MSA/BR < 15 g/g] et 6 lignées à forte agrégation [ratio MSA/BR > 15 g/g]). Le phénotypage a ensuite été repris dans les mêmes conditions en portant cette fois ci le nombre de répétitions à 10 pour chaque lignée.

II.1.5- Isolement de bactéries productrices d'EPS

Pour étudier les communautés microbiennes rhizosphériques productrices d'exopolysaccharides dans la rhizosphère, nous avons effectué une culture de bactéries du sol rhizosphérique de ces 9 lignées contrastées. Pour ce faire, ces lignées ont été mises en croissance

dans le même sol et dans les mêmes conditions expérimentales que lors des manipulations de phénotypage en 4 répétitions. Après les 4 semaines de croissance, un échantillonnage des sols adhérents (sols rhizosphériques) et des sols non adhérents aux racines (bulk) a été effectué. Pour chaque lignée, un échantillon composite a été constitué à partir des 4 répétitions de sol adhérent et un autre à partir des échantillons de sol non adhérent. Ensuite pour chaque lignée, 1 g de ces 2 types de sol (sol adhérent et sol bulk) a été dissout dans 3 mL d'eau stérile et des dilutions en série ont été effectuées jusqu'à 10^{-4} . Ce sont ces solutions qui seront utilisées pour l'ensemencement de nos milieux de culture préparés dans des boîtes de Pétri.

II.1.5.1- Décompte du nombre de CFU et isolement de souches EPS

L'ensemencement a été effectué sur le milieu TSA dilué au dixième (TSA/10) ainsi que sur ce même milieu supplémenté en glucose (TSA/10+G) ou en saccharose (TSA/10+S) à une concentration de 20 g.L⁻¹. En effet, la teneur élevée en sucre dans ce milieu permet de sélectionner les bactéries productrices d'EPS (Hebbar et al., 1992) qui s'y caractérisent par une morphologie (étalée ou en dôme) et un aspect brillant (**Planche 3**). Par ailleurs, pour empêcher le développement des champignons, un fongicide (cycloheximide) a été ajouté aux milieux à une concentration de 70 mg.L⁻¹ avant autoclavage et coulage dans les boîtes de Petri. Ainsi, nous avons ensemencé nos boîtes de Pétri avec les dilutions de sol 10^{-3} et 10^{-4} . Après 48 heures d'incubation à 28°C, le nombre de CFU (Colony Forming Units) a été compté sur chaque boîte et calculé et pour chaque type de sol (adhérent ou non adhérent), chaque milieu (TSA/10, TSA/10+G, TSA/10+S) et pour chaque lignée.

Après cela nous avons sélectionné les souches dont les colonies montraient une morphologie caractéristique des productrices d'EPS (luisante de couleur blanchâtre à jaune, étalée ou en forme de dôme surélevée). Ces souches ont ensuite été isolées puis purifiées par des repiquages successifs dans du TSA/10 avant d'être mises en suspension dans du TSB pour les conserver au Glycérol à -80°C.



Planche 3: Morphologie des bactéries productrices d'EPS sur le milieu TSA + saccharose

II.1.5.2- Identification des souches isolées

Pour l'identification des souches, la PCR-séquençage de l'ADN ribosomique 16S a été effectuée. D'abord l'amplification du gène 16S a été effectuée avec les amorces fD1/ rD1 (Weisburg et al., 1991) à une concentration de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ avec un système PuReTaq ready to-go (GE Healthcare, United Kingdom) dans un volume final de 25 μL . Comme matrice nous avons ajouté dans le mix réactionnel de l'ADN extrait à partir des colonies sur les boîtes de Petri ou des suspensions cellulaires en milieu TSB en fonction des souches. Les conditions de la PCR aussi ont été ajustées progressivement en fonction des signaux réponses obtenus après le dépôt sur gel d'agarose de 3 μL des produits PCR.

C'est ainsi que les produits PCR des souches répondantes à la PCR ont été envoyées pour le séquençage à Cogenics, Inc, 100 Perimeter Park Drive, Morrisville, NC 27560, USA. Les séquences obtenues ont été identifiées par BLAST sur la base de données nucléotidiques du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) en considérant pour chaque souche, une longueur minimale de 700 paires de bases et un pourcentage de similarité minimum de 97% pour l'attribution taxonomique.

II.1.6- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT version 2016. Le test de normalité de Shapiro ($p < 0,05$) a été appliqué aux données de MSA/BR, biomasse aérienne (BA), biomasse racinaire (BR), humidité du sol avant tout test statistique. C'est ainsi que pour la deuxième expérimentation de phénotypage, les données de MSA/BR ont été transformées par la fonction racine carrée pour les normaliser. De même, l'homoscédasticité de la variance a été vérifiée avec le test de Levene ($p < 0,05$). Ainsi une analyse de variance (ANOVA) a été

effectuée pour chaque variable afin comparer les moyennes entre les différentes lignées. Le test de corrélation de Pearson a été effectué ($p < 0,05$) pour évaluer la significativité des corrélations entre les différents paramètres. Les données relatives au nombre de CFU ont été transformées par la fonction Logarithme.

II.2- Résultats

II.2.1- Phénotype des 86 lignées

Nous avons donc dans un premier temps phénotypé les lignées par blocs successifs de 12 à 14 d'entre elles (5 répétitions), en comparant les ratios MSA/BR après 4 semaines de croissance. La première chose à noter est que le ratio MSA/BR présentait une variabilité entre les différentes lignées passant de 6,9 pour la lignée L8 à 35,5 pour la lignée L118 soit un facteur 5 entre ces deux valeurs extrêmes. La deuxième chose importante à noter dans ce criblage est qu'il y a une certaine variabilité d'un bloc à l'autre tant pour la valeur moyenne du ratio que pour sa variabilité. L'effet bloc peut être mis en évidence par la variabilité inter bloc du phénotype (MSA/BR) des 2 lignées témoins qui ont été introduites dans les blocs 5 et 6 (Figure 3, histogrammes noirs), la valeur moyenne variant de 15 à 23 pour la lignée L114 et de 8 à 13 pour la lignée L82. Ainsi, dans ces deux blocs leurs valeurs relatives sont restées proches (rapport 1,5 à 1,6) bien que les niveaux moyens aient fortement variés : ceci nous indique que pour ce premier crible les phénotypes contrastants doivent être recherchés à partir des différences observées intra-blocs. En outre, la corrélation testée à partir des données brutes entre le ratio MSA/BR et l'humidité du sol à la récolte s'est montrée non significative ($R=0,041$; $p\text{-value} > 0,3$). Ceci nous permet de faire l'hypothèse que dans nos conditions, la variabilité du ratio MSA/BR est essentiellement liée à la variabilité génétique de la plante et non à une variation d'humidité du sol. Pour tester cette hypothèse, nous avons donc sélectionné 16 lignées (Figure 3 A-G histogrammes blancs) pour réévaluer leur phénotype dans une même expérience. Pour maximiser la probabilité de mettre en évidence des phénotypes contrastants, le choix s'est fait sur la base des différences significatives observées au sein des blocs lorsqu'il y en avait, en prenant également en compte la disponibilité des graines et l'homogénéité de l'aspect visuel des plantes. La seconde expérimentation effectuée sur ces 16 lignées montre des différences significatives sur le ratio MSA/BR des lignées de mil et les phénotypes notés sont globalement cohérents avec ceux enregistrés lors du criblage en masse. En effet, les lignées L8, L82 et L44 montrent toujours des ratios MSA/BR faibles par rapport aux autres lignées sélectionnées comme étant des lignées à fort ratio MSA/BR (**Figure 3 H**).

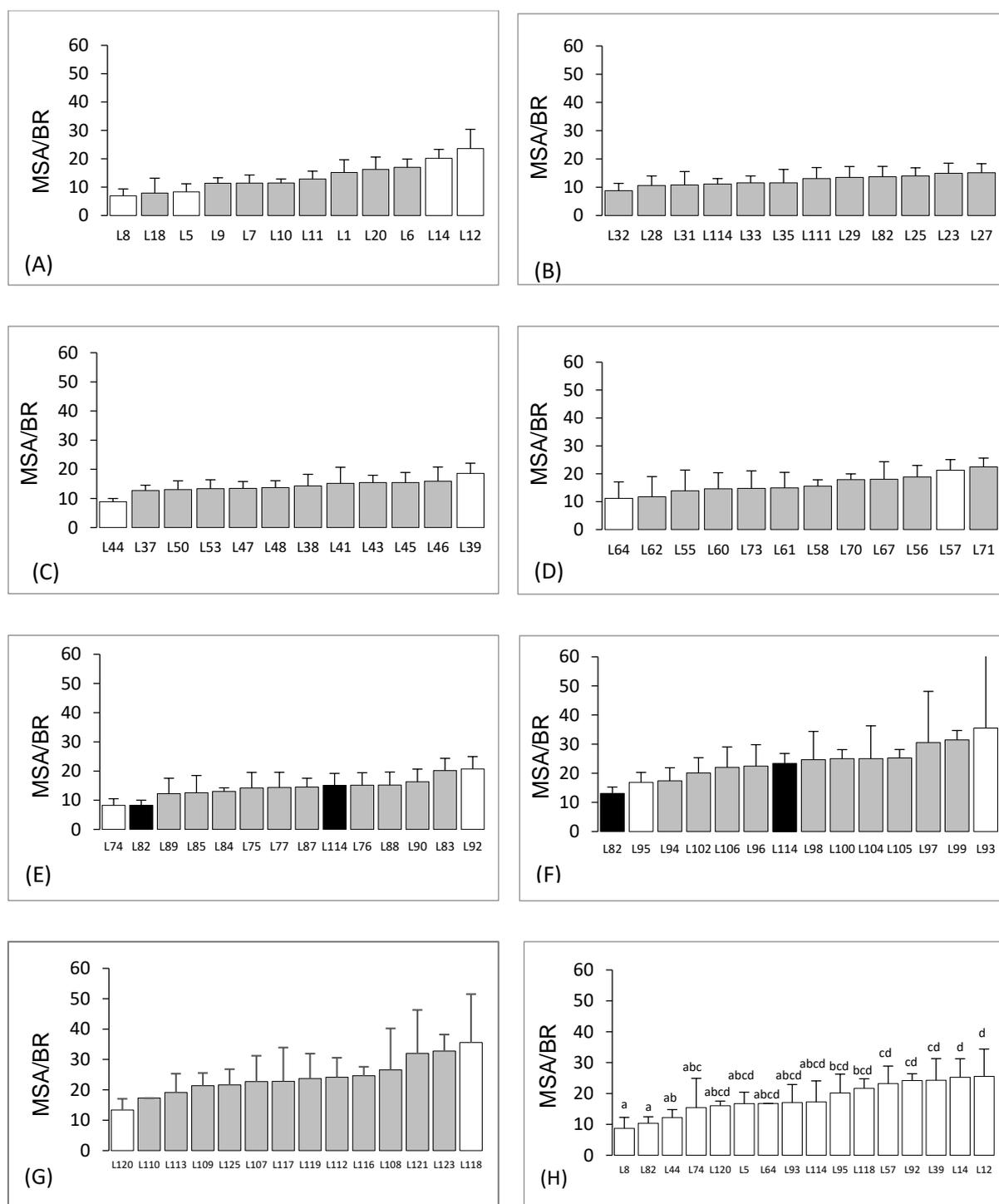


Figure 3: Criblage des 86 lignées de mil basé sur le ratio MSA/BR (A-G): Chaque graphe représente les résultats pour un bloc. Les graphes en fond blanc représentent les 16 lignées sélectionnées pour la deuxième expérimentation et ceux en fond noir représentent les 2 lignées utilisées comme témoin entre différents blocs. Le graph (H) représente les résultats de la première vérification des phénotypes contrastés de 16 lignées sélectionnées. Chaque histogramme représente la moyenne de 5 répétitions.

A partir de cette seconde expérience, nous avons retenu 9 lignées formant deux groupes statistiquement séparés : L8, L82, L44 d'une part, L118, L57, L92, L39, L14, L12 d'autre part (**Figure 3H**). Nous avons semé à nouveau ces 9 lignées dans une troisième expérimentation (**Figure 4**). Dans celle-ci, le ratio MSA/BR variait de 8,5 pour la lignée L8 à 24,1 pour la lignée L57 correspondant à un facteur de 2,8 entre ces deux valeurs extrêmes. Cette expérimentation a confirmé les différences notées sur le ratio MSA/BR entre les lignées L8, L82 et L44 (lignées à faible ratio MSA/BR) et les lignées L92, L12, L118, L14, L57 et L39 (lignées à fort ratio MSA/BR). En effet, dans ces deux groupes définis, la moyenne du ratio MSA/BR des lignées à faible agrégation rhizosphérique est significativement moins importante que celle des lignées à forte agrégation respectivement ($9,15 \text{ g/g} < 19,35 \text{ g/g}$; $p\text{-value} < 0,0001$; test de *Student*). Comme pour la manipulation de criblage, aucune corrélation significative n'a été notée entre ce ratio et l'humidité du sol au moment de la récolte ($p > 0,05$, **Figure 5**).

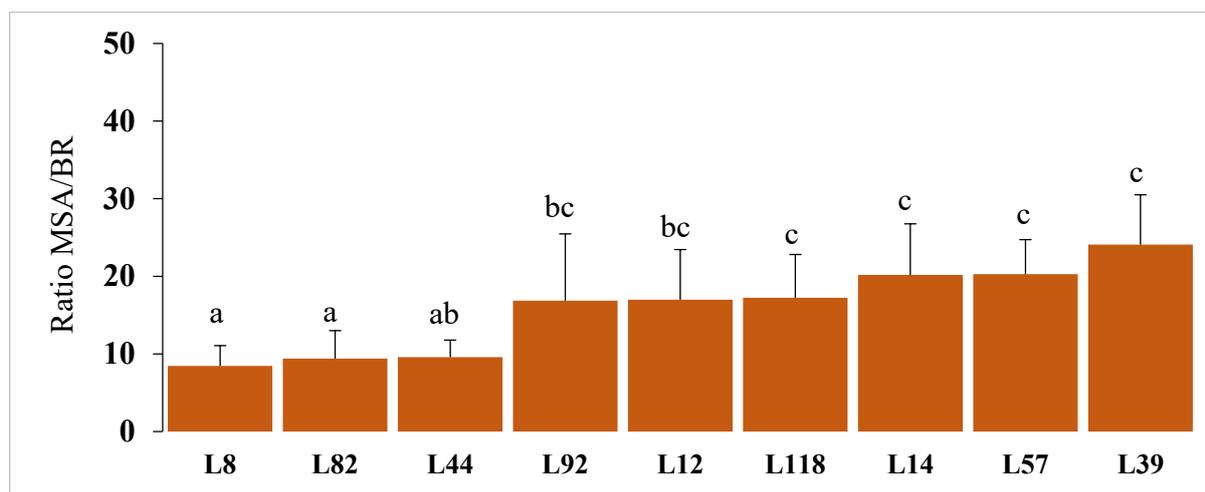


Figure 4 : Ratio MSA/BR des 9 lignées sélectionnées. Chaque histogramme représente la moyenne de 10 répétitions. Les barres d'erreurs sur les histogrammes représentent les écart-types. Les lettres différentes représentent les différences significatives entre lignées avec le test de Tukey ($p < 0,05$)

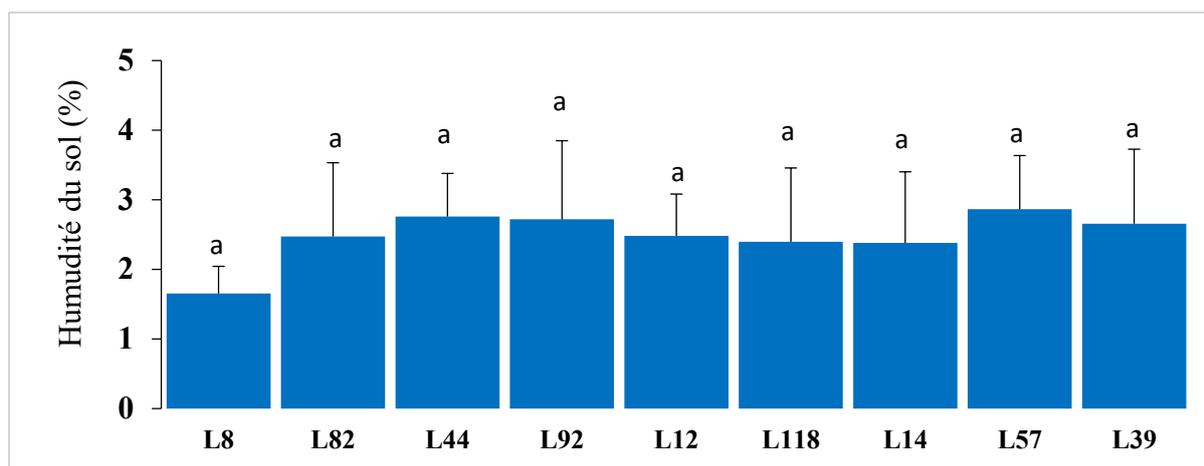


Figure 5 : Humidité du sol lors de la récolte des 9 lignées sélectionnées. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écart-types. Les lettres identiques représentent l'absence de différences significatives entre les différentes lignées avec le test de Tukey ($p < 0,05$).

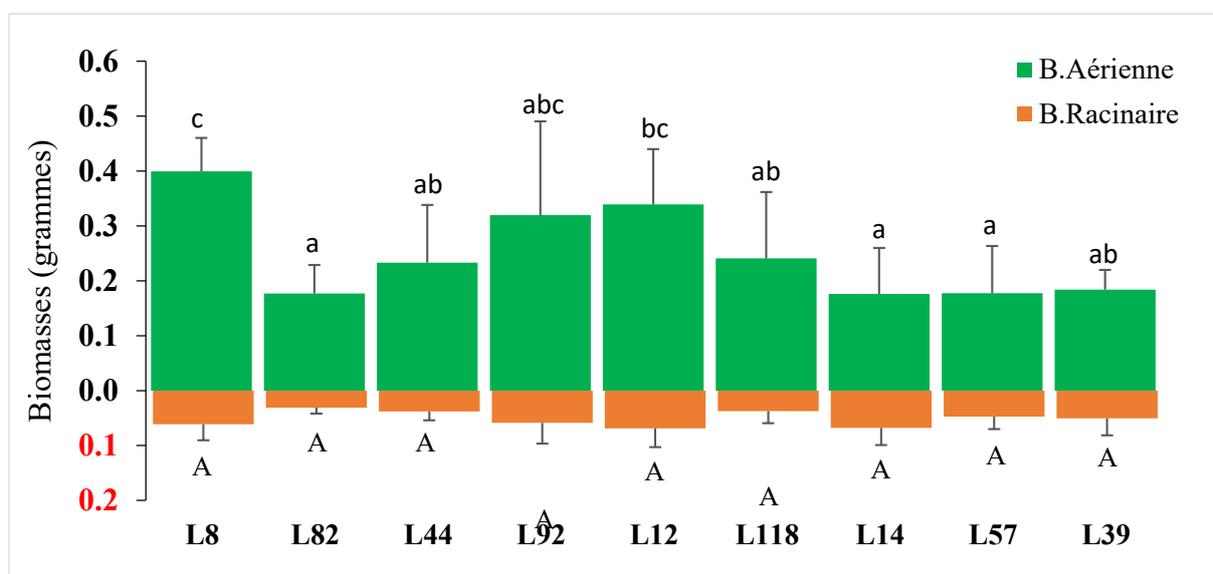


Figure 6 : Biomasse aérienne et biomasse racinaire des 9 lignées contrastées sélectionnées. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres minuscules différentes représentent les différences significatives de la biomasse aérienne entre les différentes lignées avec le test de Tukey ($p < 0,05$).

II.2.2- Relation entre MSA/BR et les paramètres de croissance

Tableau 2: Matrice de corrélation de Pearson entre le ratio MSA/BR, la biomasse aérienne (BA), la biomasse racinaire (BR), le ratio BA/BR et l'humidité du sol des 9 lignées de mil contrastées. Les (*) indiquent les corrélations significatives ($p < 0.05$)

Variables	MSA/BR	Humidité	BR	BA	MSA	BA/BR
MSA/BR	1	0.145	-0.121	-0.380 *	0.536 *	-0.268 *
Humidité		1	-0.416 *	-0.486 *	-0.214	0.024
BR			1	0.655 *	0.704 *	-0.483 *
BA				1	0.229 *	0.231 *
MSA					1	-0.583 *
BA/BR						1

Le **tableau 2** montre les relations entre l'humidité du sol, la biomasse aérienne (BA), la biomasse racinaire (BR), le ratio BA/BR et le ratio MSA/BR des plantes à la récolte, évaluées par le test de corrélation de *Pearson*. Ainsi, comme mentionné au-dessus dans les résultats des 2 premières expérimentations, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le ratio MSA/BR et l'humidité du sol « bulk » à la récolte ($p > 0,05$) suggérant qu'il n'y a pas d'effet direct de cette dernière sur l'intensité de l'agrégation que nous avons évaluée par ce ratio. La MSA a été positivement corrélée aux biomasses racinaire et aérienne. D'autre part, le rapport MSA/BR était corrélé négativement avec la biomasse aérienne ($R = -0,380$, $p = 0,0004$; expérimentations avec les 9 lignées contrastées), ce qui pourrait être lié au coût élevé en C consécutif à une exsudation racinaire intense. En outre, une corrélation négative a été trouvée également entre le ratio MSA/BR et le ratio BA/BR ($R = -0,269$; $p = 0,013$).

II.2.3- Le nombre de CFU dans le sol rhizosphérique :

La figure 7 ci-dessous montre les résultats obtenus après comptage des colonies sur les boîtes de Pétri dans les 3 milieux de cultures après 48 h d'incubation à 28 °C. Le nombre de colonies a été exprimé en valeur logarithmique (Log CFU.g^{-1} sol).

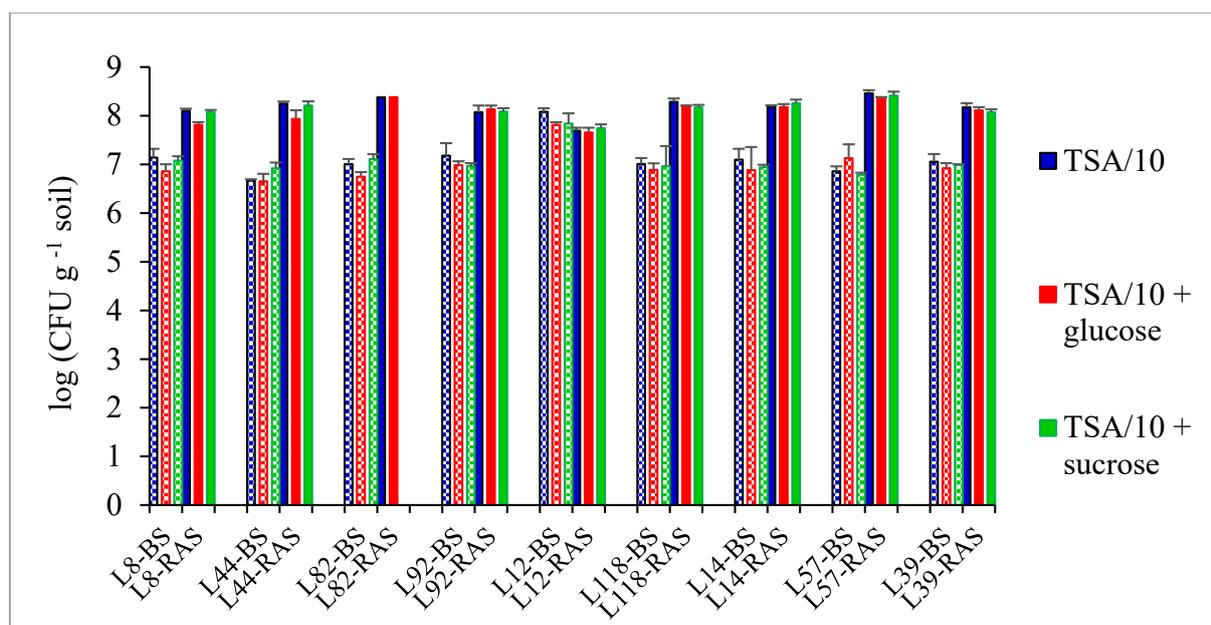


Figure 7 : Nombre de CFU du sol adhérent aux racines (RAS) et du sol non adhérent (BS) des 9 lignées de mil contrastées. Le nombre de CFU est exprimé en valeur logarithmique.

Quel que soit le milieu de culture, le nombre de bactéries cultivables exprimé en CFU par gramme de sol est d'environ 1×10^7 dans les sols non rhizosphériques pour toutes les lignées à l'exception de la lignée L12 qui montre des valeurs supérieures (**figure 7**). Dans les sols rhizosphériques des huit autres lignées, le nombre de CFU est dix fois supérieur à celui du sol non rhizosphérique ($p < 0,001$) et est en moyenne de $1,2 \times 10^8$ CFU.g⁻¹ sol. Seule la lignée L12 présente un nombre de CFU non significativement différent entre sol adhérent et non adhérent aux racines. Si l'on compare les lignées entre elles, le nombre de CFU des échantillons de sols rhizosphériques n'a montré aucune différence significative entre les différentes lignées de mil.

II.2.4- Les souches de bactéries productrices d'EPS isolées

En se basant sur leurs morphologies caractéristiques (colonies luisantes, bombées ou très étalées sur les boîtes de Pétri), 184 souches productrices d'EPS ont été sélectionnées et isolées du sol rhizosphérique de ces lignées de mil. Ces souches bactériennes qui ont été identifiées par séquençage de l'ADN ribosomique 16S appartenaient à 48 espèces différentes. Les plus fréquentes parmi elles étaient des *Actinobacteria* (*Arthrobacter pascens* : 28 souches, *Arthrobacter globiformis* : 13 souches, *Microbacterium barkeri* : 30 souches), des *Firmicutes* (*Bacillus aryabhatai* : 22 souches, *Paenibacillus polymyxa* : 16 souches) et des *Proteobacteria* (*Pseudomonas plecoglossicida* : 13 souches). Le **tableau 3** suivant donne les détails sur la répartition de ces souches bactériennes dans les échantillons de sol rhizosphérique de ces 9 lignées de mil.

Tableau 3: Les souches de bactéries productrice d'EPS isolées dans la rhizosphère des lignées de mil.

	L8	L82	L44	L92	L12	L118	L14	L57	L39	Total
<i>Agrobacterium fabrum</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>Arthrobacter chlorophenicus</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	1	3
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Arthrobacter defluvii</i>	0	0	0	0	6	0	0	1	0	7
<i>Arthrobacter globiformis</i>	0	1	2	1	0	1	4	1	3	13
<i>Arthrobacter oryzae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Arthrobacter pascens</i>	0	2	3	1	13	1	3	0	5	28
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Arthrobacter tecti</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Bacillus aryabhatai</i>	0	3	1	2	9	0	2	3	2	22
<i>Bacillus beveridgei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Bacillus isabelliae</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Bacillus megaterium NBRC 15308</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Bacillus pervagus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Bacillus tequilensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium ilicis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Cupriavidus taiwanensis LMG 19424</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	0	1	0	0	0	0	2	0	0	3
<i>Exiguobacterium indicum</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Franconibacter helveticus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Glycomyces halotolerans</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Halolactibacillus alkaliphilus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Microbacterium barkeri</i>	2	0	9	1	3	4	3	2	6	30
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
<i>Paenibacillus mucilaginosus KNP414</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Paenibacillus peoriae KCTC 3763</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	1	1	1	0	2	1	0	6
<i>Paenibacillus polymyxa E681</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Paenibacillus polymyxa SC2</i>	1	0	0	3	0	0	4	1	0	9
<i>Paracoccus halophilus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Pseudomonas monteilii</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	3
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0	0	3	4	0	0	5	0	1	13
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Rhizobium pusense</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3
<i>Rothia dentocariosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Sphingobacterium cladoniae</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Streptomyces libani</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Streptomyces pactum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Sulfirihydrogenibium krisjanssonii</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Variovorax paradoxus S110</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	6	13	24	16	43	8	35	11	28	184

II.3- Discussion

Le ratio MSA/BR (Alami et al., 2000; Amellal et al., 1998; Kaci et al., 2005) a été utilisé comme critère phénotypique pour le criblage des lignées de mil vis-à-vis de leur capacité à induire l'agrégation du sol rhizosphérique. Ce ratio dépend de plusieurs facteurs comme les conditions de la récolte, l'espèce végétale (de León-González et al., 2006), le stade de développement de la plante mais aussi de l'humidité du sol au moment de la récolte (Alami et al., 2000). C'est la raison pour laquelle nous avons essayé tout au long de la manipulation de minimiser les variations d'humidité des différents pots par un arrosage uniforme et journalier. De plus, nous avons mesuré l'humidité du sol au moment de la récolte pour voir si elle avait un effet sur le ratio MSA/BR. Dans nos conditions expérimentales cette humidité n'a pas eu d'effet significatif. Par ailleurs la séparation entre sol rhizosphérique et sol non adhérent aux racines a été effectuée aussi uniformément que possible par l'utilisation d'une agitation standardisée. Par conséquent, la variabilité génétique qui existe au sein de la collection serait le principal facteur explicatif des variations notées sur la valeur moyenne du ratio MSA/BR entre lignées. On peut ainsi avancer que les différentes lignées de mil présentent des intensités d'agrégation rhizosphériques variables. Ceci corrobore les résultats de récentes études effectuées sur d'autres céréales. En effet, chez le blé, Delhaize et al (2012) ont montré une variabilité génétique de cette agrégation qui était liée à la longueur du chevelu racinaire. Une autre étude réalisée sur 144 lignées d'orge a démontré également une variabilité génétique de l'agrégation aussi bien en serre qu'au champ (George et al., 2014).

Dans le sous échantillon de 9 lignées que nous avons sélectionnées, nous pouvons distinguer deux groupes : un groupe présentant un faible ratio MSA/BR constitué par les lignées L8, L82, et L44 et un autre groupe à fort ratio constitué par les lignées L92, L12, L118, L14, L57, L39. Cependant dans le groupe des lignées à forte agrégation les positions relatives des différentes lignées changent entre les différentes expérimentations même si toutefois la distinction entre

les deux groupes de lignées reste nette. Cette variabilité du comportement de certaines lignées entre les expérimentations pourrait s'expliquer par des différences dans les conditions environnementales telles que l'ensoleillement et la température qui peuvent jouer sur la croissance, l'arrosage qui est susceptible de variations mais également la méthodologie de collecte du sol adhérent aux racines. En effet, cette technique a été adoptée sur plusieurs types de sols ayant des teneurs en argiles allant de 12 à 55% : cambric arenosol (Gouzou et al., 1993), eutric cambisol (Bezzate et al., 2000), distric cambisol (Alami et al., 2000), des argile-limoneux (Kaci et al., 2005) et vertisol (Amellal et al., 1998) alors que le sol que nous avons utilisé est très pauvre en argile (<3%) donc de potentiel d'agrégation intrinsèque relativement faible, réduisant ainsi la résolution de la méthodologie pour distinguer des lignées plus ou moins proches en termes d'agrégation rhizosphérique.

Le ratio MSA/BR a montré une corrélation négative avec la biomasse aérienne et avec le ratio BA/BR. Ceci semble indiquer que les lignées avec un ratio MSA/BR élevé alloueraient plus de carbone au compartiment souterrain (biomasse racinaire et exsudation). Ceci est cohérent et mériterait d'être analysé plus en détail dans le futur.

Au sein de la communauté microbienne du sol rhizosphérique de différentes espèces végétales, il a été isolé des souches bactériennes capables d'augmenter l'agrégation rhizosphérique après leur inoculation sur des plantes. On peut citer comme exemple *Rhizobium sp* qui augmente l'agrégation du sol rhizosphérique chez le tournesol (Alami et al., 2000), *Pantoea agglomerans* (Amellal et al., 1998) qui a le même effet après inoculation sur du blé ou le cas de *Paenibacillus polymyxa* chez le blé (Bezzate et al., 2000). Ainsi parmi les facteurs qui pourraient expliquer la variabilité génétique de l'agrégation il y a la stimulation différentielle de ces bactéries productrices d'EPS par ces lignées de mil sous l'influence de l'exsudation racinaire. En effet, l'exsudation racinaire impacte directement la structure des communautés microbiennes (Paterson et al., 2007) or il a été démontré que celle-ci est susceptible de varier en fonction de la lignée (Czarnota et al., 2003; Micallef et al., 2009).

Ainsi nous avons essayé de collecter des éléments pour tester l'hypothèse du rôle des bactéries productrices d'EPS dans les phénomènes d'agrégation en isolant des souches productrices d'EPS dans la rhizosphère de ces différentes lignées. D'abord, la densité des bactéries cultivables dans la rhizosphère ne présente pas de variabilité significative entre les différentes lignées de mil. Ce résultat confirme celui de Chiarini et al (1998) obtenu sur divers cultivars de maïs cultivés dans plusieurs types de sols. Cependant une autre étude a montré que le nombre de bactéries et

de champignons cultivables dans la rhizosphère du concombre variait de façon significative entre des variétés résistantes et des variétés sensibles à la fusariose (Yao and Wu, 2010).

En outre, il n'a pas été noté de relation évidente entre le nombre de souches de bactéries productrices d'EPS isolées dans la rhizosphère et l'intensité de l'agrégation rhizosphérique. En effet, ces souches productrices d'EPS putatives ont été isolées aussi bien dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation que dans celle des lignées à faible agrégation. Ainsi dans la rhizosphère de la lignée L44 (lignée avec un faible ratio MSA/BR), nous avons isolé 22 souches alors que pour les lignées L118 et L57 (Lignées à fort ratio MSA/BR) nous avons isolé respectivement 7 et 11 souches. Par conséquent, dans nos conditions, il n'a pas été possible de trancher sur un lien entre la variabilité de l'agrégation racinaire des différentes lignées et la présence de bactéries cultivables productrices d'EPS. Ceci pourrait être lié au fait que toutes les bactéries impliquées dans le processus d'agrégation n'ont pas pu être isolées durant notre culture sur boîte de Pétri. En effet il a été rapporté que seulement entre 1 et 10% des micro-organismes vivant dans le sol étaient cultivables dans les milieux artificiels (Torsvik et al., 1996). Par ailleurs, on ne peut pas exclure à ce stade que cette variabilité du ratio MSA/BR puissent être liée au moins en partie à l'interaction avec les champignons du sol. En effet, de récentes études ont mis en évidence le rôle important des champignons mycorhiziens à arbuscules sur l'agrégation rhizosphérique à travers la sécrétion de glycoprotéines (telles que les glomalines) capables de modifier la structure du sol (Li et al., 2015; Wu et al., 2014, 2015).

Conclusion :

Cette étude a montré que les caractéristiques génétiques du mil ont un impact sur l'agrégation du sol rhizosphérique en conditions de serre. Ainsi le ratio MSA/BR que nous avons utilisé comme indicateur de l'intensité des interactions rhizosphériques des lignées étudiées peut varier d'un facteur 3 environ entre certaines lignées. L'analyse quantitative de l'abondance des bactéries cultivables (CFU) et celle qualitative de la présence de bactéries productrice d'EPS dans la rhizosphère, n'ont pas permis de mettre en relation leur densité ou leur diversité avec l'agrégation autour des racines des lignées sélectionnées. Pour aller plus loin il serait pertinent d'étudier la densité et la structure de la communauté bactérienne totale du sol rhizosphérique de ces lignées contrastées avec des techniques plus résolutive, telles que le séquençage en parallèle à haut débit du gène 16S de l'ARN ribosomique à partir d'extrait d'ADN du sol, ainsi que le permettent les nouvelles technologies de séquençage (NGS).

***Chapitre III : Diversité et activités microbiennes
rhizosphériques de différentes lignées de mil
cultivées en conditions semi contrôlées***

Introduction :

Les communautés microbiennes du sol présentent une très grande diversité taxonomique et fonctionnelle et jouent un rôle clef dans les cycles des nutriments et les interactions biotiques vis-à-vis des plantes (Raaijmakers et al., 2009). Les plantes terrestres sont en association avec un microbiome complexe particulièrement au niveau de la rhizosphère qui est la zone du sol qui subit l'influence des racines. La structure et les caractéristiques de ces communautés microbiennes dépendent de plusieurs facteurs abiotiques telles que les caractéristiques physico-chimiques du sol (Peiffer et al., 2013) mais aussi de facteurs biotiques notamment liés à la présence des racines des plantes. Ces interactions avec les plantes impliquent fortement les exsudats racinaires qui peuvent affecter la structure et l'activité des communautés microbiennes (Paterson et al., 2007). En effet les facteurs d'origine végétale qui peuvent influencer les communautés microbiennes du sol rhizosphérique sont multiples et variés. Nous pouvons en citer l'espèce végétale (Costa et al., 2006; Haichar et al., 2008; Turner et al., 2013), le niveau de développement ou l'âge de la plante (Baudoin et al., 2002; Micallef et al., 2009; Mougel et al., 2006) mais également les caractéristiques génétiques intra-spécifiques de la plante (Aira et al., 2010; Bouffaud et al., 2012; Peiffer et al., 2013; Zancarini et al., 2012).

Dans le chapitre précédent, il a été mis en évidence chez le mil une variabilité génétique de l'intensité de l'agrégation du sol rhizosphérique à travers celle du ratio MSA/BR. Cependant cette variabilité de l'agrégation rhizosphérique n'avait pas de lien direct avec l'abondance des bactéries productrices d'exo-polysaccharide que nous avons pu isoler dans la rhizosphère de lignées contrastées. Par ailleurs, il est généralement admis que 98% des micro-organismes ne sont pas cultivables (Nihorimbere et al., 2011). Il, nous a donc paru intéressant d'étudier et de comparer la densité et la diversité des communautés microbiennes totales de sols rhizosphériques de ces lignées contrastées, ainsi que leur activité respiratoire qui constitue un indicateur global et intégratif du fonctionnement de la communauté.

L'objectif de ce chapitre est donc de vérifier s'il existe une variabilité de structure, de diversité et d'activité globale des communautés microbiennes rhizosphériques de ces différentes lignées de mil, ainsi que de tester s'il existe un lien entre ces paramètres des communautés microbiennes et l'agrégation du sol autour des racines. Ainsi la densité des communautés bactériennes et fongiques a été étudiée par la technique de la PCR quantitative (qPCR) en utilisant les amorces 16S et 18S. Cette technique nous permet d'estimer le nombre de cellules microbiennes dans un échantillon en donnant une mesure du nombre de copies du gène cible

par gramme de sol (Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011; Smith and Osborn, 2009). La structure quant à elle sera étudiée par les nouvelles technologies de séquençage massif de l'ADN (NGS) en ciblant les sous unités ribosomiques 16S pour les bactéries et 18S pour les champignons. Cette nouvelle approche nous permet non seulement de comparer la diversité des différents échantillons mais également d'accéder à leur composition taxonomique. Quant à l'activité microbienne, elle sera évaluée par le technique Microresp™ qui donne une indication de l'activité respiratoire du sol après ajout de substrats carbonés (respiration induite). Cette technique a été utilisée car elle ne nécessite pas une grande quantité de sol (moins de 0,5 g dans chaque essai) et est compatible avec la quantité de sol adhérent aux racines récupérée dans nos essais, qui est relativement faible après 4 semaines de croissance.

III.1- Matériel et Méthodes

III.1.1- Matériel biologique

Les 9 lignées contrastées sélectionnées au chapitre II ont été choisies pour cette étude. Elles ont été semées en serre dans le même sol que celui du phénotypage des lignées (sol de Bambeby ; confère **tableau 1**) et un dispositif expérimental en randomisation comportant 4 répétitions pour chaque traitement a été utilisé.

III.1.2- Culture et échantillonnage du sol rhizosphérique

Après les semis, l'arrosage et l'entretien des jeunes plantes ont été faits dans les mêmes conditions que celles du criblage. Après quatre semaines de croissance en serre les plantes ont été dépotées et pour chaque lignée de mil et quatre échantillons de sol adhérent aux racines ont été collectés sur 4 pieds différents. Quatre autres échantillons de sol témoins ont été également récoltés à partir de pots contenant du sol nu insérés dans le dispositif. Après échantillonnage, tous les échantillons ont été conservés au congélateur (-20°C) jusqu'à leur utilisation.

III.1.3- Extraction de l'ADN du sol rhizosphérique

Pour l'étude de la densité et de la structure des communautés microbiennes totales des sols rhizosphérique de ces lignées de mil, nous avons extrait l'ADN génomique total de ces échantillons de sol que nous utiliserons comme matrice pour la PCR quantitative et le séquençage massif. Cet ADN total a été extrait à partir de 0,25 g de chaque échantillon de sol en utilisant le kit commercial « *FastDNA SPIN Kit for soil* » (Q-Biogene, Illkirch, France) suivant les directives du fabricant. Les échantillons de sol sont d'abord mélangés avec des

détergents (978 μL de *Sodium phosphate Buffer* et 122 μL de *MT buffer*) et des billes de céramique et de silice avant d'être secoués pendant deux cycles de 30 s à une vitesse de 6 m.s^{-1} avec l'homogénéiseur MP FastPrep®-24. Ceci permet de lyser les cellules bactériennes afin de mettre l'ADN en suspension. Ensuite une centrifugation à 14000 g a été effectuée pendant 5 minutes à une température de 5°C afin de pouvoir récupérer le surnageant qui contient l'ADN. Pour éliminer les protéines, ce surnageant a été mélangé avec 1,5 mL d'une solution nommée PPS (*Proteine Précipitation Solution*) qui permet de fixer les protéines qui seront éliminées dans le culot avec une deuxième centrifugation. Après ceci, une matrice contenant de la résine nommée *DNA Binding Matrix* a été ajoutée à notre solution. L'ADN fixé à cette résine a été lavé avec une solution de guanidine thiocyanate à 5,5 M. Une nouvelle centrifugation a été effectuée par la suite pour ne garder que la matrice qui contient l'ADN. Enfin cette matrice a été lavée avec une autre solution du Kit (SEWS + éthanol pure) avant d'être éluée dans 100 μL d'eau ultra pure. L'ADN extrait de chaque échantillon a été dosé par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ND- 1000 UV-Vis Spectrophotometer, Labtech).

III.1.4- PCR quantitative

La densité des communautés microbiennes dans la rhizosphère de ces lignées de mil a été étudiée par la quantification des gènes 16S et 18S par la technique de PCR en temps réel (Fierer et al., 2005). Cette approche est maintenant considérée comme une méthode précise et culture-indépendante pour l'étude des communautés microbiennes du sol (Smith and Osborn, 2009). L'amplification a été effectuée avec un appareil CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA) en utilisant le SYBR green comme fluorophore.

Pour l'étude de la communauté bactérienne totale, la PCR a été effectuée dans un volume final de 10 μL contenant 0,5 μM de chaque amorce du couple 341 F (5' -CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')/515R (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3'), 5 μL de SsoAdvanced SYBR Green mix (Biorad, USA), 2,5 ng d'ADN matrice et de l'eau ultra pure stérile. Le programme comprend une dénaturation pendant 10 minutes à 98°C suivie par 39 cycles constitué d'une étape de 98°C pendant 5 secondes et d'une autre de 60°C pendant 30 secondes. Dans chaque plaque PCR, nous avons rajouté des échantillons standard constitués à partir de plasmide digéré contenant une quantité d'ADN 16S de *Escherichia coli* variant entre 10^8 à 10^3 copies. Ceci nous permettra de tracer les courbes standard qui seront utilisées pour calculer le nombre de copies du gène ribosomique 16S dans nos échantillons environnementaux. La spécificité de la réaction

a été vérifiée par l'analyse des courbes de fusion des produits PCR ; fusion réalisée en fin de cycle en augmentant la température de 0,5°C toutes les 5 secondes de 55 à 95°C.

La densité de la communauté fongique totale a été également étudiée avec le couple d'amorces 18S : FR1(5'AICCATTC AATCGGTAIT 3') / FF390 (5'CGATAACGAACGAGACCT 3'). La PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 10 µL contenant 5 µL de *SYBR MIX SSO advanced* (Biorad, USA), 2,5 ng d'ADN matrice et de l'eau ultra pure stérile. Après une dénaturation initiale à 98°C pendant 2 minutes, nous avons effectué 39 cycles comprenant 3 étapes : 98°C pendant 5 secondes, 58°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes. La calibration a été effectuée en utilisant des standards constitués à partir de plasmide contenant le gène 18S de *Saccharomyces cerevisiae*. Comme pour le 16S, une étape de fusion a été réalisée afin de vérifier la spécificité des produits PCR en traçant les courbes de fusion.

III.1.5- Analyse de la diversité microbienne par séquençage NGS

La structure des communautés microbiennes 16S et 18S a été étudiée par séquençage NGS sur les extraits d'ADN des sols rhizosphériques de ces 9 lignées de mil. Le séquençage a été effectué par la société MR DNA (503 Clovis Rd. Shallowater, TX, USA) à l'aide du séquenceur *Ion Torrent PGM* (Life technologie Corp) suivant les instructions du fournisseur.

Pour la communauté bactérienne totale, la région V4 de l'ADN ribosomique 16S a été ciblée avec les amorces 515F/806R (Caporaso et al., 2011). La PCR a été effectuée en utilisant le kit réactionnel *HotStarTaq Master Mix* (Qiagen, USA) dans les conditions suivantes : 94°C pendant 3 minutes, suivi par 28 cycles constitués d'une étape de 94°C pendant 30 secondes, d'une étape de 53°C pendant 40 secondes et de 72°C pendant 1 minute. Une étape d'élongation finale de 72°C pendant 5 minutes a été rajoutée à la fin de ces 28 cycles.

Pour la communauté fongique, les amorces 18S (SSU-fungi-545F TGGAGGGCAAGTCTGGTG/ SSU-Fungi-1021R TCGGCATAGTTTATGGTTAAG) ont été utilisées (Hume et al., 2012) pour la PCR réalisée dans les conditions suivantes : 94°C pendant 3 minutes, suivi par 28 cycles constitué de 94°C pendant 30 secondes, de 53°C pendant 40 secondes et de 72°C pendant 1 minute. Une étape d'élongation finale de 72°C pendant 5 minutes a été rajoutée à la fin de ces 28 cycles. Les amplicons de tous les échantillons ont été mélangés dans les mêmes concentrations et purifiés en utilisant le kit *AMPure beads* (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA) avant d'être séquencés par l'appareil **Ion torrent PGM** (Life technologie Corp).

L'analyse des données issues du séquençage a été effectuée en utilisant le logiciel QIIME (Quantitative Insight In Microbial Ecology) version 1.8 (Caporaso et al., 2011). Pour les bactéries, nous avons d'abord effectué un "nettoyage" en filtrant les séquences qui avaient un score-qualité inférieur à 25, les séquences de longueur inférieure à 200 paires de bases ainsi que les séquences contenant des défauts au niveau de la zone d'amorce et des homopolymères. De même, les séquences chimères sont soustraites de l'analyse avant que celles restantes ne soient attribuées à un échantillon. Ensuite des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) ont été définies par la méthode *de novo* avec Usearch, implémenté dans QIIME (Edgar, 2010). Les séquences représentatives des OTUs ont été alignées en utilisant l'algorithme PyNAST avec un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 80%. (Caporaso et al., 2010a). L'assignement taxonomique a été effectué sur les OTUs représentatives grâce à la base de données Greengenes (DeSantis et al., 2006) en utilisant la méthode de Blast RDP avec un pourcentage de similarité de 97%. La composition taxonomique des bactéries a été déterminée avec le script *taxa summary* jusqu'au niveau genre. Les indices de diversité alpha (nombre d'OTUs, indice de Chao1, indice de Shannon, diversité phylogénétique (PD_whole)) ont été calculés en tirant de manière répétitive (10 fois) sur 40 870 séquences dans chaque échantillon (raréfaction) pour corriger l'effet éventuel sur ces paramètres de la variabilité du nombre de séquences entre les échantillons. Pour les champignons, les OTUs ont été également définies par la méthode *de novo picking* implémentée dans QIIME (Edgar, 2010). Les séquences représentatives des OTUs ont été alignées en utilisant l'algorithme PyNAST avec un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 80% (Caporaso et al., 2010a). L'attribution taxonomique a été effectuée par comparaison des OTUs à la base de données Silva (Quast et al., 2013). La composition taxonomique en champignons a été déterminée avec le script *taxa summary* jusqu'au niveau genre. Les indices de diversité alpha (nombre d'OTUs, indice de Chao1, indice de Shannon, la diversité phylogénétique PD_whole) ont été calculés sur 5949 séquences pour chaque échantillon (raréfaction).

III.1.6- Abondance des bactéries productrices d'EPS dans le sol rhizosphérique des lignées

Par ailleurs, nous avons cherché à retrouver les bactéries isolées dans le chapitre II dans la communauté totale 16S caractérisée par le séquençage NGS. Pour ce faire nous avons utilisé le logiciel BLAST (version 2.3.0+) de NCBI pour aligner les séquences de ces isolats contre la table OTU dérivée du séquençage NGS. Seules les séquences d'isolats avec une longueur minimale de 700 paires de bases ont été considérées dans cette analyse. Un pourcentage de

similarité supérieur ou égal à 97% a été fixé pour valider la correspondance entre une souche bactérienne et une OTU. Ainsi il a été effectué une comparaison de l'abondance de ces isolats dans la rhizosphère de ces différentes lignées de mil et dans le sol témoin.

III.1.7- Activité respiratoire microbienne

L'activité respiratoire du sol rhizosphérique de ces 9 lignées de mil a été mesurée par la technique MicroResp™ system (Bao et al., 2015; Campbell et al., 2003) sur les mêmes échantillons de sol qui ont servi à l'analyse de la diversité microbienne en utilisant le glucose et le saccharose comme substrats carbonés. Pour chaque échantillon de sol, 3 répétitions de 0,3 g ont été pesées et déposées dans les puits profonds des grandes plaques Microresp™. Dans chaque puits nous avons ajouté 30 µL d'eau distillée pour ramener l'humidité du sol à 20%. Ensuite les plaques ont été fermées et incubées à 20°C à l'obscurité pendant une semaine pour retrouver la réponse cinétique normale après une perturbation. Nous avons préparé des substrats avec antibiotiques (bronopol + streptomycine (poids/poids: 1)) à une concentration de 0,2 µg.mg⁻¹ de sol dans chaque puits et des substrats sans antibiotiques afin de pouvoir discriminer la contribution des bactéries et des champignons dans la respiration totale (Sassi et al., 2012). Ensuite, on a ajouté dans chaque puits 30 µL du substrat correspondant (glucose, glucose + antibiotiques, saccharose, saccharose + antibiotiques) équivalant à 10 µg de substrat carboné par mg de sol et une quantité équivalente d'eau distillée dans les puits témoins (pour la respiration basale). Les plaques ont été immédiatement recouvertes par d'autres microplaques dites de détection contenant un mélange (v/v:2) de gel agar à 3% et d'un indicateur coloré (KCl: 16,77 g.L⁻¹; NaOH :0,315 g.L⁻¹ et Rouge de Cresol : 18,75 mg.L⁻¹). Des joints ont été placés entre les grandes et les petites plaques pour assurer l'étanchéité des puits aux gaz et leur individualité. Les ensembles ont été incubés à 28°C pendant 6 h. Ainsi le CO₂ dégagé par l'activité respiratoire du sol provoque un changement de couleur du gel contenu dans les puits de détection. Ce changement proportionnel à la quantité de CO₂ absorbée est mesuré par un lecteur de microplaques en spectrophotométrie d'absorption ($\lambda = 570$ nm ; 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer, modèle Victor3). L'évolution du taux de CO₂ a été calculée grâce à la formule de calibration suivante obtenue avec une gamme de CO₂ variant de 0,1 à 4% :

$$\%CO_2 = 0.008478 \pm 0.000829 * EXP(6.810098 \pm 0.150851 * (T_0 - T_{6h})), r^2 = 0.96, p < 0.001, n = 175$$

Pour obtenir les valeurs de la quantité de CO₂ dégagée par gramme de sol sec et par heure (µg C-CO₂ g⁻¹.sol.h⁻¹), on applique la formule suivante basée sur les constantes de gaz, le volume de

l'espaces gazeux dans le système étant de 1,2 mL, la température d'incubation de 28°C et le poids du sol sec dans les puits étant de 0,3 g :

$$\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}.\text{sol}.\text{h}^{-1} = \% \text{ CO}_2 * 12 * 0,5 / 0,3 \cdot 0,5 \text{ étant} = \text{nombre de mol de gaz dans 1,2 mL}$$

pour une température de 28°C



Figure 8: Principe de la technique MicroResp™ (crédit photo : www.MicroResp.com). (A) plaque de détection montée sur une plaque à puits profonds contenant les échantillons de sol par l'intermédiaire d'un joint (en bleu). (B) Zoom individuel sur un puit

III.1.8- Analyse statistique :

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel XLSTAT version 2016 (Addinsoft SARL, Paris, France). Après avoir testé la normalité des données (test de Shapiro) et l'homoscedasticité (Test de Levene) de la variance, nous avons effectué une analyse de variance (ANOVA) pour comparer les moyennes du nombre de copies 16S par gramme de sol, l'abondance des souches de bactéries productrices d'EPS à partir des données NGS, et de la masse de CO₂ dégagé par gramme de sol entre les différents traitements. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différents indicateurs de diversité alpha (Indice de Shannon, l'estimateur Chao1, le nombre d'OTUs et la diversité phylogénétique PD_{whole}) des communautés microbiennes pour les différents traitements.

III.2- Résultats

III.2.1- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la communauté bactérienne.

III.2.1.1- La densité de la communauté bactérienne rhizosphérique

La densité des communautés bactériennes associées à la rhizosphère des 9 lignées de mil sélectionnées a été mesurée en évaluant le nombre de copies du gène de l'ARN ribosomique 16S dans 1 g de sol rhizosphérique. Les résultats ont montré que le sol témoin avait un nombre de copies du gène 16S significativement moins important que le sol rhizosphérique des lignées de mil L44 et L118 ($p < 0,05$). Par ailleurs aucune différence significative n'a été notée sur ce nombre de copies du gène 16S en comparant les sols rhizosphériques des différentes lignées de mil. Enfin, la moyenne du nombre de copies 16S dans les sols rhizosphériques des lignées de mil est significativement plus importante que celle des échantillons de sol témoin ; respectivement $9,2 \times 10^8 > 5,7 \times 10^8$ copies.g⁻¹sol , $p < 0,05$, (**Figure 9**).

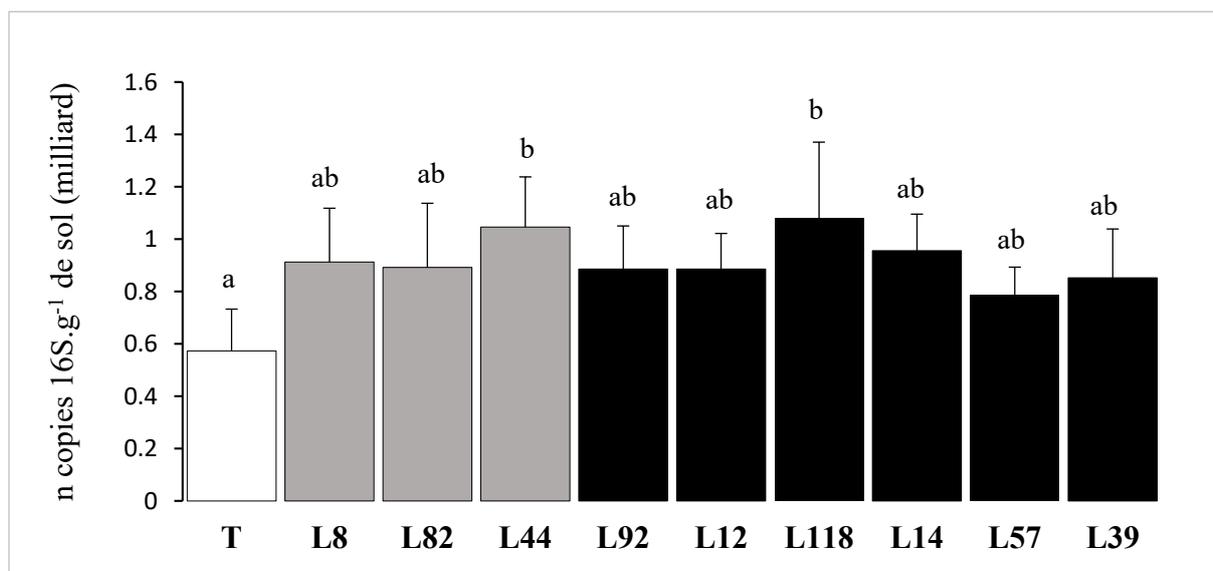


Figure 9: Densité de la communauté bactérienne totale dans le sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et dans le sol control (T). Chaque Histogramme représente la moyenne des 4 répétitions. Les barres représentent les écarts-types. Les différentes lettres indiquent les différences significatives entre les différents traitements.

III.2.1.2- Diversité des communautés bactériennes rhizosphériques des lignées de mil

L'ADN total extrait du sol rhizosphérique de ces 9 lignées a servi de matrice pour le séquençage massif du gène 16S de l'ADN ribosomique. Au total, $2,56 \times 10^6$ séquences, correspondant à 22780 OTUs ont été obtenues. Ce qui correspond à une moyenne de 64072 séquences par échantillon. Le nombre de séquence 16S était de 58314 pour le sol témoin et variait entre 58427

pour L92 et 72849 pour L82. Pour comparer la richesse en OTU, comme le nombre de séquences était variable d'un extrait à l'autre, la diversité alpha a été mesurée en effectuant une raréfaction des données c'est-à-dire un tirage aléatoire et itératif d'un nombre $n=40870$ de séquences sur lequel les indices d'alpha-diversité seront calculés (Caporaso et al., 2010b). La richesse en OTU de chaque échantillon en fonction de la profondeur du séquençage (courbe de raréfaction) est représentée sur la **Figure 10**. Les indicateurs de diversité alpha mesurés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 4: Indicateurs de la diversité alpha bactérienne du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 40870 séquences a été retenue. Les (*) indiquent des différences significatives avec le sol témoin (T) en utilisant le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Traitement	PD whole tree	chao1	OTU	Shannon Index
T	733 ± 39	38294 ± 4644	12266 ± 630	10.87 ± 0.16
L8	623 ± 14	32300 ± 9673	10341 ± 2385	* 10.32 ± 0.48
L82	664 ± 23	34574 ± 1464	* 10836 ± 493	* 09.89 ± 0.42
L44	* 643 ± 18	33676 ± 642	* 10548 ± 318	* 10.04 ± 0.32
L92	668 ± 22	33935 ± 3047	11141 ± 339	10.59 ± 0.08
L12	734 ± 21	39013 ± 2693	12183 ± 368	10.83 ± 0.08
L118	650 ± 21	32865 ± 1533	10730 ± 404	10.38 ± 0.17
L14	699 ± 34	36703 ± 3983	11566 ± 617	10.71 ± 0.11
L57	686 ± 31	35028 ± 3529	11399 ± 555	10.58 ± 0.17
L39	723 ± 4	38834 ± 1205	11965 ± 111	10.71 ± 0.07

Les indices de diversité de Shannon de la communauté bactérienne totale des trois lignées à faible ratio MSA/BR (L8, L82 et L44) sont significativement moins importants que celui du sol nu témoin (respectivement $p=0,04$; $p=0,02$; $p=0,02$ test de Kruskal Wallis). Le nombre d'OTUs est significativement plus important dans le sol témoin que dans les sols rhizosphériques des lignées L82 et L44 (respectivement $p=0,04$; $p=0,02$, test de Kruskal Wallis). En outre la diversité phylogénétique (PD) est significativement plus importante dans le sol témoin que dans le sol rhizosphérique de la lignée L44 ($p=0,02$; test de Kruskal Wallis). En ce qui concerne l'indicateur de richesse spécifique Chao1, aucune différence significative n'a été noté entre le sol témoin et les sols rhizosphériques de ces 3 lignées à faible ratio MSA/BR mais la tendance est la même que pour les autres indicateurs. Cependant pour les six autres lignées présentant des ratio MSA/BR moyens à élevés, aucune différence significative n'a été noté avec le sol témoin pour l'ensemble des indicateurs. Par ailleurs nous notons que le sol témoin affiche

toujours une plus grande diversité alpha que les sols rhizosphériques des lignées de mil et ceci quel que soit l'indicateur de diversité alpha considéré.

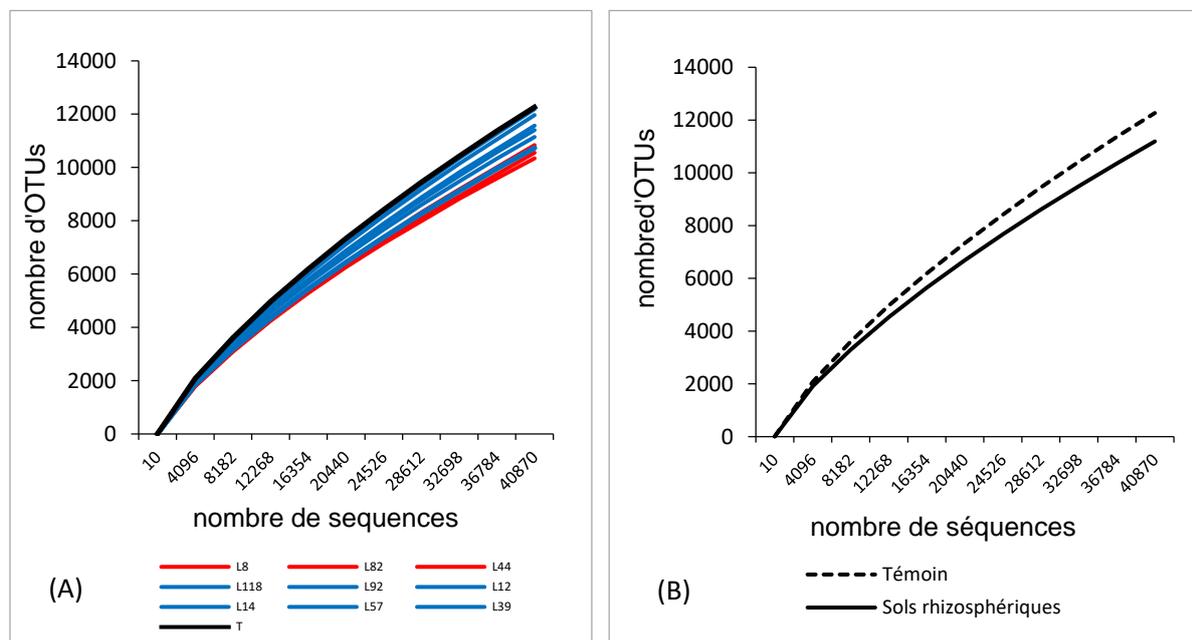


Figure 10: Courbes de raréfaction des OTUs de bactéries des sols rhizosphériques (et du sol témoin) à 40870 séquences pour chaque échantillon : (A) pour les différents traitements (lignées à faible ratio MSA/BR en rouge et lignées à fort ratio MSA/BR en bleu) ; (B) pour les sols rhizosphériques des 9 lignées de mil vs sol nu (Témoin).

Pour étudier la bêta-diversité (diversité entre les échantillons) la méthode de calcul des distances phylogénétiques *Weighted UniFrac* (Lozupone and Knight, 2005) a été choisie dans le logiciel QIIME. Ces distances ont été utilisées dans une Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) dans le but de déterminer s'il existe une structuration des communautés bactériennes en fonction du niveau d'agrégation évalué par le ratio MSA/BR. Cependant la **Figure 11** montre qu'il n'y pas de regroupement des différentes lignées en fonction du niveau d'agrégation de leur sol rhizosphérique car la lignée L82 (faible ratio) est séparée de toutes les autres lignées, la lignée L118 (fort ratio) et la lignée L44 (faible ratio) forment un cluster indépendant du grand cluster qui regroupe à la fois des lignées à fort ratio (L92, L12, L57, L39, L14), la lignée L8 (faible ratio) et le sol témoin. Par contre la méthode de calcul des distances *Unweighted Unifrac* qui est plus sensible aux espèces rares (Lozupone et al., 2011) permet de séparer assez nettement les échantillons témoins (sols nus) des échantillons de sols rhizosphériques dans le plan factoriel F1*F2 sur la **Figure 12**. Les lignées à fort ratio et celles à faible ratio ne se séparent pas franchement sur cette analyse. Cependant on peut noter que les échantillons issus de lignées à faible agrégation apparaissent en moyenne plus éloignés du cluster sol témoin tandis que les

lignées présentant les agrégations les plus élevées (L14, L57, L39) en sont les plus proches. Ceci n'est pas incohérent avec les données relevées sur la diversité alpha.

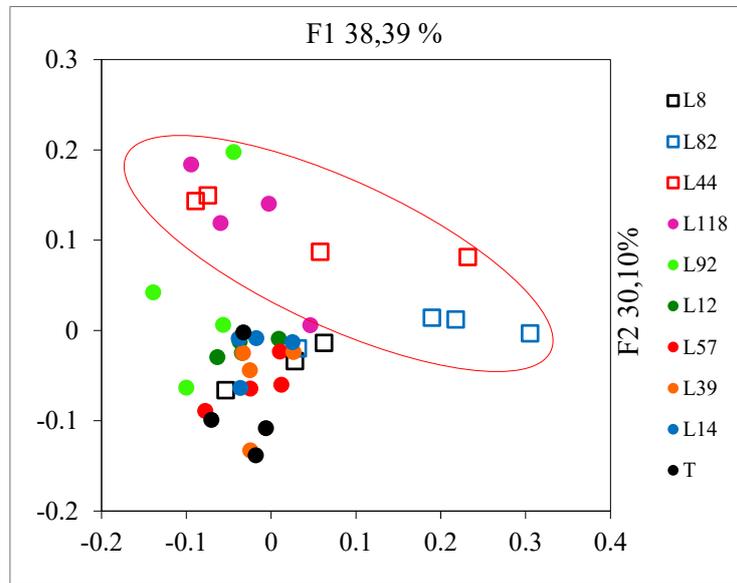


Figure 11: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions weighted UniFrac obtenu après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin (T). Les lignées à faible agrégation sont représentées en carré et les lignées à forte agrégation en cercle.

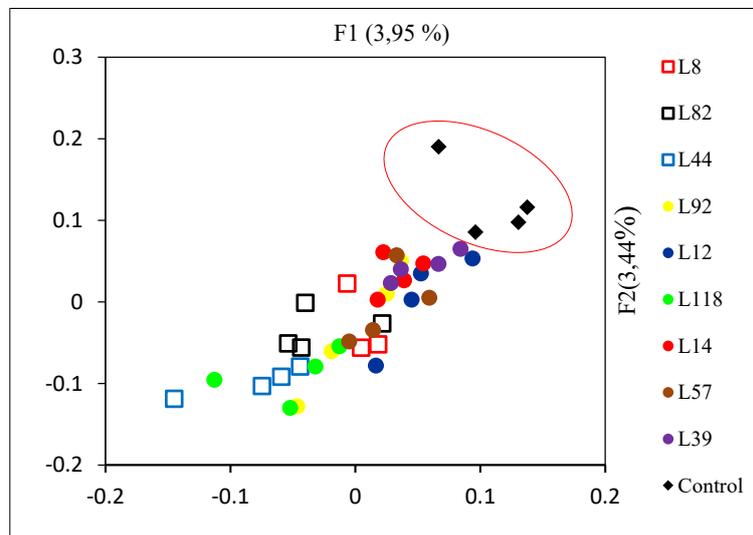


Figure 12: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions unweighted UniFrac obtenu après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin. Les lignées à faible agrégation sont représentées en carré et les lignées à forte agrégation en cercle.

III.2.1.3- Composition taxonomique de la communauté bactérienne du sol rhizosphérique des lignées de mil

La composition taxonomique bactérienne des différentes lignées de mil a été étudiée à plusieurs niveaux taxonomiques. Pour tous les traitements, les phyla dominants (abondance relative >20%) ont été les *Protéobactéries*, les *Firmicutes* et les *Actinobactéries* ensuite viennent les phyla dont l'abondance est comprise entre 20 et 1% constitués par les *Bacteroidetes*, les *Acidobacteria*, les *Chloroflexi*, les *Planctomycetes* et les *Gemmatimonadetes*. Des phyla dits rares (abondance < 1%) comme les *Parcubacteria* (précédemment appelés OD1), les *Chlamydiae* et les *Elusimicrobia* ont été également retrouvés (**Figure 13**). En outre, les trois lignées à faible agrégation rhizosphérique (L8, L82 et L44) sont moins riches en *Protéobactéries* (33,9 vs 38,4 %, $p < 0,02$, Test de Kruskal Wallis) et plus riches en *Firmicutes* (27,5 vs 18,1 % , $p < 0,002$, Test de Kruskal Wallis) que les lignées à forte agrégation.

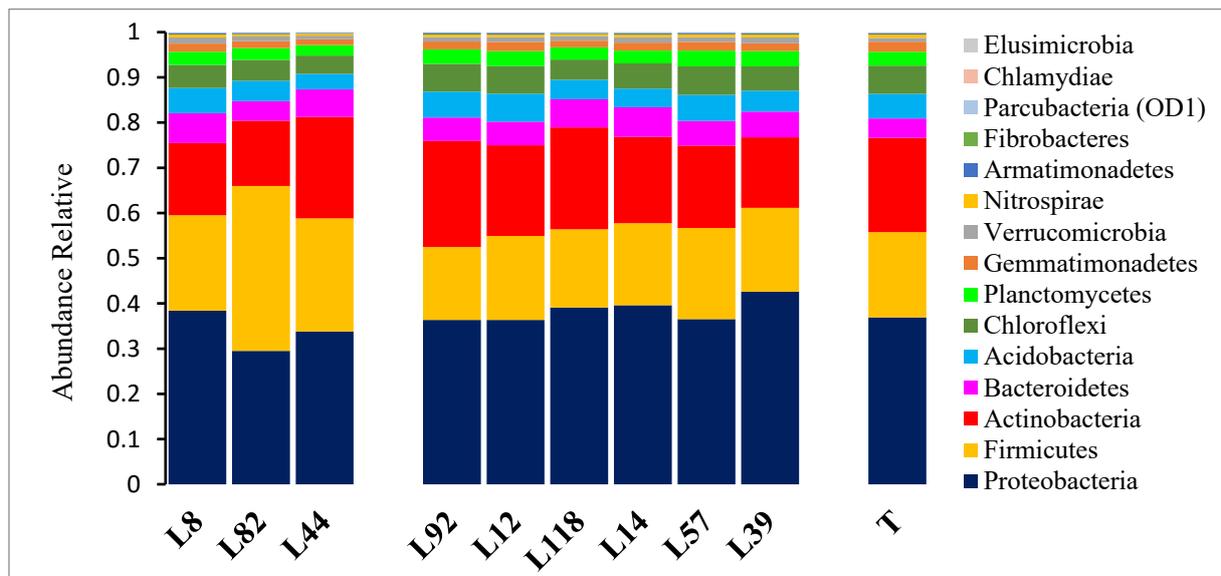


Figure 13: Abondance relative des 15 phyla bactériens les plus abondants dans le sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T).

Au niveau des ordres, les taxons les plus représentés sont les *Bacillales* (*Firmicutes*), les *Rhizobiales* (*Proteobacteria*) et les *Actinomycetales* (*Actinobacteria*) qui représentent à eux seuls 60-70% de la diversité des bactéries en fonction des traitements. Dans la même logique que les tendances notées dans les différents phyla, l'ordre des *bacillales* est moins représenté dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation rhizosphériques que chez les lignées à faible agrégation (27,6 % vs 39,8 %, t test $p < 0,05$) alors que pour les *Rhizobiales* nous avons une tendance inverse à celle des *bacillales* (22,2 % vs 17,4 %, t test $p < 0,02$). Cet enrichissement du sol rhizosphérique des lignées à faible agrégation en *Firmicutes* (*bacillales*) peut être

également illustré par la **Figure 14** dans laquelle l'abondance relative en *bacillales* par rapport au sol nu été déterminée par soustraction de l'effectif de ce dernier à celui du sol rhizosphérique de chacune des neuf lignées.

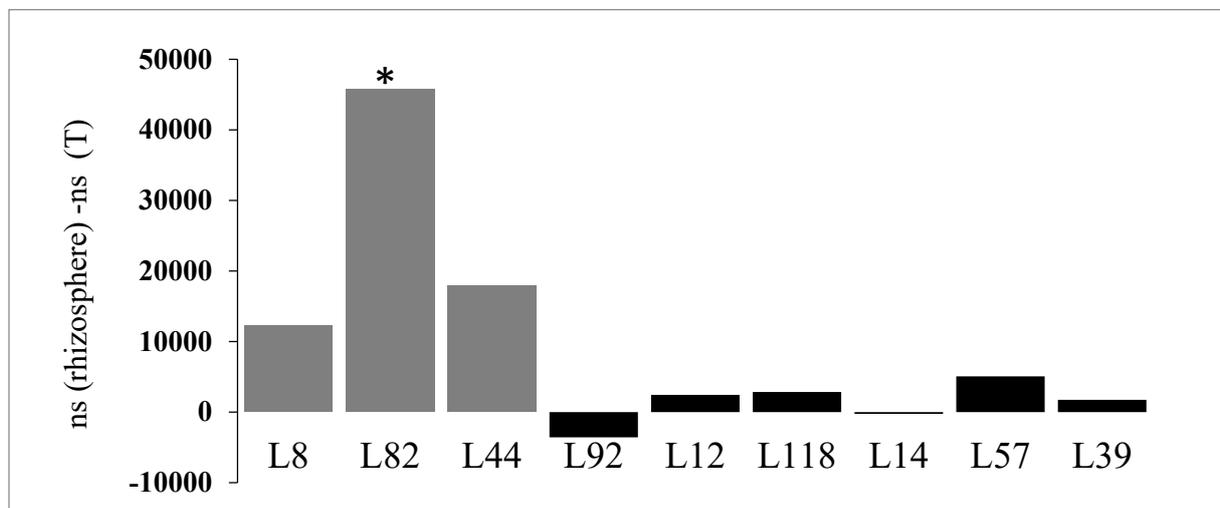


Figure 14: Différences du nombre de séquences des *bacillales* entre le sol rhizosphérique des 9 lignées et le sol témoin (T), ns : nombre de séquences. Le caractère (*) indique la différence significative entre le sol control et le traitement L82 en utilisant le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

III.2.2- L'abondance des bactéries productrices d'EPS dans les données NGS

Le **tableau 5** suivant donne les résultats du « Blast » des séquences des souches de bactéries productrices d'EPS isolées (au chapitre I) sur la table OTU obtenue après le séquençage du gène 16S réalisé sur les extraits d'ADN des échantillons de sol rhizosphérique des 9 lignées. Par rapport au ratio MSA/BR, il n'apparaît pas de différence massive et univoque dans l'occurrence de ces bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère de ces lignées de mil. Si l'on considère les lignées à faible agrégation, comparé au sol témoin, le sol rhizosphérique de la lignée L44 est particulièrement enrichi en souches du genre *Arthrobacter*, *Microbacterium* et dans les espèces *Ochrobactrum pseudogrignonense*, *Rhizobium pusense* and *Variovorax paradoxus*. Le sol rhizosphérique de la lignée L82 est enrichi en souches du genre *Bacillus* alors que la lignée L8 est enrichie en *Protéobactéries* de genres *Rhizobium* et *Variovarax*. Pour deux lignées à forte agrégation (L92 et L118), on a noté une augmentation de l'abondance de 3 souches du genre *Arthrobacter*. Par ailleurs, une augmentation de l'abondance de la souche *Rhizobium pusense* a été également notée dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation L14 et L118. La lignée L118 se démarque des autres lignées à forte agrégation du fait de son enrichissement en *Arthrobacter* (3 espèces), en *Pseudomonas* (2 espèces) et en *Rhizobium pusense*. Les lignées L14, L57 et L39 ne présentent un enrichissement que pour la souche *Variovorax paradoxus*.

Tableau 5: Résultats du blast des séquences des isolats dans les données de séquençage NGS. Dans la colonne 2, il est indiqué le nombre d'OTUs différentes qui s'alignent avec les souches de bactéries à un pourcentage de similarité minimal de 97%. Les colonnes 2 jusqu'à 10 donnent les abondances moyennes cumulées de ces OTUs dans les différents traitements. Les lettres différentes sur les lignes indiquent les différences significatives entre les traitements ($p < 0,05$ Test de Fisher). Les valeurs en gras indiquent les différences significatives avec le sol témoin (T). *M.* = *Microbacterium* ; *A.* = *Agrobacterium*

Strains	OTUs	Bit score	L8	L82	L44	L92	L12	L118	L14	L57	L39	T
<i>Arthrobacter pascens/A.globiformis</i>	49	[357;490]	603,75 a	632,5 a	2146,25 b	1604 b	711,5 a	1836,5 b	294 a	375,5 a	252,75 a	83,75 a
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	48	[399;483]	460,25 ab	601,25 ab	1238,75 c	930 bc	614 ab	1345 c	311,75 a	363,5 ab	256,75 a	148 a
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	2	[457;479]	33 ab	77,5 bc	152 de	110 cd	39,5 ab	217,5 e	29,5 ab	42,25 abc	24,5 ab	3,25 a
<i>Bacillus megaterium NBRC 15308</i>	59	[427;484]	1168,5 a	2671,75 a	1295,25 a	562,75 a	737,25 a	825,5 a	595,5 a	698 a	583,75 a	431 a
<i>Bacillus megaterium/B.arabhattai</i>	86	[431;494]	1959,25 a	4602,5 b	2216,5 a	938 a	1240,25 a	1321 a	1014,75 a	1170,25 a	991,25 a	741,25 a
<i>Bacillus tequilensis</i>	8	[448;488]	42,25 ab	91,25 b	52,75 ab	68,5 ab	51,5 ab	78,5 ab	61 ab	46,5 ab	28,25 a	33,25 a
<i>Paenibacillus polymyxa SC2</i>	4	[466;486]	49,25 ab	18,25 ab	55,25 b	5,75 a	17,25 ab	16 ab	10,75 ab	8,75 a	16,75 ab	13,5 ab
<i>Paenibacillus polymyxa E681</i>	4	[357;381]	41 ab	16,25 ab	50,75 b	4,75 a	15,75 ab	14 ab	9,5 ab	6,5 a	15 ab	11,5 ab
<i>M. paraoxydans/M.barkeri</i>	1	407	1 ab	1,25 ab	2,5 b	1,25 ab	1,75 ab	1,25 ab	2,25 ab	1,5 ab	0,75 ab	0,5 a
<i>Exigobacterium indicum</i>	1	460	0,75 a	0,75 a	1 a	0,5 a	4,5 a	1 a	0 a	0 a	0,25 a	0,25 a
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2	[460;494]	7 a	36,25 ab	15,5 a	105,25 b	8,75 a	26,5 a	4,25 a	1,75 a	29 a	3,5 a
<i>Pseudomonas monteilii</i>	9	[422;488]	94 ab	34,75 ab	19 ab	54,25 ab	44,5 ab	321,25 b	7,25 a	4 a	126 ab	4 a
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	2	[466;499]	3 a	0 a	20,5 b	0,25 a	1,5 a	1,75 a	1,75 a	0 a	1,25 a	0,25 a
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	2	[473;483]	5,25 ab	6,5 ab	14,25 b	9 ab	9,5 ab	11,25 ab	0 a	2,25 a	5,25 ab	1 a
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	10	[427;494]	104,75 ab	35,5 ab	42,75 ab	57,25 ab	48 ab	328,25 b	14,5 a	4,5 a	133,75 ab	4,5 a
<i>Variovorax paradoxus S110</i>	5	[327;470]	29 cd	9 ab	31 d	9,25 ab	9,75 ab	16 abc	19,25 bcd	19,25 bcd	23,5 cd	4 a
<i>Rhizobium pusense/A.fabrum</i>	6	[466;488]	105,5 bc	81,5 ab	163,25 cd	84,25 ab	98,25 abc	220,5 d	102 bc	64,25 ab	81,5 ab	27,25 a
<i>Corynebacterium ilicis</i>	8	[366;490]	44,75 ab	102 bc	201,5 de	155,5 cd	53,75 ab	296,5 e	39 ab	58 ab	32,5 ab	3,75 a

III.2.3- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la communauté fongique

III.2.3.1- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la densité fongique

Le nombre de copies par gramme de sol du gène 18S fongique ne varie pas significativement entre le sol nu témoin et les sols rhizosphériques de 8 des 9 lignées de mil ($p > 0,05$). Cependant, dans la rhizosphère de la lignée L39 (lignée à fort ratio MSA/BR), nous avons un nombre de copies 18S significativement plus important que dans le sol témoin et dans le sol rhizosphérique des 8 autres lignées de mil (**Figure 15**).

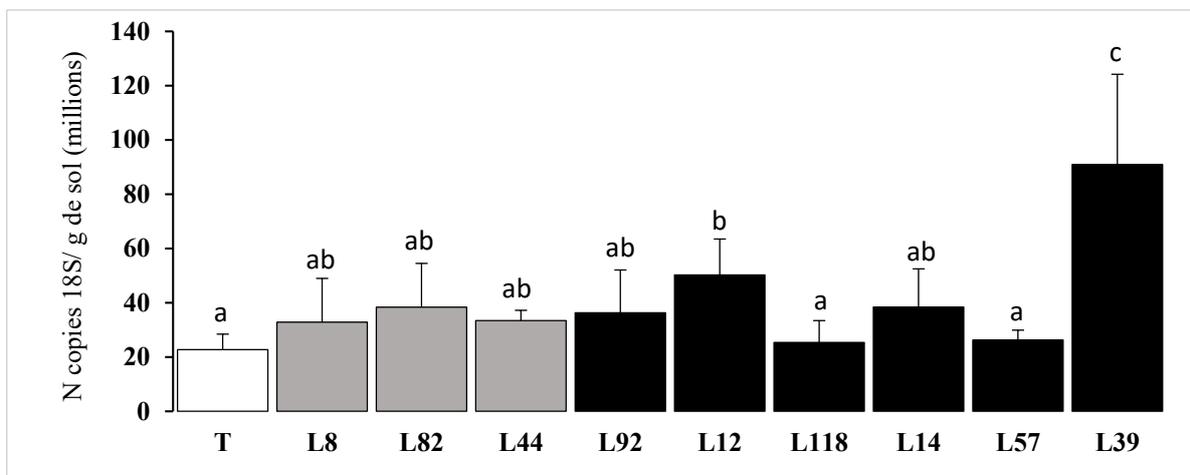


Figure 15: Densité de la communauté fongique dans le sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T). Chaque Histogramme représente la moyenne des 4 répétitions. Les barres représentent les écart-types. Les lettres différentes indiquent les différences significatives entre les traitements.

III.2.3.2- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la diversité fongique.

- **La diversité alpha**

Le séquençage de l'ADN ribosomique 18S sur les extraits d'ADN de sols rhizosphériques de ces 9 lignées de mil a donné au total 614509 séquences correspondant à 38846 OTUs différentes. Le nombre de séquences 18S était en moyenne de 14772 pour le sol témoin (sol nu) et variait entre 12077 (L14) et 26303 (L82) pour les sols rhizosphériques. Comme pour l'étude de l'alpha-diversité bactérienne, une raréfaction des données a été effectuée avec le logiciel QIIME pour calculer les indicateurs de diversité sur ces échantillons qui présentent un nombre de séquences très variable. Ainsi la raréfaction a été effectuée jusqu'à 5940 séquences, profondeur à laquelle les estimateurs de diversité ont été calculés. La richesse en OTU de chaque échantillon en fonction de la profondeur du séquençage (courbe de raréfaction) est représentée dans la **Figure 16**. Le **tableau 6** donne les indices de diversité alpha mesurés.

Tableau 6: Indicateurs de la diversité alpha fongique du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 5940 séquences a été retenue. Les lettres identiques indiquent l'absence de différence significative entre les différents traitements avec le test de Kruskal-Wallis.

Traitement	PD_whole	chao1	OTU	Shannon
T	146 ± 28 a	5367 ± 1587 a	2005 ± 464 a	8,95 ± 0,63 a
L8	174 ± 09 a	6636 ± 281 a	2208 ± 120 a	8,91 ± 0,40 a
L82	130 ± 29 a	4633 ± 1113 a	1487 ± 285 a	6,74 ± 0,50 a
L44	148 ± 33 a	5682 ± 1829 a	1962 ± 550 a	8,58 ± 1,38 a
L92	179 ± 07 a	6955 ± 820 a	2314 ± 180 a	9,21 ± 0,35 a
L12	135 ± 15 a	4717 ± 723 a	1733 ± 327 a	8,24 ± 0,94 a
L118	164 ± 28 a	6516 ± 1660 a	2184 ± 513 a	8,87 ± 1,33 a
L14	162 ± 12 a	6347 ± 498 a	2302 ± 155 a	9,33 ± 0,30 a
L57	169 ± 17 a	6868 ± 728 a	2416 ± 233 a	9,40 ± 0,60 a
L39	145 ± 28 a	5486 ± 1490 a	1777 ± 453 a	8,12 ± 0,91 a

Pour l'ensemble des traitements aucune différence significative n'a été notée sur les 4 indicateurs de diversité que nous avons calculés sur les communautés fongiques. Cependant dans les tendances on note que la diversité alpha estimée par l'indice de Shannon et la richesse en OTU sont moins importantes pour les sols rhizosphériques de 2 des lignées à faible agrégation (L82 et L44) que pour le sol témoin. On peut noter également que les sols rhizosphériques des lignées L92, L14 et L57 (lignées à forte agrégation) ont des indicateurs de diversité alpha plus élevés que ceux du sol témoin.

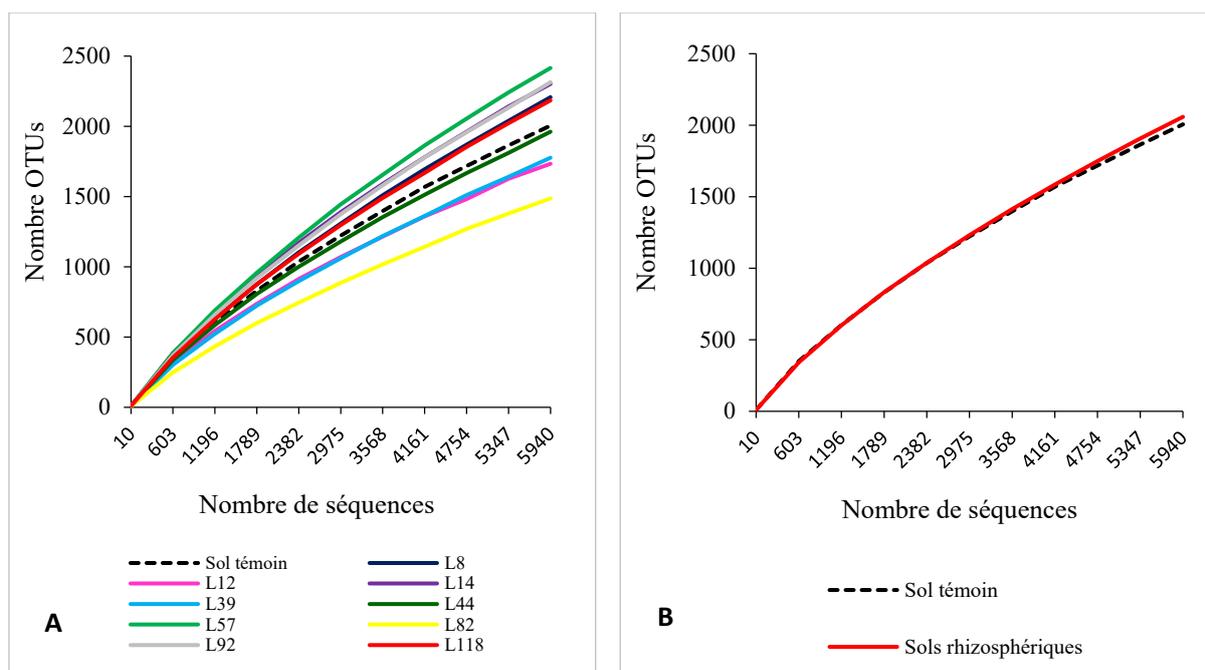


Figure 16: Courbes de raréfaction du nombre d'OTUs de champignons rhizosphériques (et du sol témoin) à 5940 séquences pour chaque échantillon : (A) pour les différents traitements ; (B) pour les sols rhizosphériques des 9 lignées de mil et pour le sol témoin (T).

• La Béta-diversité fongique

La bêta diversité ou diversité relative des échantillons de sol a été évaluée sur les sols rhizosphériques des 9 lignées de mil et sur le témoin par le calcul des distances phylogénétiques en utilisant toujours les méthodes Weighted and Unweighted UniFrac (Lozupone and Knight, 2005). Comme pour le cas de la communauté bactérienne des analyses en coordonnées principales ont été réalisées avec les matrices de distances et les différents échantillons ont été projetés dans le plan factoriel formé par les deux premiers axes F1 et F2 (**Figures 17 et 18**). Avec la méthode Weighted Unifrac, la projection dans le plan formé par les deux premières composantes totalisant 65% de distribution, ne montre aucun regroupement cohérent des différentes lignées quant à leur comportement en termes d'agrégation rhizosphérique. Mais également on remarque que les échantillons de sol témoin ne sont pas séparés de ceux des sols rhizosphériques. De même, la méthode de calcul de distance Unweighted Unifrac ne permet pas de séparer les échantillons de sol rhizosphériques selon les niveaux d'agrégation.

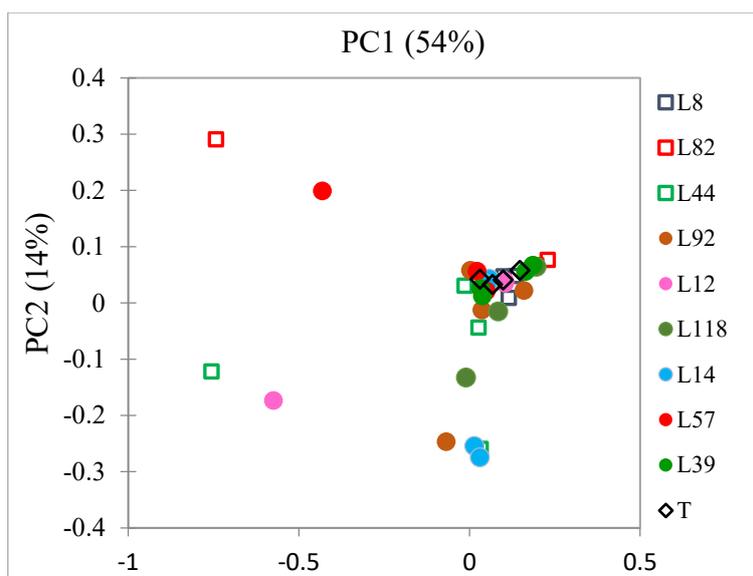


Figure 17: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions weighted UniFrac obtenue après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 18S du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin (T).

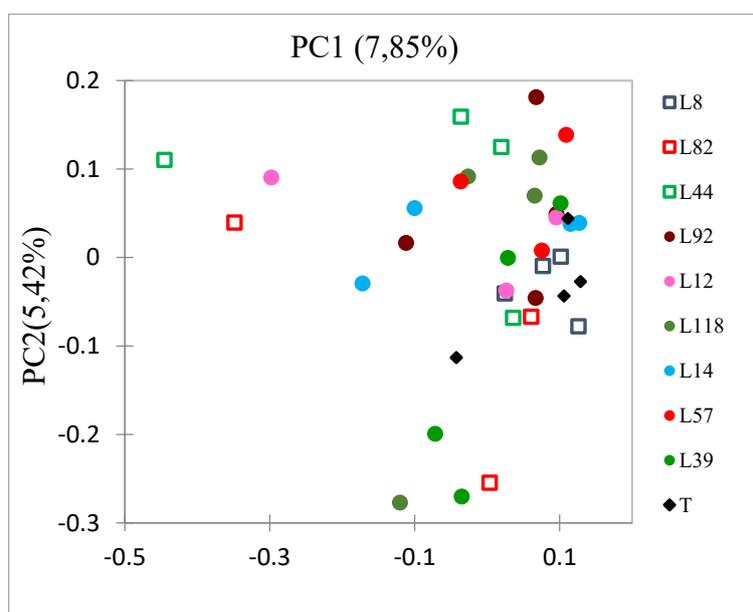


Figure 18: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions unweighted UniFrac obtenu après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 18S du sol rhizosphérique des 9 lignées de mil et du sol témoin (T).

III.2.3.3- La composition taxonomique fongique :

- Au niveau des phyla :

Le phylum des *Ascomycota* représente plus de 77% de la biodiversité des champignons retrouvés dans nos différents traitements (sols rhizosphériques et sol témoin). Comparé au sol témoin avec 78%, on note un enrichissement en *Ascomycota* dans la rhizosphère des lignées L92, L57, L39, L118 et L82 avec respectivement 82,86%, 90,18%, 87,42% ; 91,13% et 95,33

%. A contrario les phyla des *Chytridiomycota* et des *Blastocladiomycota* sont moins représentés dans la rhizosphère de toutes les lignées à l'exception de celle de la lignée L8 où on ne note pas de changement majeur par rapport au sol témoin. Le phylum des *Gloméromycota* a été particulièrement stimulé dans la rhizosphère des lignées L8 (0,15%), L39 (0,11%), L14 (0,25%) et L57(0,32%) en comparaison au sol témoin dans lequel il représente 0,07%. En outre, un enrichissement dans le groupe *Fungi incertae sedis* (Champignon dont la position systématique n'est pas encore clairement définie) a été noté dans la rhizosphère des lignées L44, L92, L12 et L14 voir (Figure 19).

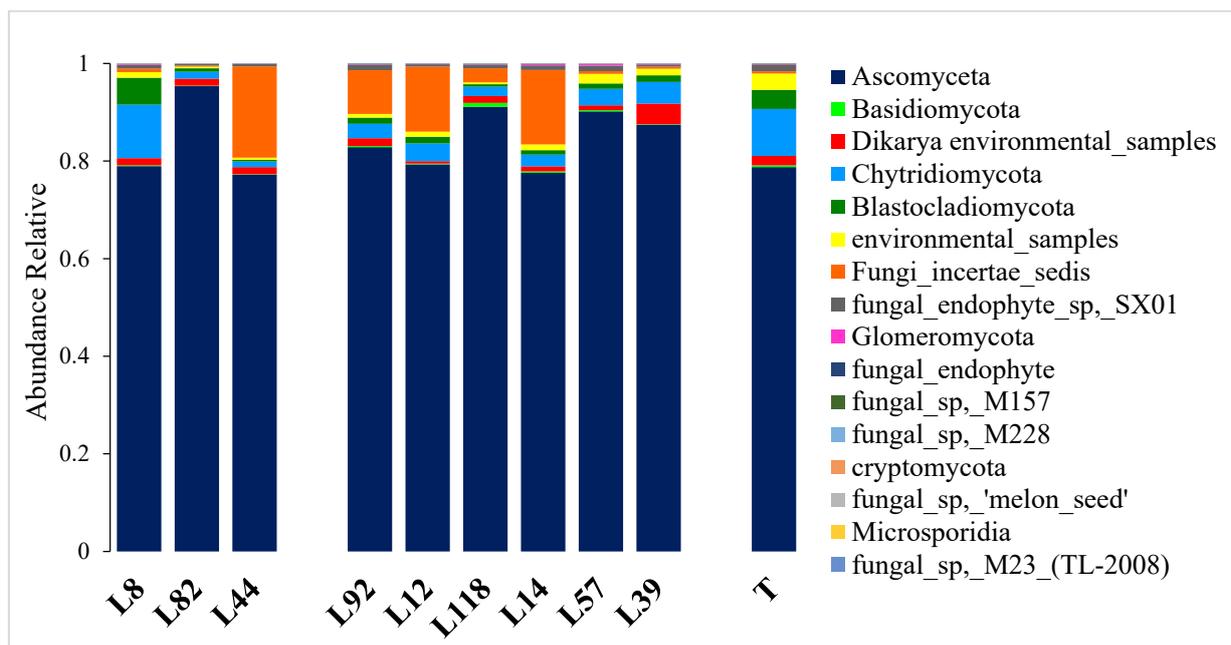


Figure 19: Abondance relative des différents phyla de champignons retrouvés dans la rhizosphère des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T)

- **Au niveau Sous embranchement et classe :**

Pour tous les traitements (sols rhizosphériques et sol témoin), le sous embranchement des *Pezizomycotina* (*Euascomycota*) représente plus de 67 % de la biodiversité des champignons. Cependant le sol rhizosphérique de la lignée L82 en est beaucoup plus riche (91 %) que les sols provenant des autres lignées et le sol témoin (68 %). Par ailleurs, les sols rhizosphériques des lignées L92, L57 L39 et L118 sont également enrichis en *Pezizomycotina* comparés au sol témoin. Pour la classe des *chytridiomycota_environment samples*, on a noté une déplétion dans les sols rhizosphériques de toutes les lignées (abondance < 4%) par rapport au sol témoin (abondance =7,2%) à l'exception de la lignée L8 chez laquelle un léger enrichissement a été enregistré (abondance = 8,5%). La classe des *Glomeromycètes* est également stimulée dans les sols rhizosphériques des lignées L8, L14 et L57 avec respectivement 0,14, 0,23 et 0,29 % par rapport

au sol témoin dans lequel son abondance est de 0,06%. Les abondances relatives des autres classes sont renseignées sur la **Figure 20**.

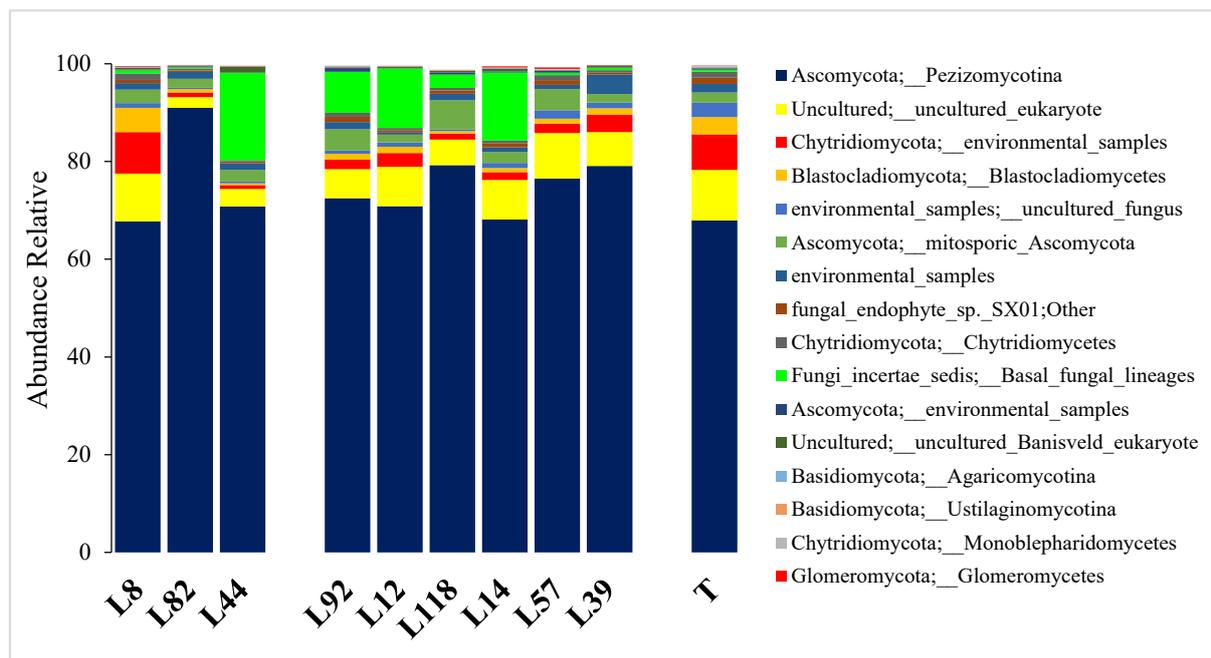


Figure 20: Abondance relative des 16 classes de champignon les plus abondantes retrouvées dans la rhizosphère des 9 lignées de mil et dans le sol témoin (T)

III.2.4- Impact des caractéristiques génétiques du mil sur la respiration rhizosphérique

La respiration microbienne induite par l'ajout de substrats carbonés au sol rhizosphérique des lignées de mil ne présente pas de variabilité significative en fonction de la nature de ce substrat (Glucose ou saccharose) ($p > 0,05$). Avec le saccharose, seule la lignée L118 présente une respiration rhizosphérique significativement plus importante que celle du sol témoin (sol nu). En outre, cette même lignée présente une respiration rhizosphérique plus importante que celle des lignées L8, L82 et L57. Avec le glucose comme substrat, l'intensité de la respiration est plus importante dans les sols rhizosphériques des lignées L82, L92, L12, L118, L39 que dans le sol témoin. Par ailleurs, le sol rhizosphérique de la lignée L118 a montré une respiration rhizosphérique plus intense que celui des lignées L8, L14 et L57 (**Figure 21**).

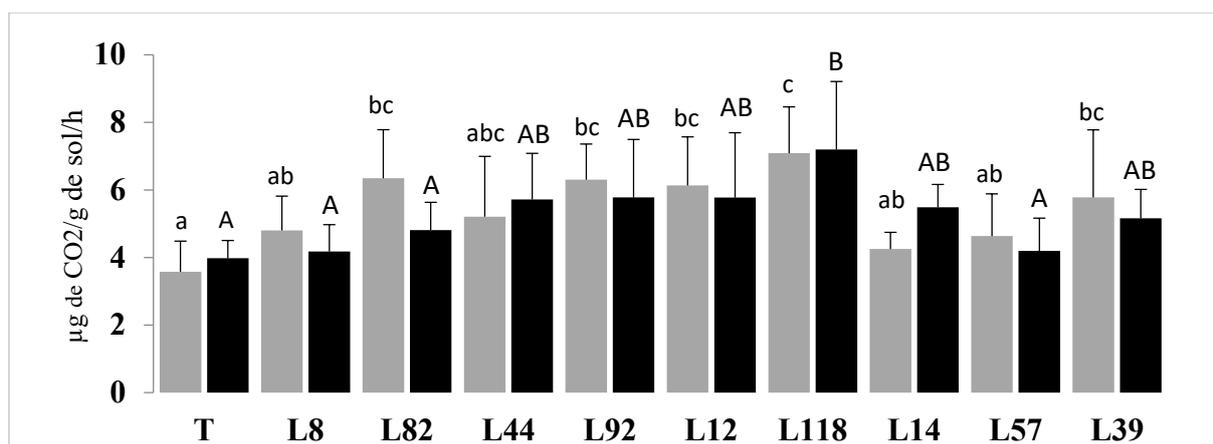


Figure 21: Activité respiratoire microbienne induite par le Glucose (gris) et par le Saccharose (noir) du sol rhizosphérique des 9 lignées et du sol témoin (T). Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres représentent les écart-types. Les lettres minuscules et majuscules différentes donnent les différences significatives entre les traitements respectivement avec le glucose et avec le saccharose.

Dans le but de différencier la part relative des bactéries et des champignons dans la respiration microbienne totale, des antibiotiques ont été ajouté aux différents substrats. Ainsi l'intensité de la respiration fongique induite par le glucose (glucose+antibiotiques) n'est pas significativement différente entre les différents traitements (sols rhizosphériques et le sol témoin) à l'exception de la lignée L118 qui montre une activité respiratoire significativement plus importante que celle du sol témoin ($p < 0,05$). Par contre avec le saccharose (saccharose+antibiotiques), cette activité respiratoire fongique n'est pas significativement différente entre les différents traitements ($p > 0,05$) (Figure 22).

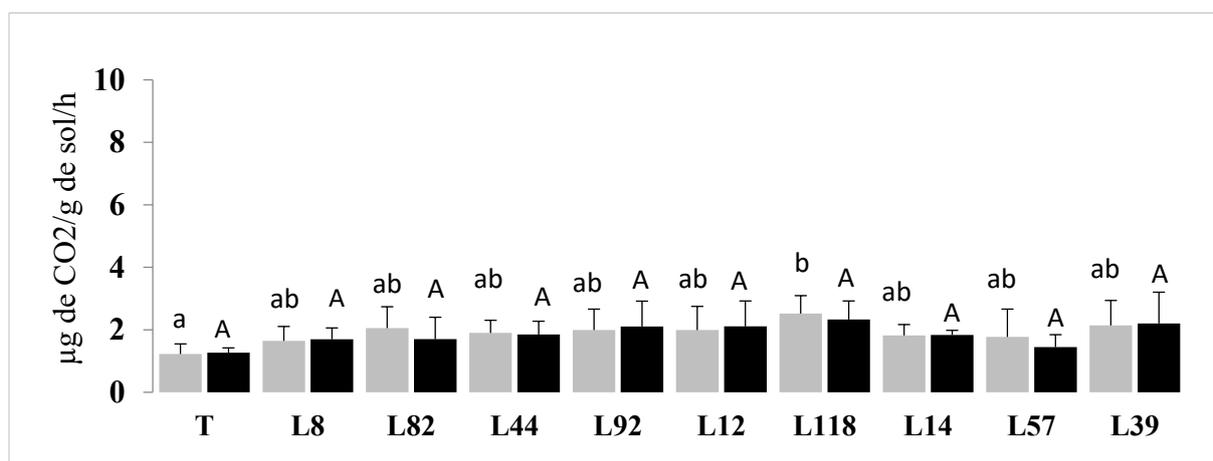


Figure 22: activité respiratoire fongique induite par le Glucose (gris) et par le Saccharose (noir) du sol rhizosphérique des 9 lignées et du sol témoin (T). Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres représentent les écart-types. Les lettres minuscules et majuscules différentes donnent les différences significatives entre les traitements respectivement avec le glucose et avec le saccharose.

III.3- Discussion :

III.3.1- Impact des traits génétiques du mil sur la communauté bactérienne rhizosphérique

La mesure de la densité des communautés bactériennes effectuée par qPCR d'une portion du gène 16S de l'ADN ribosomique a montré une densité bactérienne plus importante au niveau de la rhizosphère des lignées de mil (moyenne 9.2×10^8) qu'au niveau du sol nu (5.7×10^8), $p=0,002$. Ce résultat est en parfait accord avec celui de Kielak et al (2008) qui rapporte une augmentation de la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique sous l'influence de différentes espèces végétales. Cependant pour les 9 différentes accessions de mil testées, il n'y a pas d'effet lignée significatif sur la densité de la communauté bactérienne totale. Un résultat similaire a été obtenu par Aira et al (2010) sur différents géotypes de maïs.

La diversité alpha mesurée à travers plusieurs indicateurs (Chao1, Indice de Shannon, la richesse en OTU et la diversité phylogénétique PD) est influencée par la présence de la céréale comme rapporté par Peiffer et al (2013). On observe une diminution de la diversité bactérienne dans le sol rhizosphérique, beaucoup plus importante chez les 3 lignées à faible agrégation rhizosphérique (L8, L82 et L44). Dans la rhizosphère, les plantes effectuent une sélection des communautés bactériennes grâce à l'exsudation racinaire (Paterson et al., 2007). Ainsi, cet effet différentiel des lignées de mil sur la diversité alpha de la communauté bactérienne rhizosphérique pourrait être expliqué par une variabilité génétique de l'exsudation racinaire comme cela a été démontré sur diverses variétés de riz (Aulakh et al., 2001), sur le sorgho (Czarnota et al., 2003) et sur *Arabidopsis thaliana* (Micallef et al., 2009).

En ce qui concerne la bêta-diversité bactérienne du sol, des travaux antérieurs ont rapporté qu'elle était affectée par la présence des racines. En effet dans le cas du maïs (cultivé au champ) l'analyse de cette diversité par le séquençage du gène ribosomique 16S a mis en évidence une séparation nette des échantillons de sol rhizosphérique par rapport au sol témoin (sol nu) dans le plan factoriel d'une analyse en coordonnées principales (Peiffer et al., 2013). De même, Panke-Buisse et al (2015) ont démontré l'effet de *B. napus* et d'*A. thaliana* sur la structure des communautés bactériennes de leurs sols rhizosphériques. Des résultats similaires ont été également obtenus en conditions de serre avec diverses accessions d'*Arabidopsis thaliana* dans une classification ascendante hiérarchique (HCA) basée sur l'analyse de la diversité bactérienne par la méthode RISA (Micallef et al., 2009) et dans une Analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur les distances phylogénétique UniFrac (Lundberg et al., 2012). Cependant

dans notre étude, la méthode de calcul des distances Weighted UniFrac entre les différents échantillons, ne permet pas de séparer clairement les échantillons de sol témoin des échantillons de sol rhizosphérique de la plupart des lignées (6/9) sur l'analyse en coordonnées principales (PCoA) représentée sur la **Figure 11**. Ainsi, les espèces abondantes qui sont principalement ciblées dans ce type d'analyse (Weighted UniFrac) ne seraient pas fortement affectées par les exsudats racinaires du mil. Ceci pourrait être expliqué par un temps de croissance végétale qui est relativement court dans nos conditions (4 semaines) pour permettre à l'exsudation racinaire de moduler cette bêta-diversité. Pour le cas du maïs (Peiffer et al., 2013) l'échantillonnage a été effectué au stade floraison dans une expérimentation au champ. Il se pourrait également que l'ampleur de la structuration dépende de l'espèce végétale en question car en étudiant l'effet de différents contextes rhizosphériques sur la diversité microbienne, Turner et al (2013) ont démontré que l'effet rhizosphère était beaucoup moins marqué chez le blé (une céréale, comme le mil) que chez le pois (légumineuse). Toutefois, la lignée L82, les lignées L44 et L118 se sont séparées du grand cluster formé par les échantillons de sol témoin et les 6 autres lignées de mil. Ceci semble indiquer que le génotype de certaines lignées peut conduire à un effet plus marqué sur la structure des communautés bactériennes rhizosphériques comme cela a été montré sur *Arabidopsis thaliana* (Micallef et al., 2009), sur le maïs, plante chez laquelle l'effet lignée expliquait 7% de la variabilité de la bêta-diversité (Peiffer et al., 2013) et sur la patate (Marques et al., 2014).

Par contre la séparation notée dans le seconde PCoA réalisée avec les distances Unweighted UniFrac, conférant à l'analyse une plus grande sensibilité aux espèces rares (Lozupone et al., 2011) semble indiquer que celles-ci différencieraient les sols rhizosphériques des échantillons de sol témoin. Cependant entre les échantillons de sol rhizosphériques des différentes lignées de mil, aucun regroupement net en lien avec le ratio MSA/BR n'a été noté et donc aucune tendance nette ne s'est dégagée par rapport à une éventuelle corrélation avec l'agrégation rhizosphérique. On observe toutefois une tendance à un regroupement des lignées à faible agrégation à une extrémité du nuage de projection, les sols témoins à une autre et certaines lignées à forte agrégation en position intermédiaire. Ceci mériterait d'être repris dans des études complémentaires.

En ce qui concerne la composition taxonomique, notre étude a mis en évidence une stimulation des *Firmicutes* sur les lignées L8, L82 et L44 (lignées à faible ratio) et une stimulation des *Protéobactéries* sur les lignées L92, L12, L118, L14, L57 et L39 (lignée à fort ratio). Un résultat comparable a été obtenu chez le maïs où l'abondance du complexe *Burkholderia sp* dans les

échantillons de sol rhizosphérique était variable en fonction du groupe génétique (Bouffaud et al., 2012). Cette modification de la composition bactérienne rhizosphérique de nos lignées pourrait être due à une variabilité de l'exsudation racinaire. En effet, une étude réalisée sur 8 accessions d'*Arabidopsis thaliana* a montré ce type de lien (Micallef et al., 2009). Une variabilité génétique des profils d'exsudation racinaire a par ailleurs été mise en évidence par chromatographie (HLPC) sur 7 accessions de sorgho (Czarnota et al., 2003), une céréale. Une telle étude mériterait donc d'être conduite également sur le mil.

III.3.2- Impact des traits génétiques du mil sur la communauté fongique rhizosphérique

Pour 8 des 9 lignées étudiées, la densité de la communauté fongique rhizosphérique évaluée par le nombre de copies 18S par gramme de sol n'a pas été significativement différente de celle du sol nu témoin. Par contre pour la lignée L39 (lignée a fort ratio MSA/BR) la densité de la communauté fongique rhizosphérique est significativement plus importante que celles du sol témoin et du sol rhizosphérique des autres lignées. Par ailleurs, on remarque dans les tendances une densité relativement plus importante pour les sols rhizosphériques que pour le témoin. Ces résultats semblent être en phase avec ceux obtenus sur l'analyse de l'alpha-diversité qui ne montrent aucune différence significative entre les différents traitements pour les divers indices de diversité calculés sauf la lignée L82 dont l'indice de Shannon est significativement plus faible que celui du sol témoin.

De même, l'analyse de la bêta-diversité n'a pas montré de séparation entre échantillons de sols rhizosphériques et échantillons témoins (sols nus). Ainsi ce résultat n'est pas conforme à celui de Wu et al (2016) qui, en étudiant la diversité fongique de la rhizosphère de *Pseudostellaria heterophylla* par le séquençage de l'ITS, ont montré une séparation des échantillons de sols rhizosphériques en clusters distincts de celui des échantillons de sols nus témoins. Ainsi, on peut en formuler plusieurs hypothèses pour expliquer cette divergence :

(1) L'influence de l'exsudation racinaire du mil et de *Pseudostellaria* sur la communauté de champignons pourrait être différente. En effet, les exsudats racinaires du mil pourraient être moins influents que ceux de *Pseudostellaria* sur la communauté fongique rhizosphérique.

(2) Dans notre expérimentation, le temps de croissance végétale avant prélèvement est court (4 semaines) pour permettre un effet perceptible de l'exsudation sur la diversité fongique si l'on sait que chez *Pseudostellaria*, l'étude a été effectuée sur le terrain donc avec un temps de

croissance plus long. En effet, Mougel et al (2006) ont montré que l'effet rhizosphère observé sur la structure de la communauté fongique rhizosphérique de *M. truncatula* était très net dans les stades reproductifs (tardifs) et moins évident dans les stades végétatifs (précoces).

(3) Il faut noter également que les amorces 18S utilisées dans notre étude ne donnent pas souvent une très grande diversité de la communauté fongique comparées aux amorces ITS qui sont maintenant de plus en plus utilisées pour cela.

III.3.3- Impact des traits génétiques du mil sur l'activité respiratoire induite du sol rhizosphérique

Les résultats de l'analyse MicroResp™ ont montré qu'il n'existe pas de différence significative entre la respiration induite par le Glucose et celle induite par le saccharose pour tous nos traitements. Un résultat similaire a été obtenu par Diakhaté et al (2016) sur des sols rhizosphériques de mil et de l'association mil et *Piliostigma reticulatum*. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité respiratoire due à la présence des racines du mil corrobore les résultats de Singh et al (2009) qui ont fait état d'une stimulation de la respiration et de la biomasse microbienne du sol sous l'influence de différentes espèces végétales. En effet, cette différence notée sur l'activité respiratoire entre les sols rhizosphériques et le sol nu pourrait s'expliquer par la décomposition des rhizodépôts qui augmente la quantité de substrat et donc de CO₂ dégagée (Nannipieri et al., 2007). Cependant, cette augmentation de la respiration sous l'influence de la plante est relativement faible dans notre étude. Ceci pourrait être lié à la pauvreté et la texture sableuse du sol que nous avons utilisé. En effet Lloyd et al (2016) ont montré qu'après 48 jours de croissance, *Pennisetum clandestinum* augmentait 6 fois l'activité respiratoire sur un sol argileux et 2 fois seulement sur un sol sableux.

Par ailleurs, si on compare les sols rhizosphériques au sol témoin, on s'aperçoit que l'effet rhizosphère est plus marqué avec le glucose qu'avec le saccharose car pour le premier substrat, l'intensité de la respiration dans la rhizosphère de 5 lignées sur les 9 (L82, L92, L12, L118, L39) est significativement plus importante que celle du sol témoin alors qu'en utilisant le saccharose comme substrat, seule la lignée L118 présente un effet rhizosphère significatif. Ainsi, ce résultat semble indiquer que les communautés microbiennes du sol rhizosphérique auraient une préférence au glucose (sucre simple) par rapport au sucrose (sucre polymérique) comme cela a été montré par Oren and Steinberger (2008) sur la respiration induite par divers substrats pour différents échantillons de sol provenant de diverses latitudes à travers le monde.

En outre, des différences ont été notées entre les sols rhizosphériques des différentes lignées sur l'activité respiratoire induite par le glucose. Un résultat comparable a été obtenu sur deux accessions de maïs (différentes par la composition de leur exsudats racinaire) sur lesquelles on a noté des différences sur l'intensité de l'activité respiratoire de leurs sols rhizosphériques (Aira et al., 2010). Ceci pourrait être lié à une structure et/ou une composition différente de leurs communautés microbiennes sous l'influence de cette exsudation racinaire qui modifierait la diversité fonctionnelle des sols rhizosphériques. En effet, Yao and Wu (2010) ont montré une variabilité des profils cataboliques et de la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère entre diverses variétés de concombre. Une autre étude plus récente a également mis en évidence une modification de la diversité fonctionnelle parallèlement à une modification de la diversité génétique microbienne (bactérienne et fongique) du sol rhizosphérique sous l'influence de l'association mil et *Piliostigma reticulatum* (Diakhaté et al., 2016).

Conclusion :

Cette étude montre que la communauté microbienne du sol est stimulée par la présence des racines de la céréale. Cependant, sa densité n'est quasiment pas affectée par la variabilité génétique du mil. Pour les bactéries de la rhizosphère, nous avons noté que de la diversité, de même que la composition de la communauté totale du sol rhizosphérique variaient en fonction de la lignée de mil. De plus on a noté que ces modifications étaient en relation avec l'intensité de l'agrégation rhizosphérique précédemment estimée sur ces lignées. Les lignées à forte agrégation portant une diversité bactérienne plus importante que les lignées à faible agrégation, ainsi que des proportions relatives différentes dans certains taxons bactériens (notamment Firmicutes et Protéobactéries). Pour ce qui est des champignons, les modifications de la diversité et de la composition sont difficilement perceptibles et donc aucune relation n'a pu être mise en évidence avec l'agrégation du sol. L'activité respiratoire microbienne quant à elle est stimulée par la présence des racines du mil mais ne présente aucune variabilité significative liée à la variabilité génétique du mil ou à l'intensité de l'agrégation.

Les résultats des chapitres 2 et 3 ont été publiés sous forme d'article dans la revue

Frontiers in Plant Science : voir annexe 5

*Chapitre IV : Diversité et activités microbiennes
rhizosphériques de différentes lignées de mil
cultivées au champ.*

Introduction :

En Afrique, le mil est principalement cultivé dans le sahel (Hausmann et al., 2012), région caractérisée par des sols pauvres en matière organique et souvent par des systèmes de culture à bas niveau d'intrants. Dans cette région, les paysans ont privilégié les variétés à cycle court qui sont plus adaptées à la faible pluviométrie de la zone (Vigouroux et al., 2011b). Cependant, malgré cette adaptation aux conditions arides, les rendements du mil sont très bas (moins de 1 tonne / hectare) par rapport à ceux des autres céréales. En effet dans cette zone, la plante puise l'eau et tous les nutriments dont elle a besoin dans les sols alors que ceux-ci sont caractérisés par une acidité et un faible contenu en éléments nutritifs (Brück et al., 2003) limitant ainsi fortement la production agricole.

Les interactions entre les variétés de mil sélectionnées et les micro-organismes du compartiment souterrain dans lequel divers type d'échanges ont lieu ne sont pas pris en compte. Cependant, ces micro-organismes du sol participent activement au recyclage de la matière organique et à la mise en disponibilité des nutriments au profit de la plante et sont impactés par la variabilité génétique des plantes. Cet impact de la plante sur ces micro-organismes a été noté chez le maïs (Peiffer et al., 2013), chez l'orge (Bulgarelli et al., 2015) mais également chez le mil comme en attestent les résultats du chapitre précédent.

Par ailleurs, il a été montré qu'à travers l'exsudation racinaire, les plantes peuvent modifier la disponibilité de certains nutriments comme le phosphore (Lambers et al., 2006), le zinc (Hoffland et al., 2006) et le fer (Ishimaru et al., 2007). Or le profil des produits sécrétés par les racines est variable en fonction du génotype de la plante (Czarnota et al., 2003; Micallef et al., 2009). Ainsi cette variabilité au niveau de l'exsudation racinaire pourrait impacter les activités microbiennes et donc le cycle des nutriments dans le sol. D'une part il a été montré que l'activité microbienne globale, de même que certaines activités enzymatiques (phosphatase et arylsulfatase) étaient plus importantes au niveau du sol rhizosphérique du mil cultivé au champ qu'au niveau du sol nu (Diakhaté et al., 2016). Ceci est lié en partie à la forte densité des micro-organismes au niveau rhizosphérique qui jouent un rôle important dans les processus biogéochimiques comme la minéralisation, la disponibilité des nutriments et le pH (Allison and Vitousek, 2005; Burns, 1982). D'autre part, un « effet lignée » a été noté sur certaines activités enzymatiques, sur la biomasse microbienne rhizosphérique corrélativement à une modification de la structure de communautés microbiennes rhizosphériques chez le maïs (Pathan et al., 2015).

Pour améliorer les rendements dans le moyen à long terme une des solutions pourrait être la sélection de variétés de mil qui à travers une stimulation de l'activité des communautés microbiennes augmentent la disponibilité des nutriments. Ainsi, il se pose la question de savoir si à travers le fonctionnement des racines, les lignées de mil diffèrent par leur aptitude à changer les conditions physico-chimiques et biologiques du sol qui influent sur la mobilisation de l'eau et des nutriments nécessaires pour assurer une bonne production.

Dans le chapitre précédent, il a été question de déterminer l'impact de la variabilité génétique du mil sur la diversité microbienne du sol rhizosphérique de 9 lignées cultivées en conditions semi-contrôlées. L'objectif de ce chapitre est d'étudier sur des échantillons de sol rhizosphérique de lignées de mil cultivées au champ, l'impact de cette variabilité sur la diversité et la densité des communautés microbiennes ainsi que sur les activités enzymatiques microbiennes qui agissent sur le cycle des nutriments essentiels. Ces analyses sur des échantillons de sol prélevés d'une expérimentation au champ permettraient à terme d'appréhender les relations éventuelles pouvant exister entre l'agrégation rhizosphérique, la diversité et l'activité des communautés microbiennes et les paramètres agronomiques de la céréale. Ces éléments permettront ensuite de tester dans quelle mesure les phénotypes liés à la variabilité rhizosphérique seraient des critères pertinents à proposer pour la sélection variétale.

IV.1- Matériel et méthodes :

L'analyse de la diversité et de l'activité microbienne du sol rhizosphérique a été effectuée sur 13 lignées de mil d'agrégation racinaire variables (ratios MSA/BR contrastées) cultivées au champ. Ces lignées ont été sélectionnées après le phénotypage d'un second lot de 181 lignées de mil comme cela a été effectué sur le premier lot de 86 lignées. En effet, ce lot a une population de lignées plus importante que le premier et donc sera beaucoup plus adapté pour des perspectives d'études de génétique d'association entre l'agrégation et le génotype pour la recherche de QTLs voire l'identification de gènes responsables de la variabilité observée. Ainsi ces 181 lignées ont d'abord été phénotypées selon le même protocole (semis, entretien, arrosage, récolte) que les 86 lignées du chapitre II. Cependant un dispositif expérimental constitué de 8 blocs successifs et contenant chacun un représentant de chaque lignée a été adopté. Ceci avait pour but de pouvoir cultiver toutes les lignées dans chaque bloc, ce qui est important au vu de l'effet bloc noté dans la première expérimentation pour permettre à terme la comparaison simultanée des phénotypes de l'ensemble des lignées. Les résultats de ce criblage sont montrés sur la **(Figure 23)**. Après sélection de 13 lignées contrastées, 3 autres

expérimentations ont été conduites en serre afin de vérifier la reproductibilité de leurs phénotypes. Les résultats de ces manipulations ont permis ainsi de déterminer les ratios MSA/BR de ces 13 lignées (**Figure 24**).

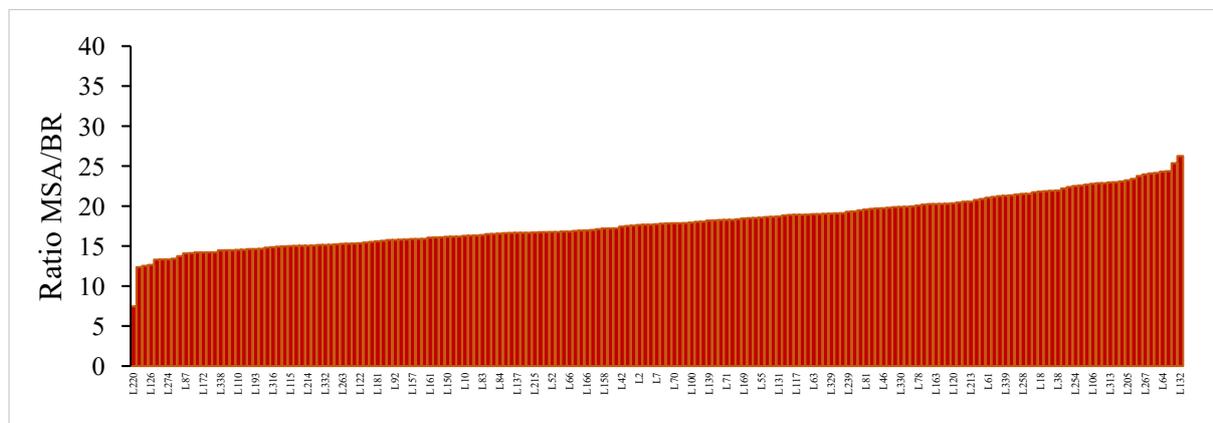


Figure 23: Ratio MSA/BR des 181 lignées de mil du second lot. Pour chaque lignée, la moyenne de 8 répétitions a été calculée et présentée. Le ratio MSA/BR varie de 7,44 à 25,36 ; soit un facteur de 3,4.

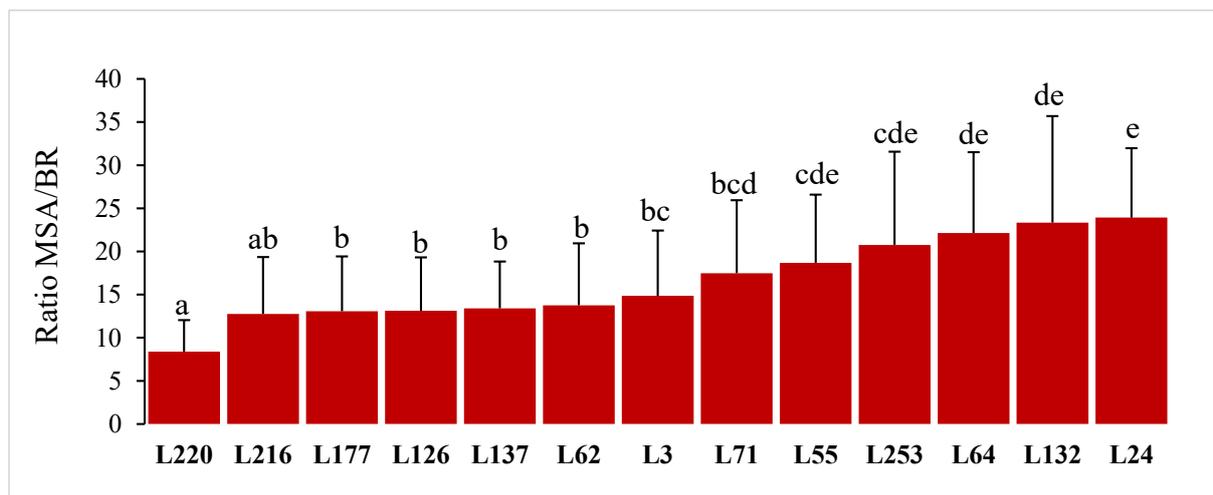


Figure 24: Phénotype MSA/BR des 13 lignées contrastées sélectionnées à l'issue du criblage. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs dans les 4 expérimentations (le criblage + les 3 manipulations de vérifications). Les barres représentent les écart-types. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les différentes lignées avec le test de Kruskal-Wallis.

IV.1.1- L'expérimentation et le prélèvement des échantillons :

L'expérimentation a été installée dans un champ expérimental du CNRA de l'ISRA à Bambey (**Planche 4**). Cette expérimentation avait également pour objectif de faire le diagnostic agronomique de ces 181 lignées. Nous nous sommes focalisés sur les 13 lignées sélectionnées à partir du phénotypage de l'agrégation racinaire. L'échantillonnage a été fait 77 jours après semis. Pour chacune de ces 13 lignées, 4 échantillons de sol rhizosphérique ont été prélevés sous 4 pieds différents dans l'horizon 0- 20 cm et à une distance de 10 cm des plants. Par

ailleurs, 4 échantillons de sol nu ont été également prélevés en dehors de la parcelle (à 5 m) pour servir de sol témoin. Les échantillons frais ont été répartis en 2 pools : le premier a été conservé au congélateur (-20°C) et a servi pour les analyses de biomasse microbienne et de diversité génétique ; Le second a été conservé au réfrigérateur (4°C) et a servi pour les analyses d'activités microbiennes et des propriétés chimiques des sols.



Planche 4: Essai au champ réalisé sur les 181 lignées de mil au CNRA de Bambey.

IV.1.2- Diversité des communautés microbiennes rhizosphériques

La diversité des communautés bactériennes a été étudiée selon les mêmes méthodes et avec les mêmes outils que ceux du chapitre III. Cependant pour la diversité de la communauté fongique, la région ITS a été utilisée pour les identifications à la place du 18S. Le séquençage a été effectué par la même société (Molecular Research DNA). Ainsi, les amorces ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') et ITS2 : (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') ont été utilisées pour la PCR. Le traitement des données NGS a été également effectué de la même manière que celle du chapitre III avec le logiciel open source QIIME version 1.8.0. La bêta-diversité fongique a été étudiée en utilisant la matrice de distance calculée selon la méthode Bray-Curtis car avec l'ITS qui présente souvent une forte variabilité, il est difficile d'avoir un arbre phylogénétique fiable, indispensable pour calculer les distances phylogénétiques avec la méthode UniFrac.

IV.1.3- pH et teneur en azote minéral des échantillons de sol rhizosphérique

Le pH des échantillons de sol a été mesuré dans de l'eau avec un ratio de 1:2,5 (poids:volume) à l'aide d'un pH-mètre (Delta 320, Mettler Toledo, Suisse). L'azote minéral a été dosé par colorimétrie (Technicon, AutoAnalyseur III) après son extraction dans une solution KCl 1M (Bremner, 1965).

IV.1.4- Activité respiratoire basale

L'activité respiratoire microbienne a été évaluée par la mesure de la quantité de CO₂ dégagé après humidification des échantillons de sol sur une période de 7 jours. Les sols ont été mis dans des flacons à plasma, humidifiés à 80% de leur capacité de rétention en eau et incubés à 28° C pendant 7 jours. La quantité de CO₂ dégagé a été mesurée chaque jour par chromatographie en phase gazeuse par prélèvement et analyse de l'air ambiant des flacons avec un appareil Agilent 490 Micro GC (Agilent Technologies). Ainsi, la moyenne de la quantité de CO₂ été calculée sur les 7 jours et les résultats ont été exprimés en µg CO₂ jour⁻¹ g sol⁻¹.

IV.1.5- Biomasse microbienne

L'estimation de la biomasse microbienne a été effectuée par la méthode de fumigation-extraction (Amato and Ladd, 1988). Le principe de la méthode est le suivant : les échantillons de sol sont incubés pendant 10 jours dans une atmosphère saturée en chloroforme (fumigation) pour la lyse des cellules microbiennes. Ensuite l'azote alpha-aminé est extrait des échantillons de sols fumigés mais aussi d'échantillons non fumigés avec une solution de KCl (2M). Ensuite un dosage colorimétrique de cet azote sera effectué à 570 nm après formation d'un complexe de couleur pourpre suite à l'ajout de réactifs à la ninhydrine. Après calibration du spectrophotomètre, la différence de coloration entre échantillons fumigés et non fumigés donne une estimation de l'azote alpha-aminé issu de la lyse microbienne. La biomasse microbienne-C a été estimée en multipliant par un facteur 21 la concentration de l'azote alpha-aminé provenant de la lyse des cellules microbiennes (Amato and Ladd, 1988). Les résultats sont exprimés en µg C.g⁻¹ sol sec.

IV.1.6- Teneur en Glomalines des échantillons de sol rhizosphérique

Le dosage des glomalines du sol a été effectué selon la procédure décrite par Koide and Peoples (2013) modifiée. Elle consiste à mettre 2 mL de citrate de sodium 20 mM à pH 7 sur 0,25 g de sol contenu dans des tubes de 5 mL. Ensuite, le mélange est autoclavé à 121°C, 110 000 Pa

pendant 30 minutes. La solution a ensuite été centrifugée à 15 000 g pendant 10 minutes et le dosage des glomalines a été effectué sur le surnageant par colorimétrie en présence du réactif de Bradford (Biorad Hercule, CA, USA) et en utilisant le BSA (Bovine Sérum Albumine) comme gamme standard. Les résultats sont exprimés en mg.g^{-1} sol.

IV.1.7- Les activités enzymatiques

Les activités enzymatiques des échantillons de sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin ont été évaluées par dosage colorimétrique des produits issus de la réaction avec différents substrats enzymatiques. En effet, le principe de la méthode est que le mélange d'un substrat spécifique avec un échantillon de sol entraîne soit une stimulation des micro-organismes compétents pour ce substrat, soit une réaction avec les exo-enzymes présentes dans le sol, ce qui entraîne une augmentation du produit de la réaction dont la quantité est proportionnelle à une coloration. Ainsi après avoir mesuré cette dernière au spectrophotomètre (Thermo Scientific, GENESYS 20), la concentration du produit final est calculée à l'aide d'une courbe étalon obtenue avec une gamme des concentrations connues du produit.

IV.1.7.1- L'activité de la bêta-glucosidase

L'activité bêta-glucosidase a été mesurée selon la méthode de Hayano (1973) à laquelle, nous avons apporté quelques modifications. Pour chaque échantillon de sol frais, 4 aliquotes de 100 mg ont été pesés et mis dans des tubes. Dans les 3 premiers tubes, on a ajouté 0,1 mL de tampon citrate de phosphate à pH 5,8 et 100 μl de para-nitrophenyl β DGlucopyranoside (p-NPG : concentration 5 mM ; Sigma). Dans le quatrième tube (témoin), le substrat (p-NPG) est remplacé par de l'eau distillée pour déceler la coloration qui serait indépendante de la réaction enzymatique. Un blanc est aussi réalisé dans un tube par l'addition de tous les réactifs sans le sol. Ainsi, la coloration due à la réaction sera celle mesurée, une fois retranchées les colorations du témoin et du blanc. Ensuite les mélanges ont été mis en incubation à 37 °C pendant 2 heures avant que la réaction ne soit stoppée par l'ajout de 3 mL de carbonate de sodium (0,2 M Na_2CO_3). Après une centrifugation à 10000 rpm pendant 5 minutes, la densité optique des surnageants a été mesurée au spectrophotomètre. C'est ainsi que l'activité de la β -glucosidase a été exprimée en $\mu\text{g p-NP (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$.

IV.1.7.2- L'activité Phosphatase acide

L'activité liée à la phosphatase en milieu acide a été mesurée selon le protocole décrit par Tabatabai and Bremner (1969) modifié. Pour chaque échantillon de sol frais, 4 essais de 100 mg ont été pesés et mis dans des tubes. Dans les 3 premiers tubes, on a ajouté 400 µl de tampon citrate de phosphate (Mac Ilvain) à pH 5,8 et 100 µL de para-nitrophenyl phosphate (p-NPP). Le quatrième tube sert de témoin et un blanc est aussi réalisé dans un tube par l'addition de tous les réactifs sans le sol. Après une incubation à 37°C pendant 1 heure, la réaction a été arrêtée par alcalinisation du milieu avec 400 µL de NaOH (pour rendre le milieu basique afin d'obtenir la coloration jaune correspondant à la libération du para-nitrophenol) et ajout de 100 µl de CaCl₂ (pour la complexation des substances humiques présentes dans le milieu). Puis le mélange a été centrifugé pendant 5 min à 10 000 rpm et la densité optique du surnageant a été lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400 nm. L'activité phosphatase a été exprimée en µg p-NP (g sol)⁻¹ h⁻¹ après étalonnage du spectromètre à partir d'une solution de concentration connue en p-NPP.

IV.1.7.3- L'hydrolyse de la fluorescéine di-acétate (FDA)

L'hydrolyse de la fluorescéine di-acétate (3'6'-diacetyl-fluorescéine: FDA) est un bon indicateur de l'activité microbienne globale car elle est réalisée par des enzymes produites par les champignons mais également par les bactéries. Ce qui en fait un indicateur généraliste du fonctionnement biologique du sol. La méthode de Adam and Duncan (2001) qui a été utilisée consiste à mettre dans un tube 100 mg de sol et 15 mL de tampon phosphate (60 mM) à pH 7 et 200 µL de FDA (4,8 mM). Après une heure d'incubation à 30°C, la réaction est stoppée par ajout de 10 mL d'acétone. Le mélange est ainsi centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 minutes et la densité optique du surnageant a été mesurée à une longueur d'onde de 490 nm. Les résultats sont exprimés en µg Fluorescéine (g sol)⁻¹.h⁻¹, après calibration avec une gamme étalon.

IV.1.7.4- L'activité Uréase

Cette activité a été dosée suivant la méthode décrite par Kandeler and Gerber (1988). Elle consiste à mélanger 1 g sol, 1,4 mL de tampon phosphate à pH 7 et 100 µL d'urée (1,2 M). Le mélange est ensuite incubé sous agitation à 37 °C pendant 2 heures. Puis la réaction a été stoppée par alcalinisation du milieu en ajoutant 3 mL d'une solution de KCl à 2M. La solution est ensuite agitée pendant une demi-heure à température ambiante avant d'être centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 minutes. Pour mettre en évidence (par coloration) le produit de la réaction

enzymatique, 1 mL du surnageant a été mélangé avec 9 mL d'eau déminéralisée, 5 mL d'un mélange de salicylate de sodium et de nitroprussiate de sodium (1,06 M) et 2 mL d'une solution de dichloroisocyanurate de sodium (39,1 M) puis l'ensemble a été agité de nouveau pendant une demi-heure. C'est ainsi que la densité optique a été lue au spectrophotomètre à 660 nm. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g N-NH}^{4+} (\text{g sol})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ après étalonnage du spectromètre à partir d'une gamme de solutions de NH^{4+} de concentrations connues.

IV.1.7.5- L'activité chitinase

Dans les sols la chitine provient des arthropodes et des champignons. L'activité de la chitinase permet sa décomposition et constitue ainsi l'une des principales sources d'azote minéralisable dans le sol. L'activité chitinase a été dosée suivant la méthode de Parham and Deng (2000). La réaction consiste à l'hydrolyse du para-nitro-phényl-N-acétyl-Glucosaminide (p-NP-NAG) qui produit du p-nitro-phénol (p-NP). Ce p-NP sera dosé par colorimétrie à 400 nm. Les essais sont constitués de 0,25 g de sol frais, 1 mL de tampon acétate de sodium tri-hydraté ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) de concentration 0,1 M à pH 5,5 et 250 μL du substrat p-NP-NAG. Après une incubation de 1 heure à 37 °C, la réaction a été arrêtée par ajout de 250 μL de CaCl_2 (0,5 M) et 1000 μL de NaOH (0,5 M). Le mélange est centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes. Ensuite la densité optique a été lue au spectrophotomètre à 400 nm. La quantité de p-NP est calculée après calibration de l'appareil avec une gamme de solution de p-NP de concentration connue.

IV.1.7.6- L'activité déshydrogénase

L'activité deshydrogénase a été dosée en utilisant la méthode de Mersi and Schinner (1991) modifiée par (Prosser et al., 2011). Le principe du dosage repose sur la réduction du 2-(p-iodophenyl) -3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) en p-iodonitrotetrazolium formazan (INTF). Elle consiste à mettre 5 mL d'une solution de INT et 3,5 mL de tampon tris-hydroxyméthyl aminométhane (THAM) dans un tube contenant 100 mg de sol frais. Après homogénéisation (vortex) et incubation du mélange à 37°C pendant 2 heures, 10 mL d'un mélange d'éthanol et de N,N-diméthyl formamide ont été ajoutés à la solution. C'est ainsi que la densité optique de la solution a été lue au spectrophotomètre à 464 nm. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ sol h}^{-1}$.

IV.1.8- Analyses Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT version 2016 (Addinsoft SARL, Paris, France). Pour tous les paramètres, la normalité des données recueillies a été testée

avec le test de Shapiro ($p < 0,05$) et l'homoscédasticité des variances avec le test de Levene ($p < 0,05$). Ainsi pour la respiration, le pH et la teneur en glomalines des ANOVAs suivies de tests de comparaison multiple par paires ont été effectuées sur les moyennes afin de comparer les différents traitements. Pour les autres paramètres (Azote minéral, biomasse microbienne, les indices de diversité alpha) dont la normalité et l'homoscédasticité des données n'étaient pas vérifiées, le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) a été utilisé pour comparer les différents traitements. Pour comparer la bêta-diversité bactérienne des sols rhizosphériques des différentes lignées de mil, les distances phylogénétiques weighted et unweighted UniFrac ont été calculées avec le logiciel QIIME et utilisées pour réaliser des Analyses en Coordonnées Principales (PCoA). Cependant pour la bêta-diversité fongique les PCoA ont été réalisées avec les distances de Bray-Curtis. Par ailleurs, une Analyse en Composante Principale (ACP) a été réalisée sur les activités enzymatiques pour voir leurs relations avec l'agrégation rhizosphérique de ces lignées de mil contrastées.

IV.2- Résultats

IV.2.1- La diversité bactérienne du sol rhizosphérique des lignées de mil

Pour comparer la diversité alpha des communautés bactériennes au niveau de la rhizosphère des différentes lignées de mil, les indicateurs de diversité (indice de diversité phylogénétique PD_{whole}, Chao1, nombre d'OTUs et indice de Shannon) ont été calculés à une profondeur de 24839 séquences. Les résultats sont renseignés sur le tableau suivant.

Tableau 7: Indicateurs de la diversité alpha bactérienne du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 24839 séquences a été retenue. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les différents traitements avec le test de kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Traitement	PD _{whole}	chao1	OTU	Shannon
L220	485,1 ^{ab}	19268,8 ^a	7118,5 ^{ab}	10,6 ^a
L216	494,5 ^{ab}	19654,1 ^a	7163,5 ^{ab}	10,6 ^a
L177	462,9 ^{ab}	17490,4 ^a	6655,0 ^{ab}	10,5 ^a
L126	494,2 ^{ab}	19909,6 ^a	7166,4 ^{ab}	10,5 ^a
L137	514,0 ^b	20835,2 ^a	7382,2 ^b	10,7 ^a
L62	487,2 ^{ab}	19519,9 ^a	7042,5 ^{ab}	10,4 ^a
L3	536,5 ^b	20806,1 ^a	7805,4 ^b	10,9 ^a
L71	407,6 ^a	16563,7 ^a	5974,8 ^a	9,9 ^a
L55	509,2 ^b	19379,5 ^a	7368,6 ^{ab}	10,8 ^a
L253	476,8 ^{ab}	18630,4 ^a	6979,0 ^{ab}	10,6 ^a
L64	476,1 ^{ab}	16949,7 ^a	7014,7 ^{ab}	10,8 ^a
L132	490,2 ^{ab}	19772,0 ^a	7131,4 ^{ab}	10,6 ^a
L24	493,1 ^{ab}	18195,4 ^a	7248,1 ^{ab}	10,8 ^a
Témoin	526,0 ^b	19500,2 ^a	7727,0 ^b	11,0 ^a

L'indice de diversité de Shannon calculé à partir des abondances des différentes OTUs définies ne présentent aucune variabilité significative entre nos différents traitements (y compris le sol témoin). Cependant dans les tendances on remarque que le sol rhizosphérique de la lignée L71 présente un indice de Shannon relativement plus faible que ceux du sol rhizosphérique des autres lignées et du sol témoin. De même, ce sol témoin présente la plus forte valeur pour cet indice de diversité. L'estimateur de richesse spécifique Chao1 ne montre aucune différence significative entre les différents traitements. L'indice de diversité phylogénétique (PD_{whole}) qui est basé sur la longueur totale des branches phylogénétiques du gène 16S pour chaque

échantillon est moins importante dans le sol rhizosphérique de la lignée L71 que dans ceux des lignées L137, L55, L3 et dans le sol témoin. La richesse en OTU montre les mêmes tendances que l'indice de diversité phylogénétique (**Tableau 7**).

La bêta-diversité a été étudiée par une Analyse en Coordonnées Principales (PCoA : Principal Coordinate Analysis) avec les deux types de méthodes de calcul de distance phylogénétiques Weighted and Unweighted UniFrac. Ceci nous a permis de tracer les **Figures 25** et **26** ci-dessous qui montrent la projection dans le plan factoriel des différents individus (échantillons de sol) dans le plan formé par les deux premiers axes PC1 et PC2.

Avec la méthode Weighted UniFrac, il n'apparaît aucune séparation entre les échantillons des différentes lignées. Donc les lignées à fort ratio MSA/BR (L132, L24, L253 et L64), représentées en carré creux et les lignées à faible ratio MSA/BR (L137, L220, L216, L126 et L177) représentées en cercles pleins sont dans un même cluster.

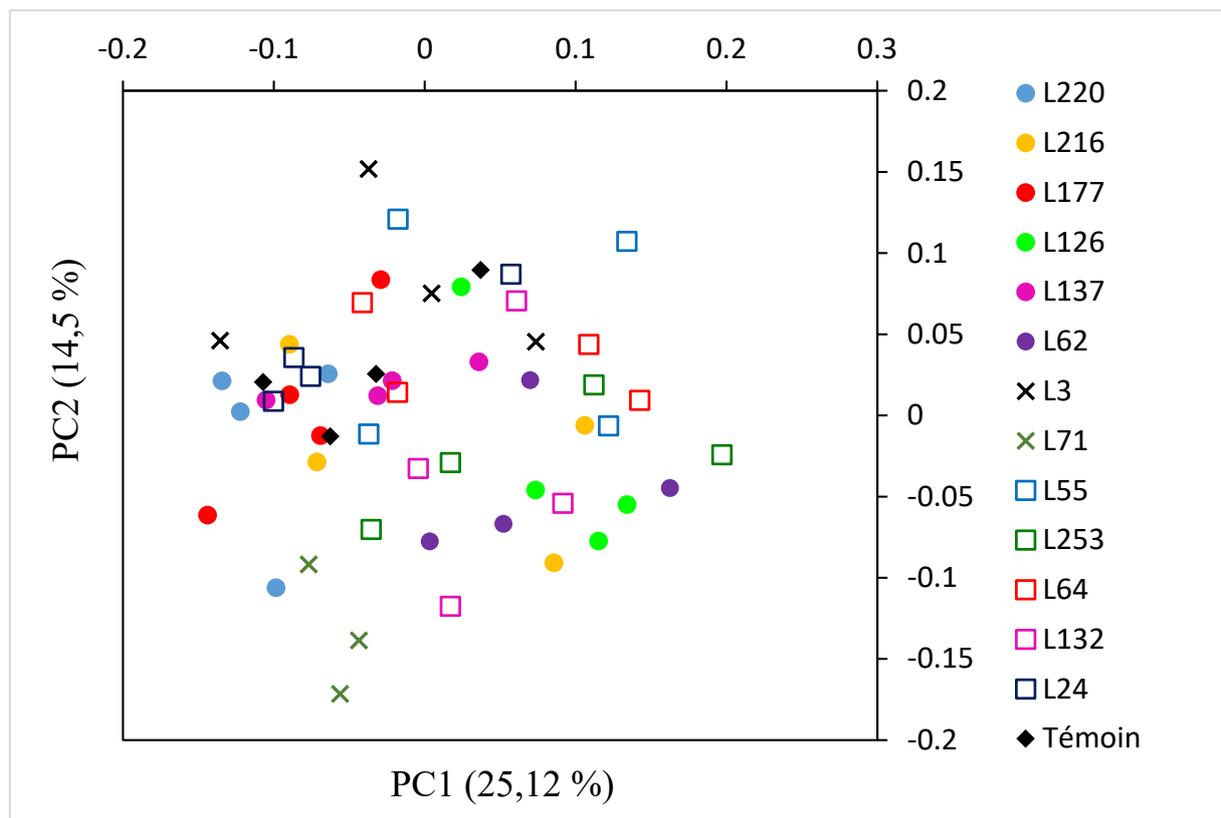


Figure 25: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersion weighted UniFrac obtenue après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Les carrés représentent les lignées à forte agrégation, les cercles représentent les lignées à faible agrégation et les croix représentent les lignées intermédiaires.

Avec la méthode Unweighted UniFrac, il semble y avoir une séparation suivant l'axe 1 de la PCoA des échantillons de certaines lignées à fort ratio (L55, L132, L253 et L64) et des échantillons de lignées à faible ratio (L137, L220, L177). Par contre la variabilité expliquée par les deux premiers axes est très faible (11, 2%), Comme pour la méthode Weighted UniFrac, les échantillons de sol témoins sont plus proches des lignées à faible ratio MSA/BR.

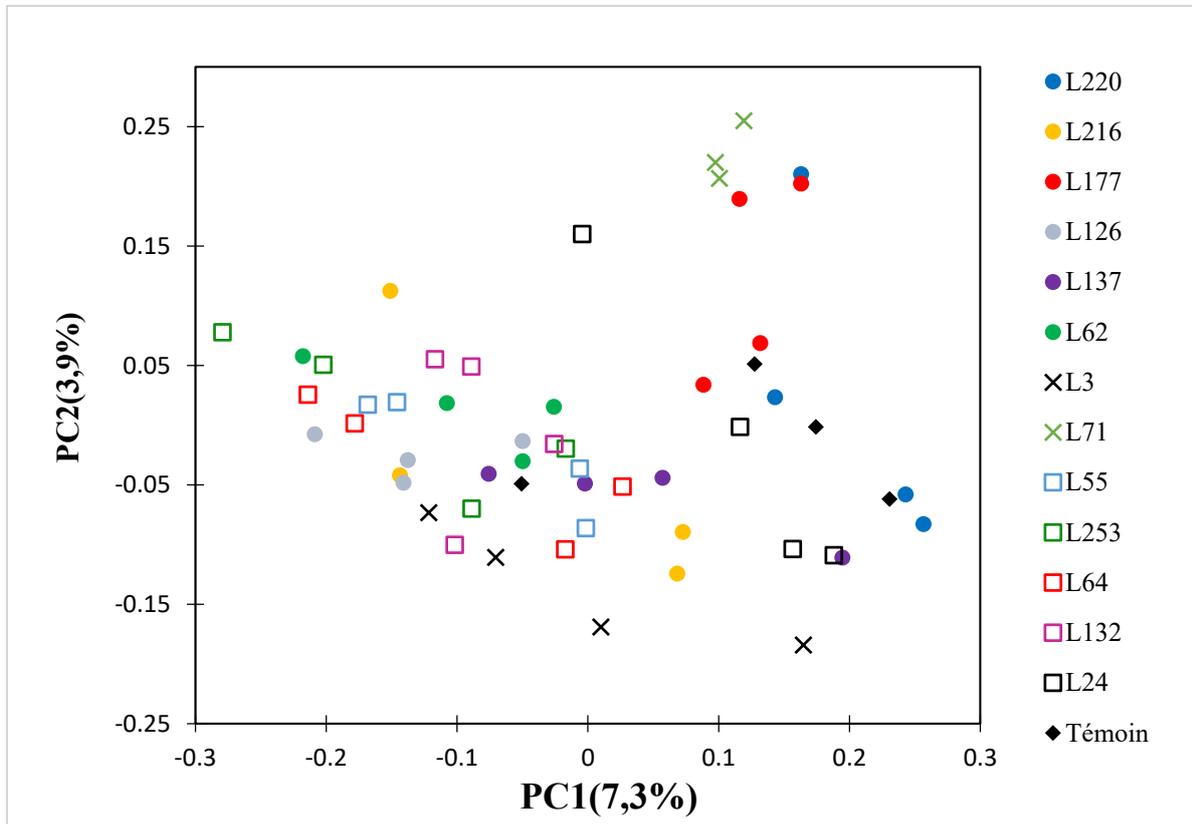


Figure 26: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions unweighted UniFrac obtenue après le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Les lignées à forte agrégation sont représentées avec des carrés, les lignées à faible agrégation avec des cercles et les lignées intermédiaires avec des croix.

IV.2.2- Effet de la variabilité génétique du mil sur la composition taxonomique bactérienne du sol rhizosphérique.

Au niveau des phyla, on peut noter la prédominance des *Protéobactéries* et des *Fimicutes* qui constituent plus de 50% des bactéries présentes dans les différents traitements. Dans le sol témoin ces deux groupes sont présents dans des proportions presque identiques (26%). Dans les sols rhizosphériques des lignées, les tendances montrent tantôt une légère prédominance des *Protéobactéries* (L216, L220, L55, L3, L177, L24, L253 et L64), tantôt une prédominance des *Fimicutes* (L137, L62, L71, L126 et L132). Chez toutes les lignées et le sol témoin, ces deux

groupes sont suivis par les *Actinobactéries* dont les proportions varient de 12 à 20% et des *Acidobactéries* dont les proportions varient entre 4 et 8% suivant les traitements. Cependant il n'existe aucune tendance qui se dégage selon le ratio MSA/BR (**Figure 27**).

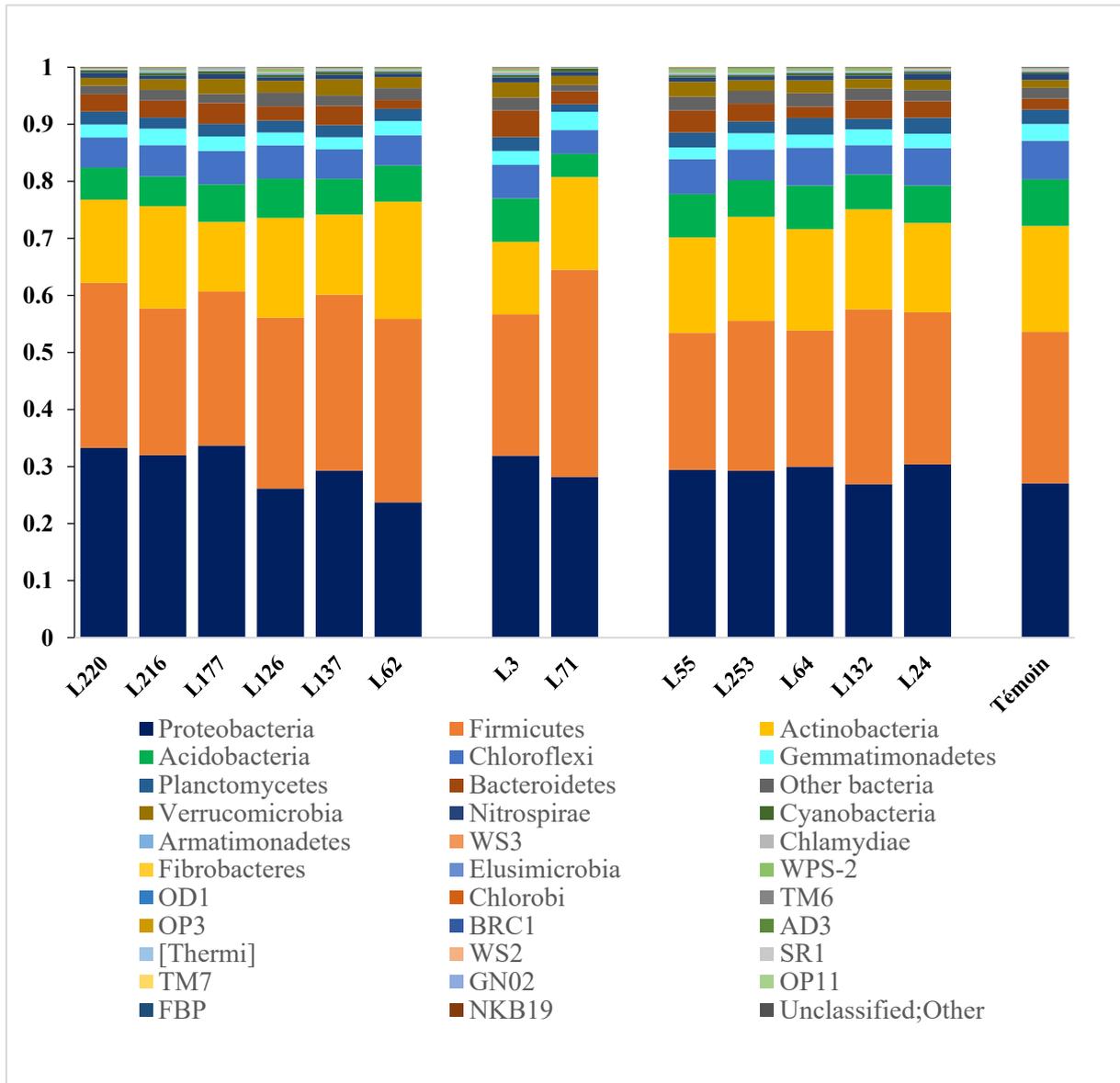


Figure 27: Abondances relatives des phyla bactériens dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin.

Au niveau des classes, les *Bacilli* constituent le premier groupe avec des abondances relatives variant entre 23,4% (L55) et 35,8% (L71). Ils sont suivis par les *Alphaproteobacteria* qui constituent entre 15,6 (L62) et 23,3% (L177). Comparés au sol témoin, on note une augmentation de l'abondance relative des *Alphaproteobacteria* dans les sols rhizosphériques des lignées (sauf pour les lignées L62 et L126). Ensuite nous avons en troisième position les *Actinobacteria* dont l'abondance varie entre 6,6% (L3) et 11,2% (L71).

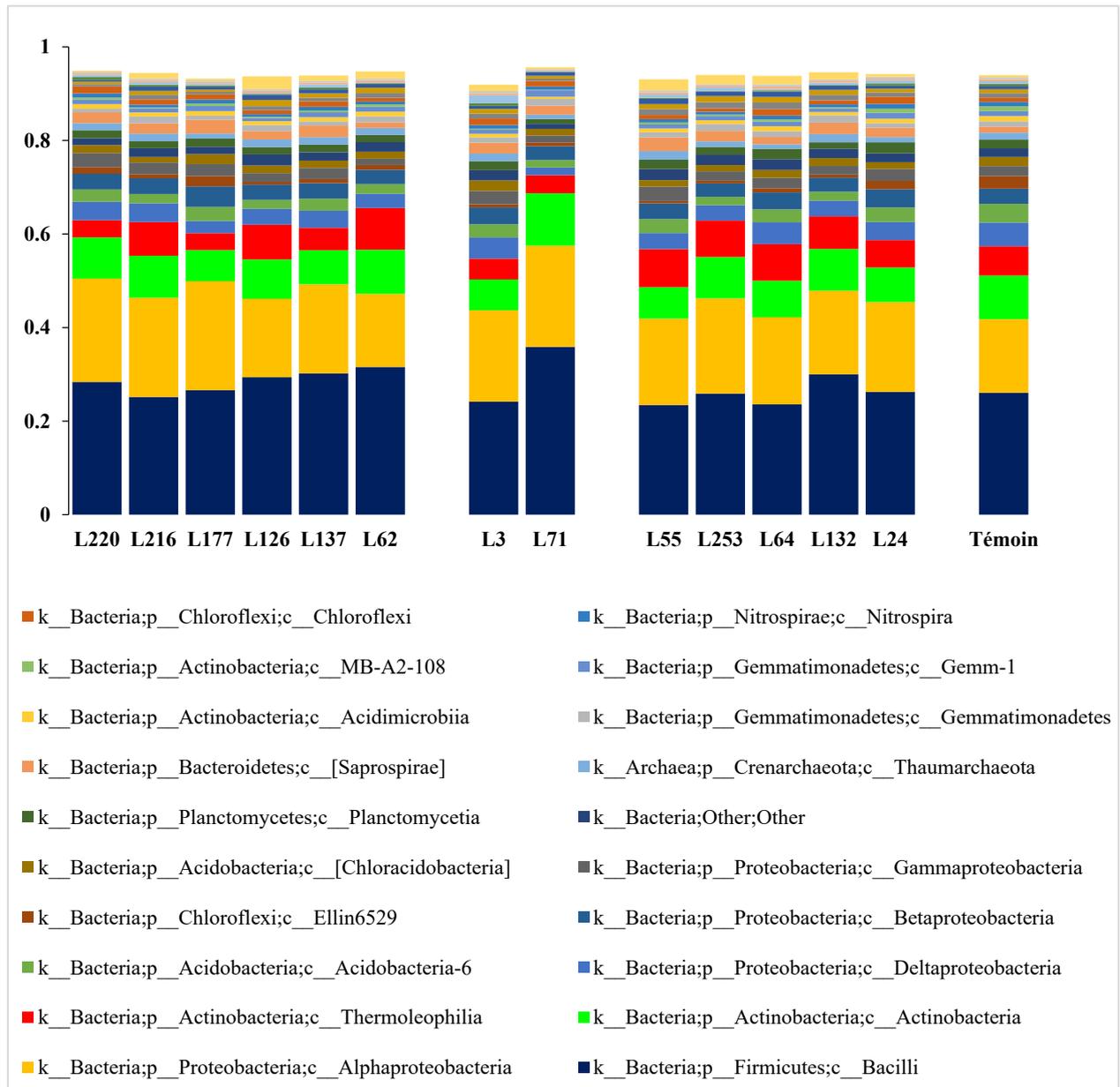


Figure 28: Abondances relatives des 20 classes de bactéries les plus abondantes dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin.

Au niveau des ordres, nous avons les *bacillales* (entre 23 et 35 %), ensuite les *rhizobiales* (entre 7 et 13%), les *actinomycetales* (entre 6 et 11%). Ces trois ordres les plus abondants ne montrent aucune tendance de corrélation entre leur abondance relative et le ratio MSA/BR.

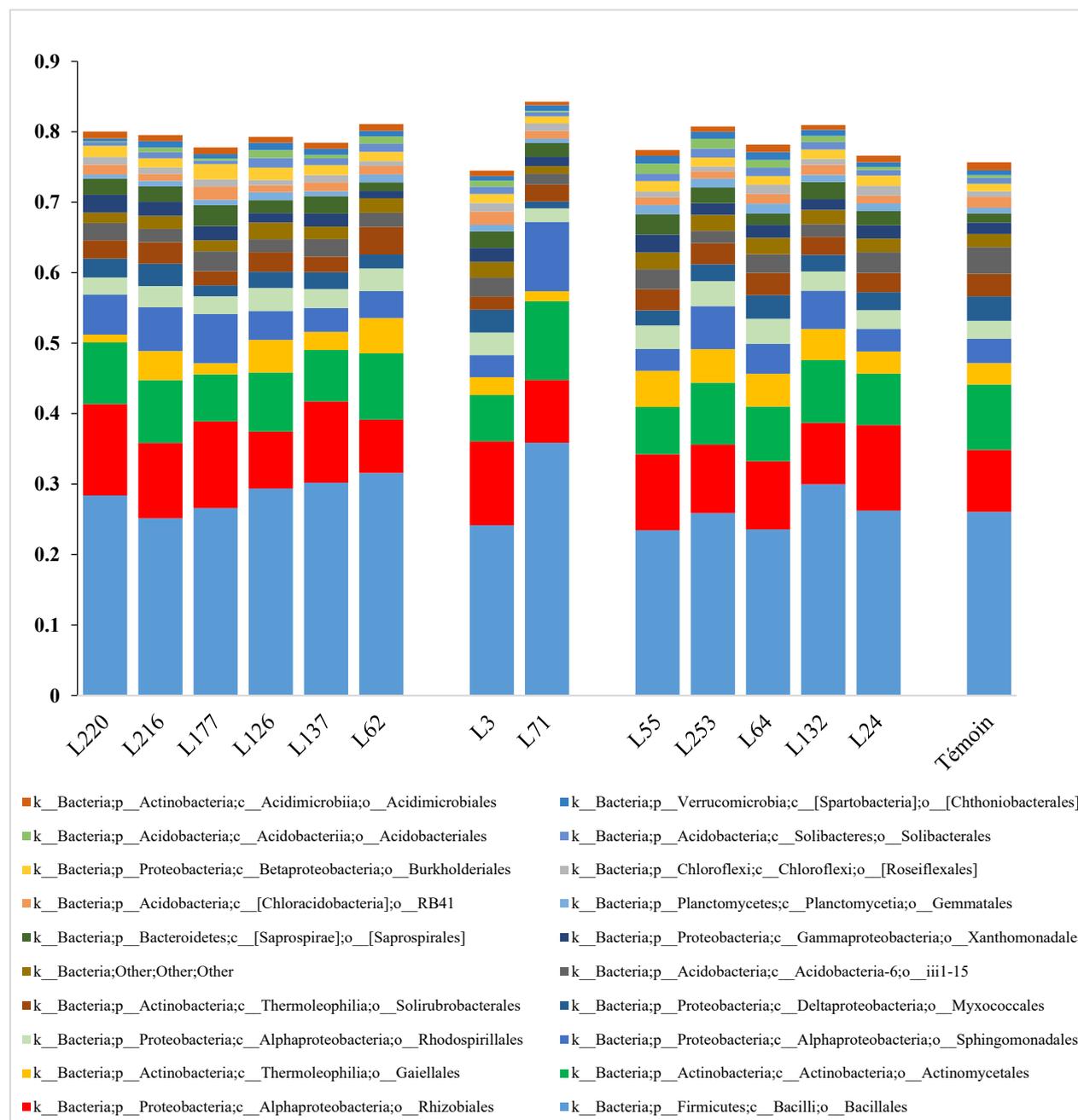


Figure 29: Abondances relatives des 20 ordres de bactéries les plus abondants dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin.

IV.2.3- Effet de la variabilité génétique du mil sur la diversité fongique rhizosphérique.

La diversité alpha a été calculée à une profondeur de 14524 séquences par échantillon pour la comparaison de la diversité fongique des différents traitements. Le tableau suivant donne l'indice de diversité de Shannon et les indicateurs de richesse spécifique : l'estimateur Chao1 et le nombre d'OTUs.

Tableau 8: Indicateurs de la diversité alpha fongique du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Une profondeur de séquençage de 15524 séquences a été retenue. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les différents traitements avec le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Traitement	Chao1 Ave.	OTUs Ave.	Shannon Ave.
L220	4359,42 ^b	1833,25 ^c	7,544 ^a
L216	3932,04 ^{ab}	1629,78 ^{abc}	6,728 ^a
L177	3443,66 ^{ab}	1523,45 ^{abc}	6,769 ^a
L126	4186,72 ^b	1767,18 ^{bc}	7,121 ^a
L137	4327,92 ^b	1866,60 ^c	7,533 ^a
L62	4188,28 ^b	1804,38 ^c	7,241 ^a
L3	4117,20 ^b	1722,45 ^{bc}	6,966 ^a
L71	3276,41 ^{ab}	1467,80 ^{abc}	6,848 ^a
L55	3287,38 ^{ab}	1451,93 ^{abc}	6,620 ^a
L253	3161,10 ^{ab}	1410,65 ^{abc}	6,502 ^a
L64	2428,58 ^a	1128,82 ^{ab}	6,184 ^a
L132	3976,00 ^{ab}	1688,88 ^{abc}	7,002 ^a
L24	2388,83 ^a	1063,88 ^a	5,448 ^a
Témoin	3548,83 ^{ab}	1553,18 ^{abc}	7,078 ^a

L'indice de diversité de Shannon ne présente aucune différence significative entre les différents traitements. Cependant les tendances montrent que la richesse spécifique (nombre d'OTUs et Chao1) est moins importante dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation que dans celle des lignées à faible agrégation. En particulier, les lignées L220, L126, L137 et L62 (lignées à faible agrégation) présentent des indices de richesse spécifique (Chao1, et nombre d'OTUs) significativement plus importants que ceux des lignées L24 et L64 qui sont des lignées à forte agrégation. Toutefois, les indices de diversité du sol témoin ne sont pas significativement différents de ceux des échantillons de sols rhizosphériques des différentes lignées de mil.

La bêta-diversité a été étudiée par une Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) utilisant la matrice de distance de Bray-Curtis. Ainsi la **Figure 30** nous montre la projection des différents individus (échantillons de sol) dans le plan formé par les deux premiers axes PC1 et PC2 qui ne représentent néanmoins que 20,9 % de la distribution. Ainsi il n'apparaît aucune séparation entre les échantillons des différentes lignées et donc encore moins entre les lignées à fort ratio MSA/BR (L55, L64, L253 L132 et L24) et les lignées à faible ratio MSA/BR (L220, L216, L177, L126, L137 et L62) ou entre les sols rhizosphériques et les sols témoins.

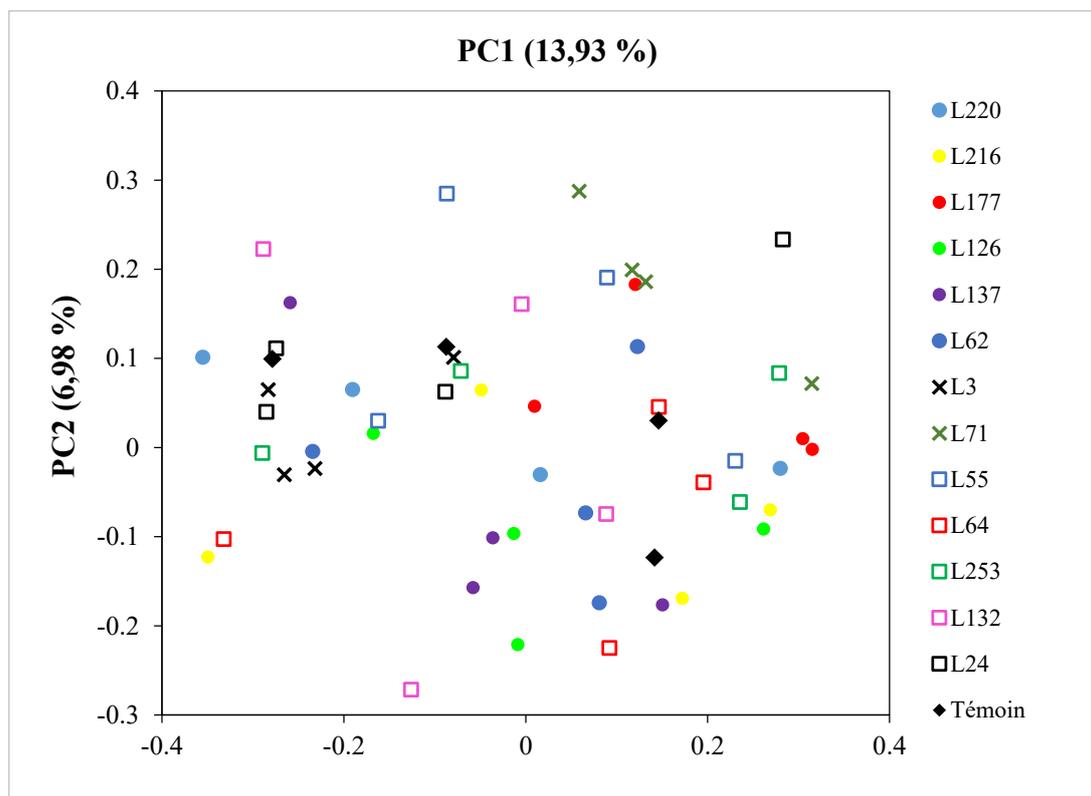


Figure 30: Analyse en Coordonnées Principales de la matrice de dispersions de Bray-Curtis obtenue après le séquençage de l'ITS fongique du sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et du sol témoin. Les lignées à forte agrégation sont représentées avec des carrés, les lignées à faible agrégation avec des cercles et les lignées intermédiaires avec des croix.

IV.2.4- Effet de la variabilité génétique du mil sur la Composition taxonomique fongique

La composition phylogénétique des échantillons de sol a été déterminée à plusieurs niveaux taxonomiques allant du phylum à l'espèce. Cependant dans tous ces niveaux aucune tendance relative au ratio MSA/BR des lignées de mil n'a été observée. Au niveau phyla, 35 à 57% des séquences de champignons (en fonction des traitements) n'ont pas pu être affiliés. Les *Ascomycota* constituent le groupe le plus représenté avec des abondances variant entre 38 et 62 % en fonction des lignées. L'abondance des *Basidiomycota* varie entre 1,5% (L3) à 18%

(L216). Ensuite viennent les *Glomeromycota* dont les abondances relatives varient entre 0,1% (pour L64) et 2,8% (L177), (**Figure 31**).

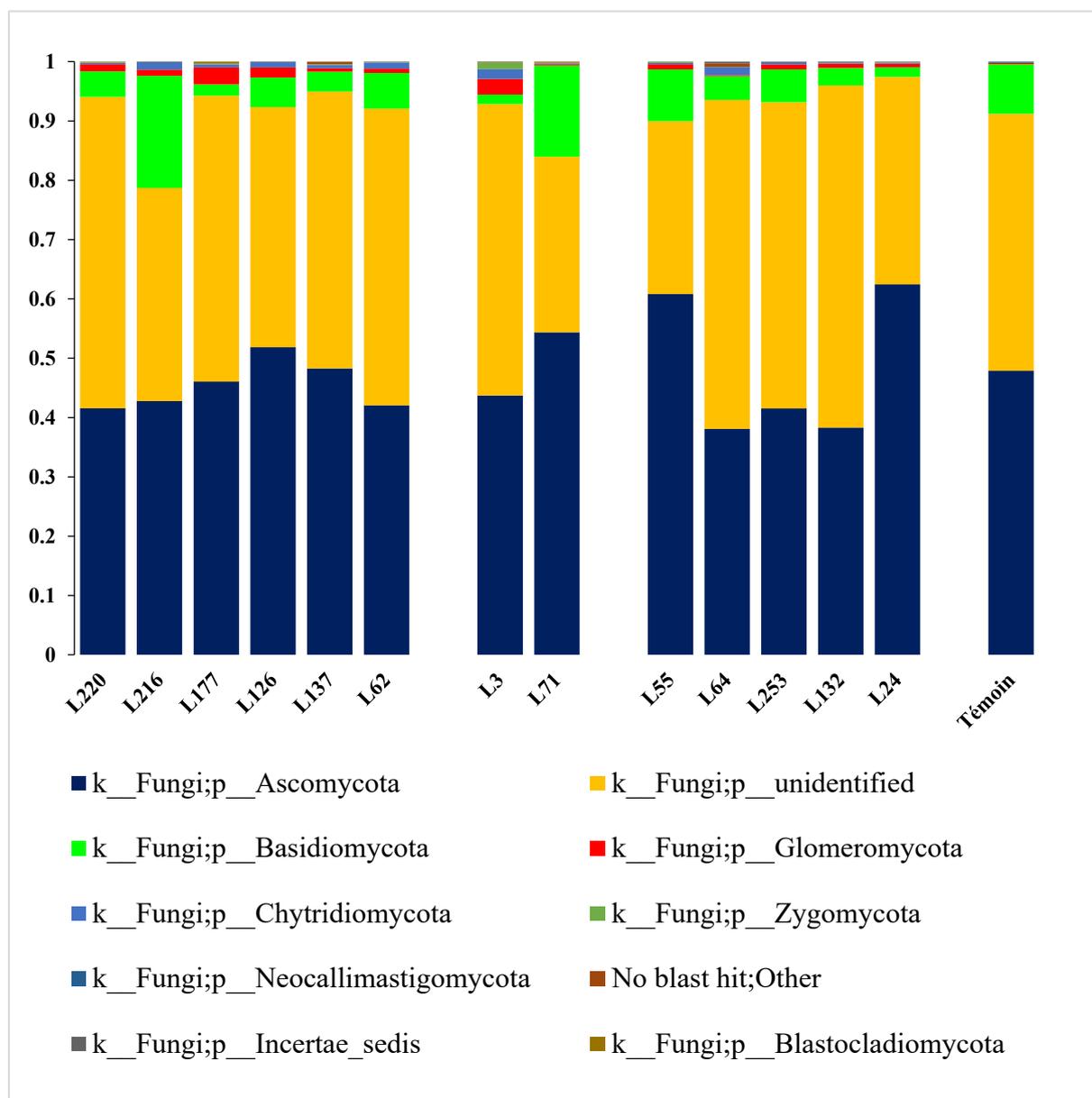


Figure 31: Abondances relatives des différents phyla de champignons dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin.

Au niveau des ordres nous pouvons noter la forte présence des *Hypocreales* avec des abondances variant entre 3,8% (L24) et 18,4% (L71), des *chaetothyriales* : 3,3% (L132) à 14,9% (L253) mais également des *Pléosporales* qui sont particulièrement représentés dans la rhizosphère des lignées L55 et L24 avec respectivement des abondances relatives de 26 et de 34% (**Figure 33**). Egalement on n’observe aucune corrélation avec le ratio MSA/BR.

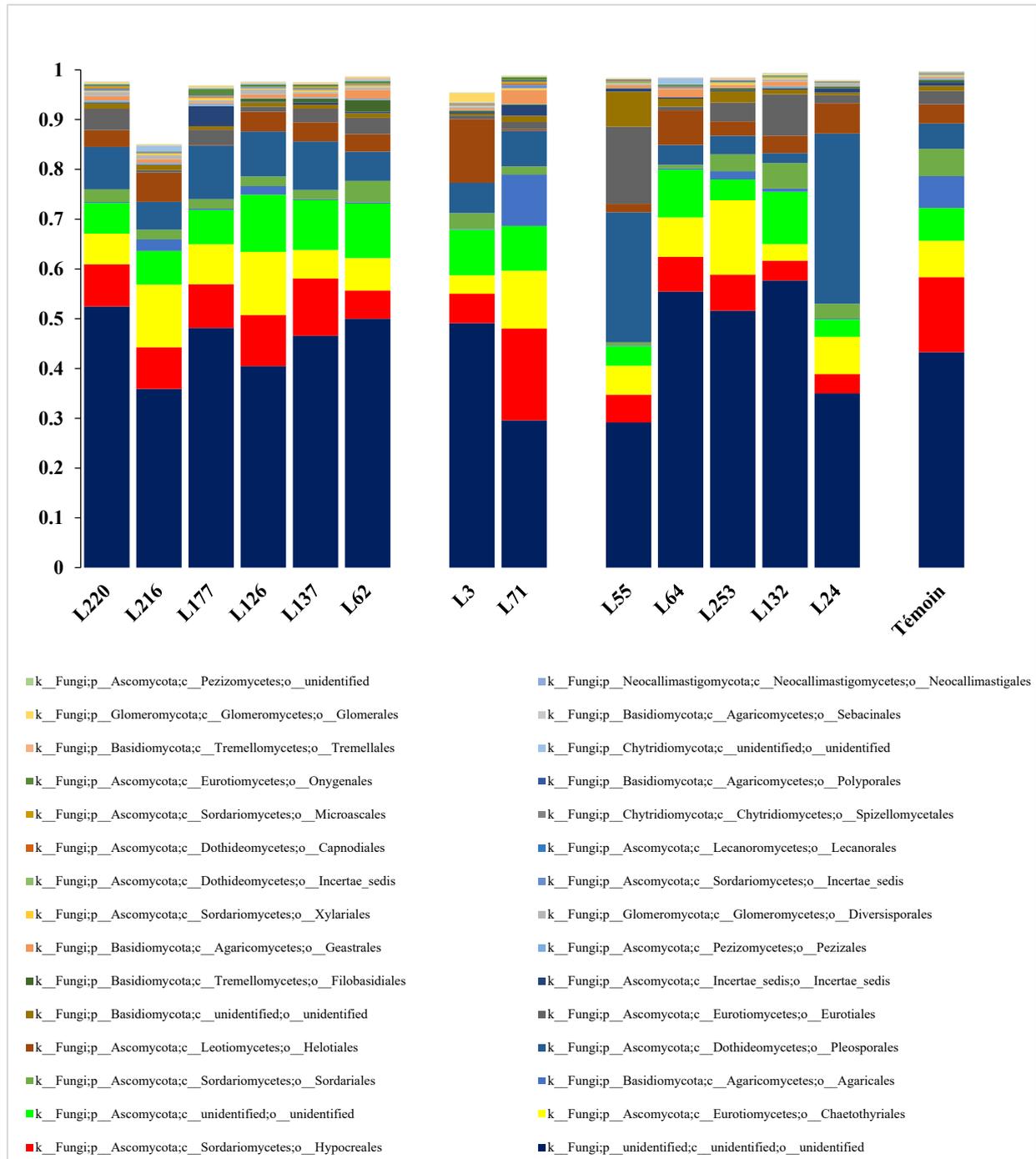


Figure 33: Abondances relatives des 30 ordres de champignons les plus abondants dans la rhizosphère des 13 lignées de mil cultivées au champ et dans le sol témoin

IV.2.5-Biomasse microbienne et activité respiratoire du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil :

La figure ci-dessous montre les résultats de l'estimation de la biomasse microbienne des différents échantillons de sol. Elle est de 18,5 $\mu\text{g C/g sol sec}$ pour le sol nu et varie de 5,5 $\mu\text{g C/g sol sec}$ (L220) à 35 $\mu\text{g C/g sol sec}$ (L71). On note également que la biomasse microbienne est significativement plus élevée dans la rhizosphère des lignées L62, L71, L253 et L64 comparée à celle des lignées L220 et L3. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements et le sol témoin (Test de Kruskal-Wallis) (**Figure 34**).

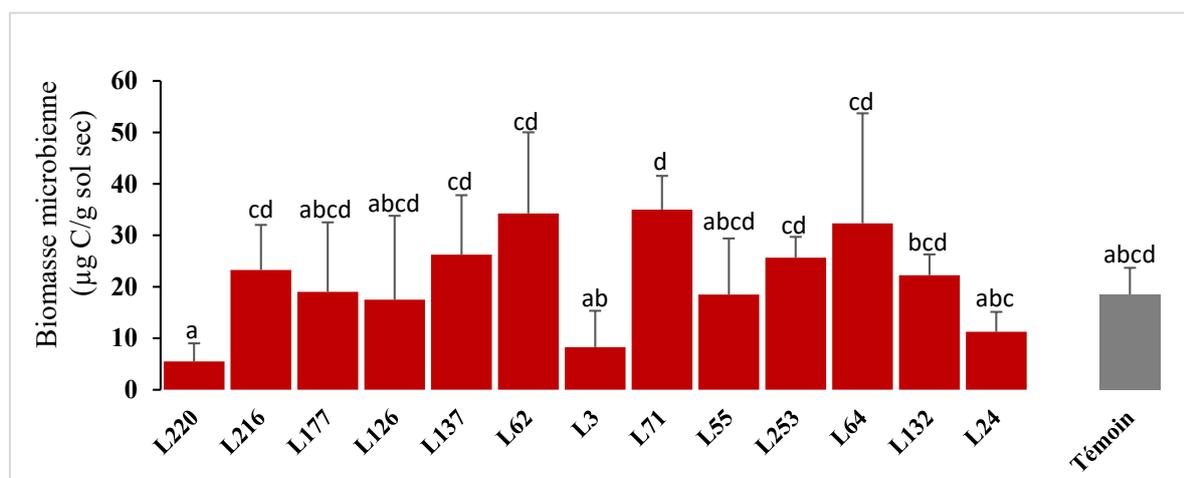


Figure 34: Biomasse microbienne du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison par paire de Dunn

L'activité respiratoire des échantillons de sol rhizosphérique est généralement plus importante que celle du sol témoin. En effet, elle est de 2,11 $\mu\text{g C-CO}_2/\text{g sol}$ pour le sol témoin et varie entre 2,61 (L253) et 3,74 $\mu\text{g C-CO}_2/\text{g sol}$ (L64) pour les échantillons de sols rhizosphériques. Cependant seuls les sols rhizosphériques des lignées L3, L126 et L64 présentent une activité respiratoire significativement plus importante que celle du sol témoin ($p < 0,05$) (**Figure 35**).

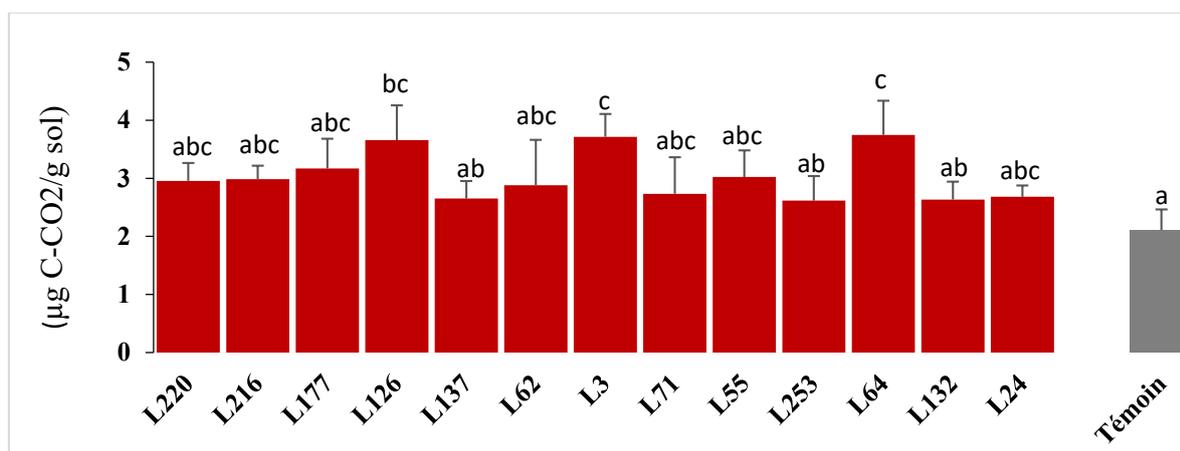


Figure 35: Activité respiratoire du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de comparaison par paire de Tukey

IV.2.6- Le pH et l'azote minérale du sol rhizosphérique des lignées de mil

La figure ci-dessous montre une variabilité assez large et significative du pH du sol rhizosphérique de ces différentes lignées de mil. Comparé au sol témoin, on note une diminution forte et significative du pH du sol dans la rhizosphère de lignées à agrégation rhizosphérique moyenne à forte (L71, L253 et L132). Cependant pour les lignées à faible agrégation rhizosphérique, les modifications du pH sont globalement plus discrètes.

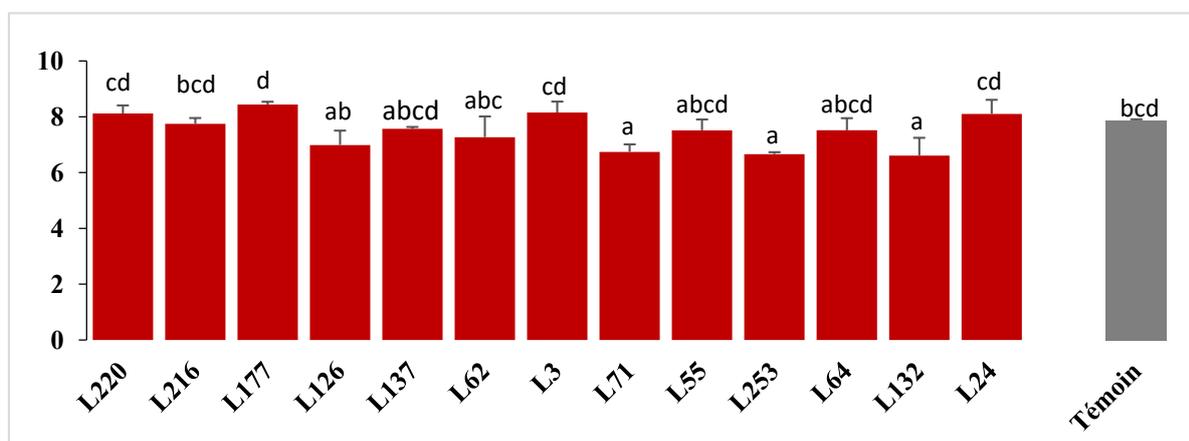


Figure 36: pH du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de comparaison par paire de Tukey.

La teneur en azote minéral a été estimée par l'addition des teneurs en ammonium et nitrate dosées dans les échantillons de sol. La quantité de cet azote assimilable est de 8,75 µg N/g sol pour le sol témoin. Dans les sols rhizosphériques des différentes lignées de mil, elle varie de façon significative ($p < 0,0001$) entre 1,875 (L177) et 16,275 µg N/g sol (L253). On peut noter

ici que les plus grandes quantités d'azote minéral ont été enregistrées dans la rhizosphère de lignées à forte agrégation (L253 et L132) alors que la plus faible quantité a été notée chez une lignée à faible agrégation.

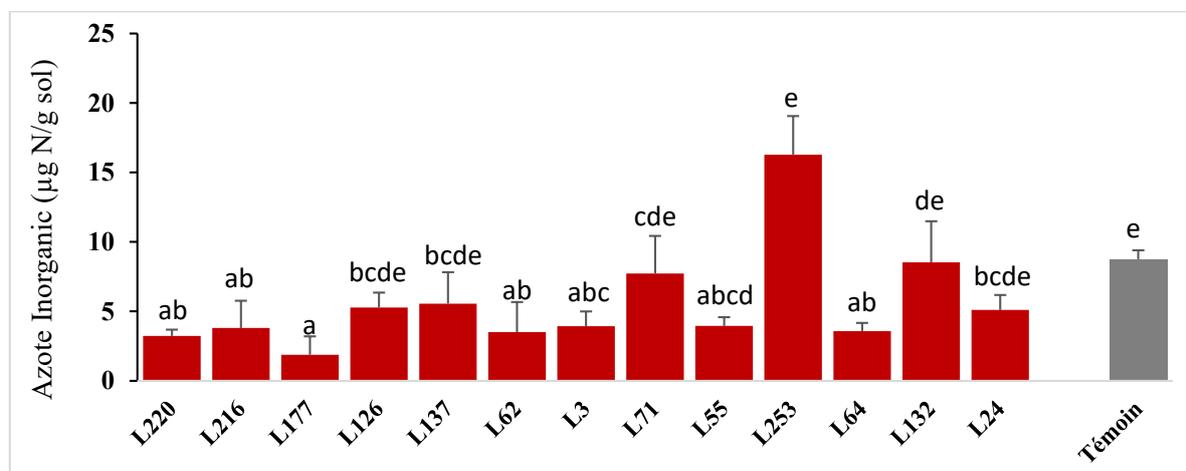


Figure 37: Teneur en Azote minéral du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison par paire de Dunn

IV.2.7- Teneur en Glomalines du sol rhizosphérique des lignées de mil

Les teneurs en glomalines dans les échantillons de sols rhizosphériques des lignées varient de 0,26 mg.g⁻¹ sol (L220) à 0,38 mg.g⁻¹ sol (L132). Aucune lignée ne présente une différence significative avec le sol témoin dont la teneur en glomalines est de 0,29 mg.g⁻¹ sol. Néanmoins, les sols rhizosphériques des lignées L220 et L177 ont des teneurs en glomalines significativement moins importantes que celles des lignées L71, L253, L132 ($p < 0,05$).

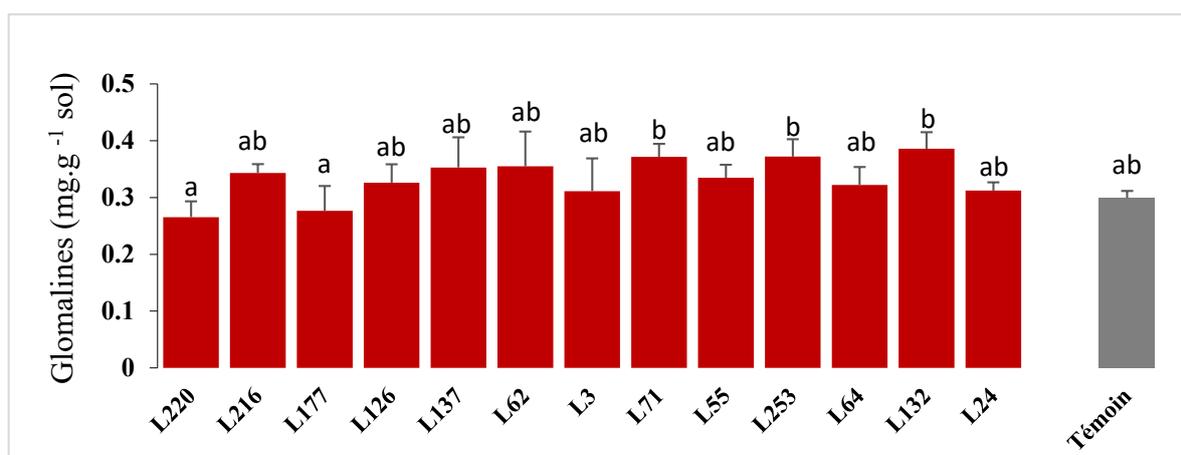


Figure 38: Teneur en glomalines dans le sol rhizosphérique des lignées de mil et dans le sol témoin. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 répétitions. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. Les lettres différentes sur les barres représentent les différences significatives avec le test de comparaison par paire de Tukey.

IV.2.8- Les Activités enzymatiques dans le sol rhizosphérique des lignées de mil

Le **tableau 9** présente les résultats de la mesure des différentes activités enzymatiques sur les échantillons de sol rhizosphériques des 13 lignées de mil et sur le sol témoin.

Tableau 9: Activités enzymatiques du sol rhizosphérique des différentes lignées de mil et du sol témoin. Dans chaque colonne, les lettres différentes indiquent les différences significatives entre les traitements avec le test de Kruskal-Wallis suivi de la comparaison par paire de Dunn.

Lignées	β -glucosidase ($\mu\text{g pNP/g sol/h}$)	Phos-acide ($\mu\text{g pNP/g sol/h}$)	Chitinase ($\mu\text{g p-NP/g sol/h}$)	FDA ($\mu\text{g Flu/g sol/h}$)	Deshydro ($\mu\text{g INTF/g sol/h}$)	Uréase ($\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g sol/h}$)
L220	25,81 ^{ab}	39,16 ^{ab}	0,56 ^{ab}	44,79 ^{ab}	0,27 ^{ab}	3,75 ^a
L216	34,72 ^{ab}	126,82 ^{abc}	1,85 ^{cde}	72,72 ^{abc}	0,26 ^{ab}	14,69 ^b
L177	29,70 ^{ab}	21,76 ^a	0,39 ^a	32,29 ^a	0,19 ^{ab}	5,75 ^{ab}
L126	40,47 ^{ab}	144,04 ^{abc}	2,57 ^{de}	125,49 ^c	0,32 ^{ab}	12,35 ^{ab}
L137	23,32 ^a	75,16 ^{abc}	1,22 ^{abcd}	48,38 ^{ab}	0,26 ^{ab}	8,54 ^{ab}
L62	38,64 ^{ab}	171,78 ^{abc}	1,96 ^{cde}	66,45 ^{abc}	0,29 ^{ab}	7,90 ^{ab}
L3	43,73 ^{ab}	65,37 ^{abc}	1,53 ^{bcde}	86,98 ^{abc}	0,28 ^{ab}	11,07 ^{ab}
L71	32,77 ^{ab}	133,76 ^{abc}	0,93 ^{abc}	52,86 ^{abc}	0,14 ^{ab}	6,63 ^{ab}
L55	40,85 ^{ab}	112,88 ^{abc}	0,97 ^{abc}	65,24 ^{abc}	0,19 ^{ab}	11,24 ^{ab}
L253	51,33 ^b	247,57 ^c	2,94 ^e	96,13 ^{bc}	0,30 ^{ab}	11,24 ^{ab}
L64	44,51 ^{ab}	127,71 ^{abc}	2,50 ^{de}	89,57 ^{abc}	0,16 ^{ab}	4,65 ^{ab}
L132	46,15 ^{ab}	205,29 ^{bc}	1,65 ^{cde}	90,09 ^{abc}	0,38 ^b	15,85 ^b
L24	26,58 ^{ab}	45,42 ^{abc}	0,84 ^{abc}	35,84 ^{ab}	0,10 ^a	6,17 ^{ab}
Témoin	48,17 ^{ab}	29,54 ^{ab}	0,83 ^{abc}	61,51 ^{abc}	0,20 ^{ab}	4,93 ^{ab}

L'activité ***béta-glucosidase*** est de 48,17 $\mu\text{g p-NP (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ pour le sol témoin. Dans les sols rhizosphériques des lignées de mil, elle varie entre 23,32 (L137) et 51,33 $\mu\text{g p-NP (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ (L253). Seule la lignée L253 montre une différence significative par rapport à la lignée L137.

L'activité ***phosphatase acide*** est de 25,54 $\mu\text{g p-NP (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ pour le sol témoin. En fonction de la lignée, elle varie entre 21,76 (L177) et 247,57 $\mu\text{g p-NP (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ (L253). Cette activité est significativement plus importante dans la rhizosphère des lignées L132 et L253 (forte agrégation) que dans celle des lignées L177 et L220 (faible agrégation) et dans le sol témoin.

L'activité ***FDA*** est de 65,54 $\mu\text{g Flu (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ pour le sol témoin. Dans les sols rhizosphériques, elle varie de 32,29 (L177) à 125,48 $\mu\text{g Flu (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ pour la lignée L126. Cependant seule la lignée L177 présente au niveau de sa rhizosphère une activité FDA significativement moins importantes que celle des lignées L126 et L253.

L'activité ***chitinase*** est de 0,83 $\mu\text{g p-NP (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ dans le sol témoin et varie de 0,39 (L177) à 2,94 $\mu\text{g p-NP (g sol)}^{-1}\text{h}^{-1}$ (L253). En outre on note que les lignées à forte agrégation L132,

L253 et L64 enregistrent une activité chitinase significativement plus importante que celle mesurée dans la rhizosphère de deux lignées à faible agrégation (L177 et L220) et dans sol témoin. Donc ces 4 activités semblent donc globalement beaucoup plus importantes dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation (L132, L64 et L243) que dans celle des lignées à faible agrégation (L137, L216, L220 et L177).

Cependant pour les autres activités enzymatiques mesurées (*Uréase et Deshydrogénase*), aucune tendance relative au ratio MSA/BR n'a été notée même si on note des variabilités significatives entre certaines lignées (**Tableau 9**). Ainsi, ces différentes activités enzymatiques ont ensuite été soumises à une Analyse en Composante Principale. Celle-ci montre que les deux premiers axes F1 et F2 ont un pourcentage d'inertie de 65,05 %. En outre, on observe une corrélation des *activités bêta-glucosidase, chitinase, FDA, uréase et phosphatase acide* avec la composante F1 qui explique 51,39 % de la variabilité des données. Alors que *l'activité deshydrogénase* est portée par l'axe 2 qui explique 13,66 % de la variabilité (**Figure 39 A**). Sur la **Figure 39 B** nous avons la projection des échantillons de sol rhizosphérique des lignées les plus contrastées (avec des ratio MSA/BR significativement différents ; $p < 0,05$) dans le plan factoriel formé par les axes F1 et F2. Suivant l'axe F1, on observe une séparation entre les échantillons de sol rhizosphérique de 3 lignées à fort ratio MSA/BR (L55, L64, L253 et L132) et les échantillons de sol rhizosphérique des lignées à faible ratio MSA/BR (L220, L177 et L137). Il faut noter également que dans cette projection, les échantillons de sol témoin sont plus proches de ceux des lignées à faible ratio.

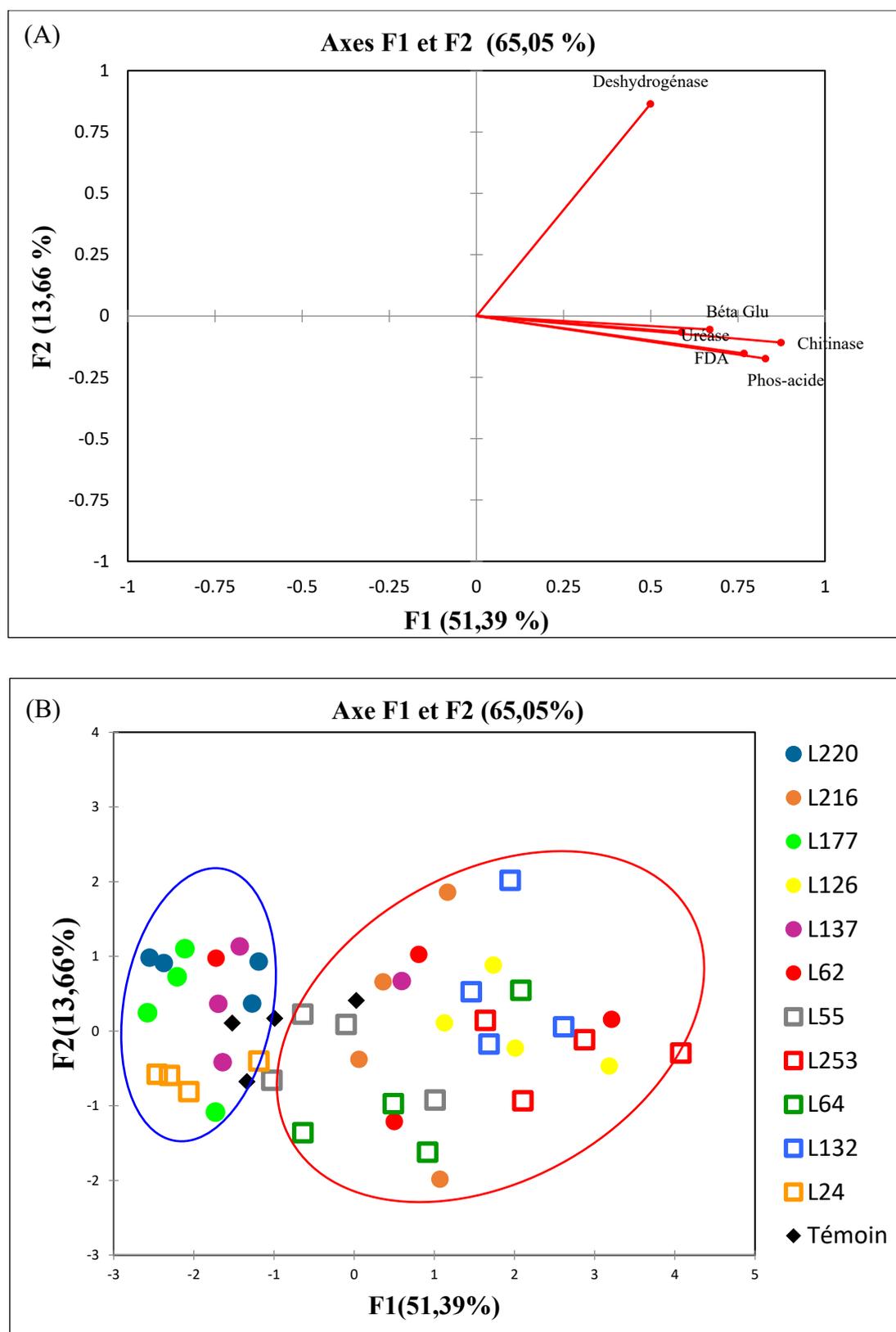


Figure 39: Analyse en composante principale des différentes activités enzymatiques mesurées dans le sol rhizosphérique des 13 lignées de mil et dans le sol témoin. (A) Projection de variables sur le plan factoriel formés par les 2 premiers axes. (B) projection des observations (11 Lignées contrastées) sur le plan factoriel formé par les 2 premiers axes.

IV.2.9- Relation entre l'activité microbienne, la biomasse microbienne l'azote minéral et le pH du sol rhizosphérique des lignées

Les relations entre les différentes activités enzymatiques, l'activité respiratoire et la biomasse microbienne ont été évaluées par le test de corrélation de Spearman. Les résultats de ce test sont renseignés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10: Matrice de corrélation entre les activités enzymatiques, l'activité respiratoire, la biomasse microbienne, l'azote minéral et le pH mesurés dans les échantillons de sol rhizosphérique des lignées de mil. Les Astérisx (*) indiquent les corrélations significatives entre les différentes variables en utilisant le test de Spearman ($p < 0,05$)

Variabes	β -Glu	Phos-ac	Chitinase	FDA	Deshydrogénase	Uréase	BM	Respiration	pH	N minéral
β -Glu	1	0,374*	0,418*	0,430*	0,233	0,247	0,093	0,065	-0,254	0,293*
Phos-ac		1	0,757*	0,508*	0,280*	0,404*	0,458*	0,034	-0,836*	0,363*
Chitinase			1	0,601*	0,320*	0,352*	0,298*	0,231	-0,588*	0,317*
FDA				1	0,239	0,270	0,044	0,242	-0,451*	0,119
Deshydrogénase					1	0,228	-0,031	0,088	-0,271*	0,148
Uréase						1	0,241	0,149	-0,282*	0,046
BM							1	-0,200	-0,513*	0,257
Respiration								1	0,222	-0,499*
pH									1	-0,516*
Azote minéral										1

Ce tableau montre que l'activité respiratoire ne présente aucune corrélation significative avec les autres paramètres (Activités enzymatiques et biomasse microbienne). Cependant, on note une corrélation positive entre la biomasse microbienne et les activités enzymatiques de la *Phosphatase acide* et de la *Chitinase*. De même, l'azote minéral est corrélé positivement avec les activités *Phosphate acide*, *β -Glucosidase*, et *chitinase*. Le pH est négativement corrélé à la biomasse microbienne et aux activités enzymatiques à l'exception de la *β -glucosidase*. Les activités *chitinase*, *FDA*, *β -glucosidase*, *Déshydrogénase* et *Phosphatase acide* sont significativement corrélées comme cela apparaît dans l'analyse en composante principale (**Figure 39 A**).

IV.3- Discussion :

IV.3.1- Diversité microbienne de la rhizosphère de différentes lignées de mil :

La diversité au champ des communautés microbiennes rhizosphériques de lignées de mil contrastées en terme d'agrégation rhizosphérique (ratio MSA/BR) a été étudiée par le séquençage « NGS » de la région V4 de l'ADN ribosomique 16S (pour les bactéries) et de l'ITS (pour les champignons). Pour la communauté bactérienne, l'analyse de la diversité alpha qui caractérise la diversité inventoriée à l'intérieur de chaque échantillon (Jurasinski et al., 2009) montre très peu de différences significatives entre les sols rhizosphériques des différentes lignées d'une part et entre ces derniers et le sol témoin d'autre part (**Tableau 7**). Ce résultat est assez différent de celui obtenu par Peiffer et al (2013) qui ont montré une forte variabilité de la richesse spécifique en OTU (indicateur de diversité alpha) entre des échantillons de sols rhizosphériques de différentes lignées de maïs (le facteur lignée expliquant 19,1% de la variabilité du nombre d'OTUs). L'étude de la bêta-diversité ou diversité différentielle entre les sols rhizosphériques des différentes lignées de mil (Jurasinski et al., 2009) par les analyses en coordonnées principales ne permet pas séparer clairement les échantillons de sol rhizosphérique des différentes lignées de mil dans l'analyse weighted UniFrac. Ceci corrobore les résultats de Lundberg et al (2012) qui ont montré que le facteur accession n'expliquait qu'une faible part (<1%) de la variance de la bêta-diversité bactérienne mesurée dans la rhizosphère de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. De même chez le maïs, il a été rapporté que la part de la diversité génétique intra-spécifique (effet lignée) dans la variabilité de la bêta-diversité n'était que de 5% (Peiffer et al., 2013). En outre dans nos conditions, les échantillons de sol témoins ne se séparent pas non plus des échantillons de sol rhizosphériques des lignées de mil. Ceci traduit donc une très faible influence des racines de la plante sur les communautés bactériennes rhizosphériques par rapport à d'autres sources de variabilité dans nos conditions. Et par conséquent aucune différence significative n'a pu être notée entre ces différentes lignées de mil.

Concernant la communauté fongique, notre étude a montré une diminution significative de la richesse spécifique (le nombre d'OTUs et l'indice de Chao1) du sol rhizosphérique de deux lignées à fort ratio MSA/BR (L24 et L64) comparées à des lignées à faible ratio MSA/BR (L220, L126, L137 et L62). Un résultat similaire a été obtenu sur la structure des communautés fongiques rhizosphériques de diverses accessions de concombre (Yao and Wu, 2010). Dans une étude plus récente réalisée par Yu et al. (2016) sur le mûrier (*Morus sp*), il a été démontré que les indices de diversité alpha (indice de Shannon et l'estimateur Chao1) variaient de façon

significative en fonction du génotype mais également que ces différents génotypes se séparaient clairement en terme de bêta-diversité dans une analyse en composante principale.

Ainsi, pour les lignées que nous avons étudiées, les différences notées dans l'agrégation rhizosphérique (évaluée en serre) ne présentent pas de relation claire ni avec la diversité de leur communautés bactériennes rhizosphériques, ni avec celle de leur communautés fongiques rhizosphériques étudiées au champ. Deux hypothèses peuvent être évoquées pour cela. D'une part l'agrégation a été évaluée dans le cadre d'une expérimentation en pot (à 28 jours après semis) alors que la diversité microbienne a été étudiée en conditions réelles, au champ (à 77 jours après semis). Donc, il n'était pas du tout évident de trouver une corrélation significative entre ces 2 paramètres dans la mesure ou la diversité des communautés microbiennes rhizosphériques varie avec l'âge de la plante et ceci a été rapporté par de nombreuses études (Baudoin et al., 2002; Micallef et al., 2009; Mougél et al., 2006). D'autre part il est clair que les expérimentations au champ présentent d'autres sources de variabilité absentes dans les expérimentations en pot dans lesquelles le sol est préalablement homogénéisé. Donc, il est possible que dans notre cas cela ait masqué une éventuelle variabilité induite par les lignées.

IV.3.2- Biomasse et activités microbiennes rhizosphériques des différentes lignées de mil

Dans notre étude, il n'y a pas eu de différence significative de la biomasse microbienne entre les sols rhizosphériques des différentes lignées et le sol témoin. Ce résultat est conforme à celui obtenu sur deux variétés d'orge dont les biomasses microbiennes du sol rhizosphérique n'étaient pas significativement différentes de celui du sol témoin (Pausch et al., 2016). Cependant Giagnoni et al (2016) et Pathan et al (2015) ont rapporté une biomasse microbienne plus importante dans les sols rhizosphériques du maïs que dans les sols non rhizosphériques. Ceci pourrait être expliqué par les méthodes différentes utilisées pour l'estimation de la biomasse microbienne qui présentent des résolutions probablement différentes. En effet, dans ces deux études réalisées sur le maïs, la biomasse microbienne du sol rhizosphérique a été estimée par la teneur en ATP des échantillons de sol selon le protocole de Ciardi and Nannipieri, (1990) alors que Pausch et al (2016) ont utilisé la méthode de fumigation extraction de l'azote, de même que nous.

Par ailleurs, il a été rapporté une augmentation de plusieurs types d'activité enzymatique dans la rhizosphère des plantes comparée au sol non rhizosphérique (Giagnoni et al., 2016; Pathan et al., 2015). En particulier, l'activité de la phosphatase acide dosée dans la rhizosphère du soja

est significativement plus importante que celle mesurée dans le sol non rhizosphérique (Fraser et al., 2017). Dans notre étude, les différentes activités enzymatiques mesurées suivent des motifs de variation très hétérogènes en fonction de la nature de l'échantillon (sol rhizosphérique ou sol témoin). En effet les activités enzymatiques *chitinase*, *phosphatase acide* et dans une moindre mesure *l'hydrolyse de la FDA* sont généralement stimulées dans les échantillons de sol rhizosphérique du mil comparé aux échantillons de sol témoin. Par contre les activités *béta-glucosidase*, *uréase* ainsi que l'activité *déshydrogénase* ne sont pas significativement modifiées au sein de la rhizosphère du mil comparées au sol témoin.

Malgré l'augmentation de certaines activités enzymatiques dans la rhizosphère des différentes lignées mil (comparée au sol témoin), nous n'avons pas noté une augmentation de la biomasse microbienne. Ce résultat corrobore celui de Pausch et al (2016) qui n'ont pas enregistré une augmentation significative de la biomasse microbienne dans les échantillons de sol rhizosphérique (comparées au sol nu) en dépit de la stimulation de activités *chitinase*, *béta-xylosidase* et *phosphatase acide*. Ceci semble indiquer qu'une augmentation de l'activité enzymatique n'est pas toujours liée à une augmentation de la biomasse microbienne. Cependant la corrélation positive entre la biomasse microbienne, les activités enzymatiques *chitinase* et *phosphatase acide* et la teneur en azote minéral dans le sol rhizosphérique des lignées de mil démontre à suffisance que dans nos conditions l'augmentation de la biomasse microbienne dans la rhizosphère de certaines lignées a eu un impact positif sur la minéralisation de la matière organique via la stimulation de ces activités enzymatiques spécifiques.

En outre, pour toutes ces activités mesurées dans la rhizosphère du mil nous avons noté une certaine variabilité en fonction des lignées. Un résultat similaire a été obtenu sur l'activité *déshydrogénase* de la rhizosphère de différentes variétés de soja (Omidi et al., 2008). Dans d'autres études réalisées sur deux lignées de maïs il a été également rapporté une variabilité des activités enzymatiques rhizosphériques de la *béta-glucosidase* et de l'*uréase* même si d'autres comme *l'activité phosphatase*, *l'activité arylsulfatase*, et *l'activité arylesterase* ne présentent aucune différence significative (Pathan et al., 2015). Parallèlement à cette variabilité génétique de l'intensité de ces activités enzymatiques rhizosphériques, il a été montré également une variabilité de la structure des communautés bactérienne et fongique dans la rhizosphère de ces deux lignées de maïs se distinguant en outre par des efficacités d'utilisation des nutriments contrastées (Giagnoni et al., 2016; Pathan et al., 2015). Donc il serait logique de penser que cette variabilité lignée-dépendante des activités enzymatiques rhizosphériques soit liée à une modification de la composition de la communauté microbienne rhizosphérique sous l'influence

de l'exsudation racinaire (Berg and Smalla, 2009; Micallef et al., 2009). En effet, cette exsudation racinaire peut varier en fonction des caractéristiques génétiques intra-spécifiques des plantes (Czarnota et al., 2003; Micallef et al., 2009). Toutefois, dans notre étude cette relation entre diversité des communautés microbienne et activités enzymatiques n'a pas pu être clairement établie. Seulement, il faut noter le cas particulier de la lignée L24 qui se sépare des autres lignées à forte agrégation aussi bien dans l'analyse de la bêta-diversité bactérienne (Unweighted UniFrac) que dans l'ACP sur les activités enzymatiques. Ceci semble indiquer que la forte agrégation notée sur cette lignée serait liée à un autre cortège microbien ou un autre facteur différent de celui qui l'explique chez les autres lignées à forte agrégation. Mais aussi la séparation entre les lignées à faible agrégation L220, L137 et 177 et les lignées à forte agrégation L55, L64, L253 et L132 dans ces deux analyses n'est pas anodine.

Les lignées de mil pour lesquelles les activités enzymatiques des sols rhizosphériques ont été mesurées présentent des ratio MSA/BR contrastés. Par ailleurs, l'analyse en composantes principales effectuée sur ces 6 activités enzymatiques permet de séparer plus ou moins nettement certaines des lignées contrastées. Ainsi les activités enzymatiques *chitinase*, *phosphatase acide*, *bêta-glucosidase* et *FDA* semblent globalement plus importantes dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation rhizosphérique. Chez l'orge, il a été montré que le ratio MSA/BR variait entre différentes lignées (George et al., 2014) mais également que l'augmentation de ce ratio MSA/BR s'accompagnait d'une amélioration de la croissance en conditions de déficit en phosphore et de déficit hydrique (Brown et al., 2012; George et al., 2014). Donc on pourrait penser que cette amélioration de la croissance en condition de déficit en phosphore soit due entre autres à une *activité phosphatase* plus importante dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation rhizosphérique

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette convergence entre certaines activités enzymatiques et l'agrégation rhizosphérique. D'une part, l'exsudation racinaire du mil serait variable entre les différentes lignées comme c'est le cas chez le riz, le sorgho et chez *Arabidopsis thaliana* (Aulakh et al., 2001; Czarnota et al., 2003; Micallef et al., 2009). Et ceci agirait sur les communautés microbiennes impliquées en même temps dans l'agrégation du sol rhizosphérique (production d'EPS) et dans les cycles des nutriments (libération d'enzymes extracellulaires). D'autre part, ceci pourrait être également lié à une influence différentielle (effet lignée) et directe des racines sur ces activités enzymatiques toujours à travers l'exsudation racinaire. En effet, en plus des phosphatases d'origine microbienne, les plantes peuvent également sécréter des phosphatases directement dans le sol en cas de déficit en phosphore

assimilable pour hydrolyser les phytates du sol (Hammond et al., 2004; Rengel and Marschner, 2005). Par ailleurs on sait que les caractéristiques du chevelu racinaire (présence et longueur), variables en fonction des lignées jouent aussi bien sur l'exsudation racinaire, sur l'agrégation du sol rhizosphérique (Delhaize et al., 2012; George et al., 2014), sur l'accumulation de phosphore dans les feuilles, sur la biomasse mais aussi sur la tolérance au déficit en phosphore (Brown et al., 2012).

IV.3.3- Relation entre la teneur en glomalines, le pH et l'agrégation rhizosphérique

Notre étude a montré que les plus fortes teneurs en glomalines sont enregistrées dans la rhizosphère de lignées L71, L253 et L132 dont les ratios MSA/BR sont relativement élevés. Par ailleurs, les pH mesurés dans la rhizosphère de ces lignées sont plus faibles ceux des autres lignées. Donc on pourrait penser que ces glomalines seraient secrétées par des champignons acidophiles et ces derniers seraient plus abondants dans la rhizosphère de ces lignées à forte agrégation que dans celle de certaines lignées à faible agrégation rhizosphérique.

Conclusion :

Cette étude a montré que la diversité des communautés microbiennes rhizosphérique du mil cultivé au champ ne présente qu'une modeste variabilité en fonction de la lignée. Par contre, certaines activités enzymatiques très importantes dans le recyclage de la matière organique (*Chitinase, Phosphatase et Béta-glucosidase*) varient significativement en fonction de l'accession de la céréale et leur stimulation entraîne une augmentation de l'azote minéral dans le sol rhizosphérique. Mieux encore, ces activités sont plus importantes dans la rhizosphère de certaines lignées à forte agrégation rhizosphérique comparée à celle des lignées à faible agrégation. Par ailleurs, même si la variabilité génétique de leur teneur dans les sols rhizosphériques des lignées de mil est faible, l'effet des glomalines ne peut être totalement exclu du processus de l'agrégation rhizosphérique comme les quantités les plus fortes ont été notées dans la rhizosphère de lignées à forte agrégation et les teneurs les plus faibles dans la rhizosphère de lignées à faible agrégation.

*Les résultats de ce chapitre font l'objet d'un article en préparation qui sera soumis à la revue **Applied and Environmental Microbiology***

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Discussion générale et Perspectives :

Dans la perspective de l'amélioration variétale du mil, une céréale très importante en Afrique de l'Ouest, une stratégie qui peut être proposée est de rechercher au sein de sa diversité, des traits racinaires adaptatifs aux conditions climatiques de plus en plus difficiles, parmi les caractéristiques qui peuvent aider à maintenir ou augmenter sa productivité. En effet, certaines études prédisent une diminution de la productivité du mil de l'ordre de 6% dans les zones les plus arides d'Afrique (Berg et al., 2013). Il est généralement connu que l'adaptation aux conditions arides peut être associée à des traits racinaires comme une architecture bien développée (Lynch, 2011), l'association avec des champignons mycorhiziens (Rodriguez et al., 2004) ou bien même à des interactions plus générales avec certains micro-organismes du sol (Grover et al., 2011). C'est dans ce dernier volet que s'inscrit notre travail de thèse dont l'objectif était donc de voir si les caractéristiques génétiques du mil jouent sur l'agrégation du sol rhizosphérique qui est un paramètre très intéressant dans la nutrition hydrominérale (Alami et al., 2000) et un indicateur des interactions rhizosphériques. L'objectif suivant était de vérifier si une variabilité de l'agrégation était liée aux caractéristiques microbiennes (diversité et activité) du sol rhizosphérique et enfin de voir les relations entre ces différents paramètres avec le rendement de la céréale. Pour ce faire des expérimentations de phénotypage ont été menées en serre sur deux lots de lignées de mil pour identifier des lignées présentant une agrégation rhizosphérique contrastée. Une analyse de la diversité des communautés microbiennes rhizosphériques a été effectuée en serre et au champ pour tester la relation entre agrégation et diversité microbienne.

1. Variabilité génétique de l'agrégation rhizosphérique chez le mil : importance et utilisation potentielle en sélection variétale

Les propriétés du sol limitent la productivité agricole partout à travers le monde (Broadley et al., 2007; Ismail et al., 2007; Lynch, 2007). En effet, les biodisponibilités de l'azote, du phosphore et du potassium constituent des facteurs limitants dans de nombreux sols agricoles (Fageria et al., 2010; Lynch, 2007; Mueller et al., 2012). En plus de ces contraintes, ces sols peuvent présenter des disponibilités en eau limitées entraînant des stress hydriques (Bengough, 2012; Richards et al., 2007). Face à cela, les plantes développent par leurs racines différents types de stratégies pour augmenter leur capacité d'absorption hydrominérale. Comme exemples, on peut citer le développement d'un chevelu racinaire, l'association avec des micro-organismes symbiotiques mais également l'amélioration des conditions physiques et biologiques dans la rhizosphère (White et al.,

2013). Ainsi, la formation d'une gaine racinaire c'est-à-dire l'adhésion des particules sableuses aux racines des plantes, un phénomène mis en évidence pour la première fois sur des plantes grasses dans le désert d'Afrique du nord par Price (1911), fait partie de ces traits adaptatifs par rapport au stress hydrique. Ce phénomène a été observé ensuite chez des céréales et chez d'autres plantes grasses chez lesquelles il joue un rôle important dans l'absorption des nutriments (Duell and Peacock, 1985; Goodchild and Myers, 1987; Vermeer and McCully, 1982). Une variabilité génétique de ce phénomène pourrait être exploitée en amélioration variétale chez le mil, l'une des céréales les plus résistantes à la sécheresse cultivée dans les régions les plus arides du monde. Ainsi, notre étude de criblage a porté sur deux lots de lignées de mil. Sur le premier lot de 86 lignées, le phénotypage effectué a mis en évidence une variabilité génétique de l'agrégation du sol rhizosphérique (évaluée par le ratio MSA/BR). En effet, dans le sous-groupe des 9 lignées contrastées sélectionnées à l'issue de ce premier criblage, le ratio MSA/BR variait entre 8,46 et 24,8, soit un facteur de 2,9 entre les lignées extrêmes. Dans le second lot de 181 lignées, le criblage a permis également de mettre en évidence une variabilité génétique de cette agrégation du sol rhizosphérique. Le sous-groupe des lignées contrastées sélectionnées dans ce lot montre une gamme de ratios MSA/BR variant entre 8,39 et 23,92 ; soit un facteur de 2,85 entre les extrêmes. Ainsi, quel que soit le lot considéré, la diversité génétique du mil influence significativement l'agrégation du sol rhizosphérique et mieux, dans les deux lots de lignées, l'amplitude de variation du ratio MSA/BR est quasiment la même. Une telle variabilité génétique a été observée dans une population de 144 lignées chez l'orge (George et al., 2014) mais avec une gamme de variation du ratio MSA/BR plus large variant entre 20 et 200 g/g. Et dans cette même étude, il a été également démontré que cette variabilité notée en serre était reproductible en conditions réelles (au champ) et qu'il existait des QTLs associés à ce phénotype, localisés sur le chromosome 2H. Cette variabilité génétique de la taille de la gaine racinaire a également été notée chez le blé et a été corrélée à une résistance du chevelu racinaire à l'acidité du sol (Delhaize et al., 2012). La structure racinaire joue donc un rôle important sur la masse de sol adhérent aux racines et il serait intéressant de l'étudier plus en détail au sein de lignées contrastées que nous avons identifiées.

Comme cela a été fait chez l'orge, une étude de génétique d'association entre le génotype des lignées de mil et le phénotype MSA/BR est en train d'être effectuée par une autre équipe du projet *NewPearl* (Equipe UMR DIADE/IRD) afin de rechercher des QTLs associés à ce paramètre et de désigner des gènes candidats pour le mil. Pour ce faire, les lignées de mil ont été génotypées par

séquençage (GBS : Genotyping by sequencing) (Huang et al., 2009). Les données génotypiques obtenues par GBS et celles phénotypiques que nous avons recueillies (ratio MSA/BR) de notre étude seront ensuite utilisées dans un modèle mixte, qui pourrait détecter des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) associés au ratio MSA/BR. Ainsi, des QTLs pourraient être cartographiés et à terme les gènes associés identifiés. Ces études seront complétées par l'étude du transcriptome ou « RNA sequencing » chez quelques-unes des lignées les plus contrastées afin de vérifier s'il y'aurait une expression différentielle de ces gènes candidats dans leurs transcriptome. L'expression de ces gènes pourrait être évaluée de manière plus ciblée par PCR quantitative. En outre, une approche par mutagenèse (utilisant des produits chimiques mutantes) pourrait aussi être également envisagée chez ces lignées contrastées pour valider la fonction des gènes candidats.

2. Rôle des micro-organismes dans l'agrégation rhizosphérique

Dans notre étude, la diversité des communautés microbiennes rhizosphériques a été étudiée sur des lignées présentant des niveaux d'agrégation contrastés d'abord dans une manipulation en pot, ensuite dans une manipulation sur le terrain. Dans la première expérimentation (en pot), les abondances des communautés bactériennes rhizosphériques cultivables et totales n'ont pas montré de variabilité significative entre les lignées contrastées. Donc ceci nous permet de dire que la différence d'agrégation n'est pas liée à l'abondance des bactéries vivant dans la rhizosphère. De plus des bactéries productrices d'EPS ont été isolées aussi bien dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation que dans celle des lignées à faible agrégation à des fréquences identiques. Cependant, la diversité de même que la composition de la communauté bactérienne totale ont été significativement impactées par la différence génétique entre les lignées de mil comme cela a été rapporté par de précédentes études sur *A. thaliana* (Lundberg et al., 2012; Micallef et al., 2009) et sur *M. truncatula* (Zancarini et al., 2012). En effet, dans notre étude les lignées à faible agrégation rhizosphérique avaient une diversité bactérienne et une abondance relative en *Bacillales* plus faibles que les lignées à forte agrégation qui ont affiché par ailleurs une abondance relative en *Rhizobiales* plus importante. Cependant, cette variabilité de la diversité des communautés bactériennes n'a pas montré de lien avec les propriétés structurales (biomasses aériennes ou racinaire) des lignées de mil. Alors que chez *M. truncatula* il a été mis en évidence une corrélation entre cette diversité de la communauté bactérienne rhizosphérique et les caractéristiques éco-

physiologiques de la plante comme la biomasse aérienne, la biomasse racinaire, la surface foliaire, l'activité photosynthétique, etc (Zancarini et al., 2012).

Par contre pour la communauté fongique, notre étude a révélé de très faibles variations sur la diversité et la composition dans la rhizosphère des différentes lignées de mil. Ainsi aucune relation entre communauté fongique et agrégation du sol rhizosphérique n'a pu être mise en évidence.

Au champ, l'étude de la diversité de la communauté bactérienne rhizosphérique des lignées contrastées n'a pas donné les mêmes résultats que lors de l'expérimentation en pot. En effet, dans cette étude, les différences notées sur certains indicateurs de diversité alpha étaient sans relation avec le niveau d'agrégation rhizosphérique de ces lignées contrastées alors que dans la manipulation en pot, non seulement la diversité alpha des communautés bactériennes rhizosphériques des lignées de mil était moins importante pour les lignées à faible agrégation comparées aux lignées à forte agrégation mais aussi la composition avait un lien avec l'agrégation. Ceci pourrait être lié aux conditions environnementales (température, humidité et propriétés physico-chimiques et biologiques du sol) susceptibles de variations importantes en conditions réelles. D'autres part, l'analyse de la bêta-diversité par le calcul des distances phylogénétiques Weighted UniFrac (Lozupone and Knight, 2005) ne montre pas de séparation entre les échantillons de sols des lignées à forte agrégation et ceux des lignées à faible agrégation. Par ailleurs, comme pour l'expérimentation en pot la variabilité de la diversité et de la composition de la communauté fongique est relativement faible et n'a montré aucune relation avec l'agrégation du sol rhizosphérique. Ainsi l'impact de la communauté fongique sur l'agrégation ne serait pas aussi important que celui de la communauté bactérienne. Ce faible impact de la communauté fongique sur la variabilité de l'agrégation rhizosphérique pourrait être mis en parallèle avec le fait que la teneur en glomelines, protéines d'origine mycorhizienne aux propriétés agrégeantes (Rillig, 2004; Wu et al., 2014), n'est pas très variable dans les sols rhizosphérique de ces lignées contrastées.

L'activité microbienne a été mesurée sur les sols rhizosphériques de lignées de mil présentant des niveaux d'agrégation variables par le dosage de la respiration induite par substrats (sur l'expérimentation en pot) et par respirométrie et dosage des activités enzymatiques (sur l'expérimentation au champ). Dans les deux cas, même si des variations significatives ont été notées sur la respiration du sol rhizosphérique entre certaines lignées de mil comme cela a été noté sur différents génotypes de maïs (Aira et al. 2010), celles-ci n'avaient pas de relation évidente avec

le niveau d'agrégation rhizosphérique. Sur l'expérimentation au champ, certaines activités enzymatiques (*Phosphatase acide*, *Chitinase* et *Béta-glucosidase*) étaient généralement plus importantes dans la rhizosphère de certaines lignées à forte agrégation que dans celle de certaines lignées à faible agrégation qui se séparent sur l'ACP basée sur ces activités. Même si des lignées à forte agrégation et des lignées à faible agrégation se séparent de manière similaire en termes d'activité enzymatique et de bêta-diversité des espèces bactériennes rares (PCoA avec les distances Unweighted UniFrac), la corrélation entre diversité des communautés bactériennes rhizosphériques et l'activité microbienne ne peut pas être clairement établie dans nos conditions.

3. Les facteurs biotiques déterminants de l'agrégation du sol rhizosphérique

Plusieurs facteurs d'ordre biologique ont été rapportés comme étant déterminant sur l'agrégation du sol au niveau de la rhizosphère des plantes. Ils comprennent l'activité des bactéries productrices d'exo-polysaccharide au niveau de la rhizosphère (Alami et al., 2000; Amellal et al., 1998; Berge et al., 2009), l'association avec des champignons mycorhiziens (Rillig et al., 2015; Wu et al., 2014, 2015) mais également les caractéristiques du chevelu racinaire (Brown et al., 2012; Delhaize et al., 2012; Moreno- Espíndola et al., 2007). Les deux premiers facteurs font intervenir les exsudats racinaires de la plante qui jouent un rôle très important aussi bien dans les relations plante-bactérie que dans l'association plante-champignon. Ainsi il est logique de penser qu'une variabilité génétique de la quantité ou de la qualité de ces exsudats puisse avoir des répercussions sur l'agrégation du sol rhizosphérique. En effet, de telles variabilités ont été déjà notées sur *A. thaliana* et sur le sorgho (Czarnota et al., 2003; Micallef et al., 2009). Il serait donc important pour aller plus en avant dans notre cas, d'étudier et de caractériser la composition moléculaire des exsudats racinaires des lignées de mil contrastées pour pouvoir mieux appréhender leur rôle dans les différences notées sur le ratio MSA/BR. Ceci pourrait se faire sur des plantes en culture dans un milieu hydroponique (Micallef et al., 2009) ou bien même des plantes poussant sur du sol en utilisant un système de rhizobox permettant de récupérer les exsudats sur des filtres d'absorption (Neumann et al., 2009, 2014).

Au niveau de la rhizosphère, l'action de l'exsudation racinaire sur la diversité de la communauté bactérienne totale (Baudoin et al., 2003; Paterson et al., 2007) peut impacter les bactéries productrices d'EPS et donc sur l'agrégation. Une partie de la variabilité notée sur l'agrégation du sol rhizosphérique des lignées contrastées pourrait donc être expliquée par une variabilité de leur

exsudation racinaire. Cependant il convient de noter que les souches de bactéries productrices d'EPS cultivables que nous avons pu isoler de la rhizosphère de ces lignées contrastées ne pouvaient pas expliquer à elles seules la variabilité de l'agrégation rhizosphérique. Cependant il ne faut pas perdre de vue que dans la rhizosphère de ces lignées il y a forcément de nombreuses autres souches de bactéries productrices d'EPS que nous n'avons pas isolées. Et il est probable de toutes façons qu'une approche par isolement, aussi intensive qu'elle soit, ne permette pas d'appréhender l'ensemble de cette diversité dans la mesure où seulement une faible proportion (entre 1 et 10%) des bactéries du sol peut être cultivée à l'état actuel des connaissances (Torsvik et al., 1996). Par ailleurs, des amorces PCR ciblant des gènes impliqués dans la biosynthèse des homopolysaccharides (Krajl et al., 2003; Tieking et al., 2003) et des hétéropolysaccharides (Deveau and Moineau, 2003; Provencher et al., 2003) ont déjà été développées et utilisées pour vérifier la production d'EPS chez les bactéries lactiques (Van der Meulen et al., 2007). Partant de ceux-ci, une approche moléculaire par développement d'amorces utilisables pour des approches métagénomiques ou q-PCR ciblant les gènes bactériens impliqués dans les voies de synthèse des polysaccharides pourrait permettre d'avoir plus d'information sur l'abondance de ces bactéries dans la rhizosphère de ces lignées contrastées et ainsi préciser davantage leur rôle dans le processus d'agrégation.

Le rôle des champignons dans l'agrégation du sol rhizosphérique semble assez peu important dans nos conditions. En effet, dans les 2 situations (en pot et au champ), la diversité et la composition de la communauté fongique ne variaient que faiblement en fonction des lignées, et n'ont présenté aucune corrélation avec l'intensité de l'agrégation rhizosphérique de ces lignées. En plus, bien que semi-quantitative, l'analyse de la diversité des champignons par NGS dans toutes les 2 situations a montré des effectifs relativement faibles au niveau de l'embranchement des *Gloméromycota* qui renferment les champignons mycorhiziens (moins de 0,4% en serre et moins de 0,03% au champ) qui sont pointés du doigt dans ce processus (Wu et al., 2014, 2015).

Des paramètres liés à l'architecture racinaire tels que la longueur et la densité du chevelu racinaire pourraient avoir une contribution très importante sur l'agrégation du sol rhizosphérique car les caractéristiques microbiennes seules ne peuvent pas expliquer toute les variabilités notées. Autrement dit une forte agrégation dans la rhizosphère peut avoir des raisons variables en fonction des lignées de mil. Ainsi, il se pose la question de savoir quelle est la contribution relative de

chacun de ces paramètres morpho-anatomiques, physiologiques et écologiques sur l'agrégation du sol rhizosphérique des plantes. Cette question pourrait être prise en charge en étudiant simultanément l'exsudation, les caractéristiques microbiennes rhizosphériques et les caractéristiques morphologiques du système racinaire de ces lignées contrastées.

4. L'impact de l'agrégation rhizosphérique sur les performances agronomiques

Sur les deux lots de lignées de mil, les expériences de phénotypage effectuées en serre ont montré qu'il y'avait une corrélation négative entre le ratio MSA/BR et les paramètres de croissance (biomasse aérienne et hauteur des plantes) (**Tableau 2 et Annexe 3**). En supposant que le ratio MSA/BR est proportionnel à l'exsudation racinaire, cette corrélation négative peut être liée au fait que cette dernière correspond à une perte en carbone organique pour la plante (Nguyen, 2003). Cependant chez divers cultivars de riz, il a été mise en évidence une corrélation positive entre l'exsudation racinaire et les paramètres de croissances (biomasse aérienne, biomasse racinaire et rendement en graines) (Aulakh et al., 2001). Ainsi, nos résultats sur les étapes précoces du développement (1 mois) semblent indiquer une tendance à une réduction de la croissance qu'il faudrait creuser plus en profondeur. Ceci dit le gain que l'on peut espérer en lien avec la stimulation de la communauté microbienne serait différé dans le temps et ne pourrait donc être senti qu'après une certaine durée.

Contrairement à ce qui a été observé sur les différentes expérimentations en pot, nous n'avons trouvé aucune relation entre le ratio MSA/BR et les paramètres agronomiques caractérisés au champ par une équipe partenaire du projet *New-Pearl* (**Annexe 4**). On peut émettre l'hypothèse que ceci soit lié à une compensation de la perte en carbone liée aux exsudats racinaires, par l'effet qu'ont à terme ces mêmes exsudats racinaires sur la mobilisation des nutriments, dans la mesure où le temps de croissance est suffisamment long. En effet, il a été rapporté que les plantes peuvent modifier la biodisponibilité des nutriments par l'intermédiaire des exsudats racinaires dans des certaines conditions de déficit (Carvalhais et al., 2011; Jones et al., 2004; Rengel and Marschner, 2005). Ce résultat, qui reste à conforter, serait particulièrement intéressant sur le plan écologique parce qu'il laisse supposer qu'il serait possible de sélectionner des variétés de plante qui allouent au sol une quantité de carbone plus importante tout en restant performantes sur le plan agronomique.

5. Est-il possible de modéliser l'exsudation racinaire des cultures pour séquestrer plus de carbone dans les sols ?

Le sol constitue le deuxième réservoir de carbone ($1,5 \times 10^{12}$ t C) après les océans ($3,8 \times 10^{13}$ t C), suivi de l'atmosphère ($7,5 \times 10^{11}$ t C) et des plantes ($5,6 \times 10^{11}$ t C) (Schlesinger and Andrews, 2000). Les plantes contribuent largement à ce pool de carbone terrestre en allouant d'importantes quantités de matière organique au sol. Cette allocation se fait à travers plusieurs mécanismes : le dépôt des litières, l'enfouissement des tissus racinaires mais également l'exsudation de composés carbonés. L'exsudation racinaire constitue environ 17 % de la quantité nette de carbone fixé par les plantes lors de la photosynthèse (Nguyen, 2003). Par ailleurs, une variabilité génétique intra-spécifique de l'exsudation racinaire a été notée chez la plante modèle *A. thaliana* (Micallef et al., 2009), chez le sorgho (Czarnota et al., 2003) et chez le riz (Aulakh et al., 2001). Ainsi on peut imaginer la sélection de variétés de plantes à forte exsudation, si on détecte des QTLs associés à ce paramètre, pour augmenter la quantité de carbone dans le sol. Cependant il faudra répondre au préalable à un certain nombre d'interrogations.

La première est relative l'efficacité de la rhizodéposition chez les plantes c'est-à-dire si la plante gagne ou perd en biomasse/rendement en augmentant sa rhizodéposition. En effet la biomasse produite est le premier apport de carbone des plantes à l'écosystème. A première vue on peut penser qu'une exsudation racinaire intense se fait au détriment de l'élaboration de biomasse car elle représente une perte de carbone réduit pour la plante. Ceci semble être corroboré dans notre expérimentation en serre, compte tenu de la corrélation négative entre le ratio MSA/BR et les paramètres de croissance. Toutefois, il convient de noter que le paramètre mesuré MSA/BR correspond à une approximation de l'exsudation qui n'a pas été mesurée de manière directe sur nos lignées de mil. A l'opposé, Aulakh et al (2001) ont montré qu'il y'avait une corrélation positive entre l'exsudation racinaire et les performances agronomiques de différentes variétés de riz. Ainsi des tests plus poussés devraient être effectués sur le maximum d'accessions et pour différents systèmes de culture dans des contextes aussi variés que possible avant de pouvoir trancher sur cette question de l'effet de l'exsudation racinaire sur le rendement de la plante.

La seconde préoccupation est en rapport avec le devenir du carbone exsudé dans le sol. En effet une fois dans le sol ce carbone peut subir plusieurs transformations. Il est connu que la majeure partie des substances excrétées dans le sol correspond à du carbone labile (acides organiques,

mucilages, acides aminés) et donc facilement dégradable par les micro-organismes (Micallef et al., 2009; Nguyen, 2003). Toutefois l'activité des bactéries contribue à la production de polysaccharides et ainsi à la formation et la stabilisation des agrégats du sol (Alami et al., 2000; Berge et al., 2009; Bezzate et al., 2000) et ces derniers contribuent à la séquestration de carbone dans le sol en stabilisant la matière organique (Six et al., 2000). Cependant pour diminuer l'émission de méthane (un gaz à effet de serre) en système de culture inondé, Aulakh et al (2001) promeuvent plutôt les variétés de riz à faible exsudation racinaire pour limiter l'activité des bactéries méthanogènes qui utilisent ces substrats carbonés et qui libèrent des gaz à effet de serre (Dannenberg and Conrad, 1999; Lu et al., 2000). Donc à travers cet exemple, on s'aperçoit de la nécessité d'étudier ce phénomène de façon holistique en tenant en compte de tous les processus d'échange et de transformation de cette MO et du contexte de culture avant de pouvoir trancher la question de l'impact positif ou négatif de l'exsudation racinaire sur le bilan carbone de l'agroécosystème.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abiven, S., Menasseri, S., and Chenu, C. (2009). The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability – A literature analysis. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1–12. doi:10.1016/j.soilbio.2008.09.015.
- Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Martel, M.-H., and Heulin, T. (1999). *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49, 787–794. doi:10.1099/00207713-49-2-787.
- Adam, G., and Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 943–951. doi:10.1016/S0038-0717(00)00244-3.
- Ahrenholtz, I., Harms, K., Vries, J. de, and Wackernagel, W. (2000). Increased Killing of *Bacillus subtilis* on the Hair Roots of Transgenic T4 Lysozyme-Producing Potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1862–1865. doi:10.1128/AEM.66.5.1862-1865.2000.
- Aira, M., Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Bååth, E., and Domínguez, J. (2010). Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 42, 2276–2281. doi:10.1016/j.soilbio.2010.08.029.
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., and Heulin, T. (2000). Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3393–3398. doi:10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000.
- Allison, S. D., and Vitousek, P. M. (2005). Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biol. Biochem.* 37, 937–944. doi:10.1016/j.soilbio.2004.09.014.
- Amato, M., and Ladd, J. N. (1988). Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, 107–114. doi:10.1016/0038-0717(88)90134-4.
- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F., and Heulin, T. (1998). Colonization of Wheat Roots by an Exopolysaccharide-Producing *Pantoea agglomerans* Strain and Its Effect on Rhizosphere Soil Aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3740–3747.
- Andrews, D. J., and Kumar, K. A. (1992). Pearl Millet for Food, Feed, and Forage. *Adv. Agron.* 48, 89–139. doi:10.1016/S0065-2113(08)60936-0.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., and Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol. Fertil. Soils* 40, 157–162. doi:10.1007/s00374-004-0766-y.

- Aulakh, M. S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., and Rennenberg, H. (2001). Characterization of Root Exudates at Different Growth Stages of Ten Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Plant Biol.* 3, 139–148. doi:10.1055/s-2001-12905.
- A. Verdugo, J., Francis, F., and C. Ramírez, C. (2016). A review on the complexity of insect-plant interactions under varying levels of resources and host resistance: the case of *Myzus persicae*-*Prunus persica*. *BASE*. Available at: <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=13218> [Accessed February 14, 2017].
- Bacic, A., Moody, S. F., McComb, J., Hinch, J., and Clarke, A. (1987). Csiro publishing | Functional Plant Biology. *Aust. J. Plant Physiol.* 14, 633–641. doi:10.1071/PP9870633.
- Bais, H. P., Park, S.-W., Weir, T. L., Callaway, R. M., and Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9, 26–32. doi:10.1016/j.tplants.2003.11.008.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
- Bakken, L. R. (1997). “culturable and nonculturable bacteria in soil,” in *Modern Soil Microbiology* (New York, USA), 47–61.
- Bao, X., Yu, J., Liang, W., Lu, C., Zhu, J., and Li, Q. (2015). The interactive effects of elevated ozone and wheat cultivars on soil microbial community composition and metabolic diversity. *Appl. Soil Ecol.* 87, 11–18. doi:10.1016/j.apsoil.2014.11.003.
- Bardgett, R. D., Mommer, L., and Vries, F. T. D. (2014). Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. *Trends Ecol. Evol.* 29, 692–699. doi:10.1016/j.tree.2014.10.006.
- Barea, J.-M., Pozo, M. J., Azcón, R., and Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1761–1778. doi:10.1093/jxb/eri197.
- Baudoin, E., Benizri, E., and Guckert, A. (2002). Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl. Soil Ecol.* 19, 135–145. doi:10.1016/S0929-1393(01)00185-8.
- Baudoin, E., Benizri, E., and Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1183–1192. doi:10.1016/S0038-0717(03)00179-2.
- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E., et al. (2009). Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1491–1496. doi:10.1016/j.soilbio.2009.04.005.
- Bengough, A. G. (2012). Water Dynamics of the Root Zone: Rhizosphere Biophysics and Its Control on Soil Hydrology. *Vadose Zone J.* 11, vzj2011.0111. doi:10.2136/vzj2011.0111.

- Berendse, F., Ruijven, J. van, Jongejans, E., and Keesstra, S. (2015). Loss of Plant Species Diversity Reduces Soil Erosion Resistance. *Ecosystems* 18, 881–888. doi:10.1007/s10021-015-9869-6.
- Berg, A., de Noblet-Ducoudré, N., Sultan, B., Lengaigne, M., and Guimberteau, M. (2013). Projections of climate change impacts on potential C4 crop productivity over tropical regions. *Agric. For. Meteorol.* 170, 89–102. doi:10.1016/j.agrformet.2011.12.003.
- Berg, G., and Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
- Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santaella, C., Roncato, M.-A., Christen, R., et al. (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 367–372. doi:10.1099/ijs.0.000521-0.
- Bertin, C., Yang, X., and Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256, 67–83. doi:10.1023/A:1026290508166.
- Bezançon, G. (2004). *Ressources génétiques des mils en Afrique de l'Ouest : Diversité, conservation et valorisation*. mil IRD édition.
- Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O., and Heulin, T. (2000). Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 2, 333–342. doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00114.x.
- Bloem, J., Bolhuis, P. R., Veninga, M., and Wieringa, J. (1995). “Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil,” in *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (New York: Academic Press), 162–173. Available at: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/300230> [Accessed July 18, 2017].
- Bouffaud, M.-L., Kyselková, M., Gouesnard, B., Grundmann, G., Muller, D., and Moëgne-Loccoz, Y. (2012). Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? *Mol. Ecol.* 21, 195–206. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05359.x.
- Bremner, J. M. (1965). Inorganic Forms of Nitrogen. *Methods Soil Anal. Part 2 Chem. Microbiol. Prop. agronomy monogra*, 1179–1237. doi:10.2134/agronmonogr9.2.c33.
- Brigham, L. A., Woo, H. H., Nicoll, S. M., and Hawes, M. C. (1995). Differential Expression of Proteins and mRNAs from Border Cells and Root Tips of Pea. *Plant Physiol.* 109, 457–463. doi:10.1104/pp.109.2.457.
- Brimecombe, M. J., Delelj, F. A., and Lynch, J. M. (2001). “The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations,” in *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface* (New York, USA: Marcel Dekker), 95–140.

- Brink, M., Belay, G., and Wet, J. de (2006). Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1: Céréales et légumes secs. *Ed. M Brink*. Available at: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/1798336> [Accessed December 15, 2016].
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., and Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytol.* 173, 677–702. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x.
- Bronick, C. J., and Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124, 3–22. doi:10.1016/j.geoderma.2004.03.005.
- Brown, L. K., George, T. S., Thompson, J. A., Wright, G., Lyon, J., Dupuy, L., et al. (2012). What are the implications of variation in root hair length on tolerance to phosphorus deficiency in combination with water stress in barley (*Hordeum vulgare*)? *Ann. Bot.* 110, 319–328. doi:10.1093/aob/mcs085.
- Brück, H., Sattelmacher, B., and Payne, W. A. (2003). Varietal differences in shoot and rooting parameters of pearl millet on sandy soils in Niger. *Plant Soil* 251, 175–185. doi:10.1023/A:1022932815486.
- Brunken, J., Wet, J. M. J. de, and Harlan, J. R. (1977). The morphology and domestication of pearl millet. *Econ. Bot.* 31, 163–174. doi:10.1007/BF02866587.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., et al. (2015). Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host Microbe* 17, 392–403. doi:10.1016/j.chom.2015.01.011.
- Burns, R. G. (1982). Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 14, 423–427. doi:10.1016/0038-0717(82)90099-2.
- Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Davidson, M. S., and Potts, J. M. (2003). A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3593–3599. doi:10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003.
- Caporaso, J. G., Bittinger, K., Bushman, F. D., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., and Knight, R. (2010a). PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267. doi:10.1093/bioinformatics/btp636.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010b). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., and Donna, B.-L. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* 108, 4516–4522. doi:10.1073/pnas.1000080107.

- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Badri, D. V., Kidd, B. N., Vivanco, J. M., and Schenk, P. M. (2015). Linking Jasmonic Acid Signaling, Root Exudates, and Rhizosphere Microbiomes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 1049–1058. doi:10.1094/MPMI-01-15-0016-R.
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.-R., Borriss, R., and von Wirén, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 3–11. doi:10.1002/jpln.201000085.
- Castaldini, M., Turrini, A., Sbrana, C., Benedetti, A., Marchionni, M., Mocali, S., et al. (2005). Impact of Bt Corn on Rhizospheric and Soil Eubacterial Communities and on Beneficial Mycorrhizal Symbiosis in Experimental Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6719–6729. doi:10.1128/AEM.71.11.6719-6729.2005.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., and Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* 8, 790–803. doi:10.1038/ismej.2013.196.
- Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., et al. (2011). Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. *PLoS ONE* 6, e24166. doi:10.1371/journal.pone.0024166.
- Chenu, C., and Guérif, J. (1991). Mechanical Strength of Clay Minerals as Influenced by an Adsorbed Polysaccharide. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55, 1076–1080. doi:10.2136/sssaj1991.03615995005500040030x.
- Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Nacamulli, C., and Tabacchioni, S. (1998). Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Appl. Soil Ecol.* 8, 11–18. doi:10.1016/S0929-1393(97)00071-1.
- Ciardi, C., and Nannipieri, P. (1990). A comparison of methods for measuring ATP in soil. *Soil Biol. Biochem.* 22, 725–727. doi:10.1016/0038-0717(90)90022-R.
- Clément, J.-C., Bezançon, G., and Billard, G. (1993). “Prospection des mils cultivés et des mils sauvages de l’Afrique de l’Ouest,” in *Le mil en Afrique : diversité génétique et agro-physiologique : potentialités et contraintes pour l’amélioration et la culture* Colloques et Séminaires., eds. S. Hamon and Réunion Thématique sur le Mil (#Pennisetum glaucum\$ L.), Montpellier (FRA), 1992/11/24-26 (Paris:ORSTOM),9–19. Available at:<http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:38946> [Accessed December 15, 2016].
- Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., and Smalla, K. (2006). Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 236–249. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00026.x.
- Czarnes, S., Dexter, A. R., and Bartoli, F. (2000). Wetting and drying cycles in the maize rhizosphere under controlled conditions. Mechanics of the root-adhering soil. *Plant Soil* 221, 253–271. doi:10.1023/A:1004747323220.

- Czarnota, M. A., Rimando, A. M., and Weston, L. A. (2003). Evaluation of Root Exudates of Seven Sorghum Accessions. *J. Chem. Ecol.* 29, 2073–2083. doi:10.1023/A:1025634402071.
- Dakora, F. D., and Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245, 35–47. doi:10.1023/A:1020809400075.
- Dannenberg, S., and Conrad, R. (1999). Effect of rice plants on methane production and rhizospheric metabolism in paddy soil. *Biogeochemistry* 45, 53–71. doi:10.1007/BF00992873.
- Daouda Ousmane, S., Emmanuel, R., and Marini, P. (1993). “Rôle du système racinaire dans la résistance à la sécheresse chez le mil : analyse de la rhizogenèse post-florale,” in *Le mil en Afrique : diversité génétique et agro-physiologique : potentialités et contraintes pour l'amélioration et la culture* Colloques et Séminaires., eds. S. Hamon and Réunion Thématique sur le Mil (#Pennisetum glaucum\$ L.), Montpellier (FRA), 1992/11/24-26 (Paris: ORSTOM), 205–218. Available at: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:38962> [Accessed October 31, 2016].
- Darrah, P. R. (1993). The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant Soil* 155/156, 1–20.
- De León-González, F., Celada-Tornel, E., Hidalgo-Moreno, C. I., Etchevers-Barra, J. D., Gutiérrez-Castorena, M. C., and Flores-Macías, A. (2006). Root–soil adhesion as affected by crop species in a volcanic sandy soil of Mexico. *Soil Tillage Res.* 90, 77–83. doi:10.1016/j.still.2005.08.007.
- Degens, B. P., Sparling, G. P., and Abbott, L. K. (1996). Increasing the length of hyphae in a sandy soil increases the amount of water-stable aggregates. *Appl. Soil Ecol.* 3, 149–159. doi:10.1016/0929-1393(95)00074-7.
- Delhaize, E., James, R. A., and Ryan, P. R. (2012). Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (*Triticum aestivum*) grown on acid soil. *New Phytol.* 195, 609–619. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04183.x.
- Delhaize, E., Ryan, P. R., and Randall, P. J. (1993). Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices). *Plant Physiol.* 103, 695–702. doi:10.1104/pp.103.3.695.
- Denef, K., and Six, J. (2005). Clay mineralogy determines the importance of biological versus abiotic processes for macroaggregate formation and stabilization. *Eur. J. Soil Sci.* 56, 469–479. doi:10.1111/j.1365-2389.2004.00682.x.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., et al. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. doi:10.1128/AEM.03006-05.

- Deveau, H., and Moineau, S. (2003). Technical Note: Use of RFLP to Characterize *Lactococcus lactis* Strains Producing Exopolysaccharides. *J. Dairy Sci.* 86, 1472–1475. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73731-X.
- Diakhaté, S., Gueye, M., Chevallier, T., Diallo, N. H., Assigbetse, K., Abadie, J., et al. (2016). Soil microbial functional capacity and diversity in a millet-shrub intercropping system of semi-arid Senegal. *J. Arid Environ.* 129, 71–79. doi:10.1016/j.jaridenv.2016.01.010.
- Dormaar, J. F. (1990). Effect of active roots on the decomposition of soil organic materials. *Biol. Fertil. Soils* 10, 121–126. doi:10.1007/BF00336247.
- Duell, R. W., and Peacock, G. R. (1985). Rhizosheaths on Mesophytic Grasses. *Crop Sci.* 25, 880–883. doi:10.2135/cropsci1985.0011183X002500050036x.
- Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., and Lörz, H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.* 3, 587–598. doi:10.1046/j.1365-313X.1993.03040587.x.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Einhellig, F. A. (1994). “Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy,” in *Allelopathy* ACS Symposium Series. (American Chemical Society), 96–116. doi:10.1021/bk-1995-0582.ch007.
- Eldin, M. (1993). Analyse de l’effet des déficits hydriques sur la récolte du mil au Niger: conséquences agronomiques. Available at: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:38958> [Accessed April 5, 2017].
- Fageria, N. ., Baligar, V. ., and Jones, C. . (2010). *Growth and Mineral Nutrition of Field Crops, Third Edition*. CRC Press. Available at: <https://www.crcpress.com/Growth-and-Mineral-Nutrition-of-Field-Crops-Third-Edition/Fageria-Baligar-Jones/p/book/9781439816950> [Accessed July 30, 2017].
- FAO (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nation. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [Accessed February 16, 2017].
- FAO (2015). Status of the World’s Soil Resources - FAO, 648 p. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf> [Accessed January 31, 2017].
- Faoro, H., Alves, A. C., Souza, E. M., Rigo, L. U., Cruz, L. M., Al-Janabi, S. M., et al. (2010). Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4744–4749. doi:10.1128/AEM.03025-09.
- Fellbaum, C. R., Gachomo, E. W., Beesetty, Y., Choudhari, S., Strahan, G. D., Pfeffer, P. E., et al. (2012). Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2666–2671. doi:10.1073/pnas.1118650109.

- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., and Jackson, R. B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4117–4120. doi:10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005.
- Fierer, N., and Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 626–631. doi:10.1073/pnas.0507535103.
- Flanagan, J. L., Brodie, E. L., Weng, L., Lynch, S. V., Garcia, O., Brown, R., et al. (2007). Loss of Bacterial Diversity during Antibiotic Treatment of Intubated Patients Colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1954–1962. doi:10.1128/JCM.02187-06.
- Fraser, T. D., Lynch, D. H., Gaiero, J., Khosla, K., and Dunfield, K. E. (2017). Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Appl. Soil Ecol.* 111, 48–56. doi:10.1016/j.apsoil.2016.11.013.
- Frey, S. D., Knorr, M., Jeri, L. P., and Rodney, T. S. (2004). Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *For. Ecol. Manag.*, 159–171.
- Fusseder, A. (1987). The longevity and activity of the primary root of maize. *Plant Soil* 101, 257–265. doi:10.1007/BF02370653.
- Garland, J. L., and Mills, A. L. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359.
- Gemenet, D. C., Leiser, W. L., Zangre, R. G., Angarawai, I. I., Sanogo, M. D., Sy, O., et al. (2015). Association analysis of low-phosphorus tolerance in West African pearl millet using DArT markers. *Mol. Breed.* 35, 1–20. doi:10.1007/s11032-015-0361-y.
- George, T. S., Brown, L. K., Ramsay, L., White, P. J., Newton, A. C., Bengough, A. G., et al. (2014). Understanding the genetic control and physiological traits associated with rhizosheath production by barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytol.* 203, 195–205. doi:10.1111/nph.12786.
- Giagnoni, L., Pastorelli, R., Mocali, S., Arenella, M., Nannipieri, P., and Renella, G. (2016). Availability of different nitrogen forms changes the microbial communities and enzyme activities in the rhizosphere of maize lines with different nitrogen use efficiency. *Appl. Soil Ecol.* 98, 30–38. doi:10.1016/j.apsoil.2015.09.004.
- Girvan, M. S., Bullimore, J., Pretty, J. N., Osborn, A. M., and Ball, A. S. (2003). Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1800–1809. doi:10.1128/AEM.69.3.1800-1809.2003.
- Goodchild, D. J., and Myers, L. F. (1987). Rhizosheaths -a neglected phenomenon in Australian agriculture. *Aust. J. Agric. Res.* 38, 559–563. doi:10.1071/ar9870559.

- Goswami, A. K., Sharma, K. P., and Sehgal, K. L. (1969). Nutritive value of proteins of pearl millet of high-yielding varieties and hybrids. *Br. J. Nutr.* 23, 913–916.
- Götz, M., Nirenberg, H., Krause, S., Wolters, H., Draeger, S., Buchner, A., et al. (2006). Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 404–413. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00169.x.
- Gould, I. J., Quinton, J. N., Weigelt, A., De Deyn, G. B., and Bardgett, R. D. (2016). Plant diversity and root traits benefit physical properties key to soil function in grasslands. *Ecol. Lett.* 19, 1140–1149. doi:10.1111/ele.12652.
- Gouzou, L., Burtin, G., Philippy, R., Bartoli, F., and Heulin, T. (1993). Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. *Geoderma* 56, 479–491. doi:10.1016/0016-7061(93)90128-8.
- Graf, F., and Frei, M. (2013). Soil aggregate stability related to soil density, root length and mycorrhiza using site-specific *Alnus incana* and *Melanogaster variegatus* s.l. *Ecol. Eng.* 57, 314–323. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.037.
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., and Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1231–1240. doi:10.1007/s11274-010-0572-7.
- Guemouri-Athmani, S., Berge, O., Bourrain, M., Mavingui, P., Thiéry, J. M., Bhatnagar, T., et al. (2000). Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36, 149–159. doi:10.1016/S1164-5563(00)01056-6.
- Gyssels, G., Poesen, J., Bochet, E., and Li, Y. (2005). Impact of plant roots on the resistance of soils to erosion by water: a review. *Prog. Phys. Geogr.* 29, 189–217. doi:10.1191/0309133305pp443ra.
- Haichar, F. el Z., Marol, C., and Berge, O. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.*, 1221–1230.
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., and Baird, D. J. (2011). Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLOS ONE* 6, e17497. doi:10.1371/journal.pone.0017497.
- Hammond, J. P., Broadley, M. R., and White, P. J. (2004). Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. *Ann. Bot.* 94, 323–332. doi:10.1093/aob/mch156.
- Hausmann, B. I. G., Fred Rattunde, H., Weltzien-Rattunde, E., Traoré, P. S. C., vom Brocke, K., and Parzies, H. K. (2012). Breeding Strategies for Adaptation of Pearl Millet and Sorghum to Climate Variability and Change in West Africa. *J. Agron. Crop Sci.* 198, 327–339. doi:10.1111/j.1439-037X.2012.00526.x.

- Hayano, K. (1973). A method for the determination of β -glucosidase activity in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 19, 103–108. doi:10.1080/00380768.1973.10432524.
- Hebbar, K. P., Gueniot, B., Heyraud, A., Colin-Morel, P., Heulin, T., Balandreau, J., et al. (1992). Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 248–253. doi:10.1007/BF00174477.
- Heller, R., Esnault, R., and Lance, C. (1993). *Physiologie végétale.vol.1, nutrition.* 5 édition. Paris: Masson Available at: <http://archives.umc.edu.dz/handle/123456789/122053> [Accessed March 23, 2017].
- Heuer, H., Wieland, G., Schönfeld, J., Smalla, K., Gomes, N., and Schönwälder, A. (2001). “Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis,” in *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Application* (Rochelle), pp.177-190. Available at: https://www.researchgate.net/publication/284098568_Bacterial_community_profiling_using_DGGE_or_TGGE_analysis [Accessed July 18, 2017].
- Heulin, T., Barakat, M., Christen, R., Lesourd, M., Sutra, L., Luca, G. D., et al. (2003). *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 589–594. doi:10.1099/ijs.0.02482-0.
- Hiltner, L. (1904). Über neue erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft* 98,59–78 -. *Arb. Dtsch. Landwirtsch. Ges.*, 59–78.
- Hoffland, E., Wei, C., and Wissuwa, M. (2006). Organic Anion Exudation by Lowland Rice (*Oryza sativa* L.) at Zinc and Phosphorus Deficiency. *Plant Soil* 283, 155–162. doi:10.1007/s11104-005-3937-1.
- Holden, J. (1975). Use of nuclear staining to assess rates of cell death in cortices of cereal roots. *Soil Biol. Biochem.*, 333–334.
- Huang, X., Feng, Q., Qian, Q., Zhao, Q., Wang, L., Wang, A., et al. (2009). High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res.* 19, 1068–1076. doi:10.1101/gr.089516.108.
- Hume, M. E., Hernandez, C. A., Barbosa, N. A., Sakomura, N. K., Dowd, S. E., and Oviedo-Rondón, E. O. (2012). Molecular Identification and Characterization of Ileal and Cecal Fungus Communities in Broilers Given Probiotics, Specific Essential Oil Blends, and Under Mixed *Eimeria* Infection. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 853–860. doi:10.1089/fpd.2011.1093.
- Ishimaru, Y., Kim, S., Tsukamoto, T., Oki, H., Kobayashi, T., Watanabe, S., et al. (2007). Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7373–7378. doi:10.1073/pnas.0610555104.

- Ismail, A. M., Heuer, S., Thomson, M. J., and Wissuwa, M. (2007). Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. *Plant Mol. Biol.* 65, 547–570. doi:10.1007/s11103-007-9215-2.
- Johansen, A., and Olsson, S. (2005). Using Phospholipid Fatty Acid Technique to Study Short-Term Effects of the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the Microbial Microbiota in Barley Rhizosphere. *Microb. Ecol.* 49, 272–281. doi:10.1007/s00248-004-0135-2.
- Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V., and Sørensen, J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biol. Fertil. Soils* 33, 443–453. doi:10.1007/s003740100351.
- Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205, 25–44. doi:10.1023/A:1004356007312.
- Jones, D. L., Dennis, P. G., Owen, A. G., and Hees, P. A. W. van (2003). Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil* 248, 31–41. doi:10.1023/A:1022304332313.
- Jones, D. L., Hodge, A., and Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* 163, 459–480. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x.
- Jurasinski, G., Retzer, V., and Beierkuhnlein, C. (2009). Inventory, differentiation, and proportional diversity: a consistent terminology for quantifying species diversity. *Oecologia* 159, 15–26. doi:10.1007/s00442-008-1190-z.
- Kaci, Y., Heyraud, A., Barakat, M., and Heulin, T. (2005). Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure☆. *Res. Microbiol.* 156, 522–531. doi:10.1016/j.resmic.2005.01.012.
- Kandeler, E., and Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72. doi:10.1007/BF00257924.
- Kielak, A., Pijl, A. S., Veen, J. A. V., and Kowalchuk, G. A. (2008). Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 372–382. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00428.x.
- Kochian, L. V., Pineros, M. A., and Hoekenga, O. A. (2005). The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity | SpringerLink. *Plant Soil*, 175–195.
- Koide, R. T., and Peoples, M. S. (2013). Behavior of Bradford-reactive substances is consistent with predictions for glomalin. *Appl. Soil Ecol.* 63, 8–14. doi:10.1016/j.apsoil.2012.09.015.

- Kountche, B. A., Hash, C. T., Dodo, H., Laoualy, O., Sanogo, M. D., Timbeli, A. T., et al. (2013). Development of a pearl millet *Striga*-resistant genepool: Response to five cycles of recurrent selection under *Striga*-infested field conditions in West Africa. *Field Crops Res.* 154, 82–90.
- Krajl, S., Geel-Schutten, G. H. V., Maarel, M. J. E. C. V. D., and Dijkhuizen, L. (2003). Efficient Screening Methods for Glucosyltransferase Genes in *Lactobacillus* Strains. *Biocatal. Biotransformation* 21, 181–187. doi:10.1080/10242420310001618519.
- Kuzyakov, Y. (2010). Priming effects: interactions between living and dead organic matter. *Soil Biol Biochem* 42: 1363-1371 (PDF Download Available). *Soil Biol. Biochem.* 49, 1363–1371. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003.
- Lambers, H., Shane, M. W., Cramer, M. D., Pearse, S. J., and Veneklaas, E. J. (2006). Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Ann. Bot.* 98, 693–713. doi:10.1093/aob/mcl114.
- Larousse, É. (2002). Larousse agricole 2002. Available at: <http://www.larousse.fr/archives/agricole/page/373> [Accessed February 14, 2017].
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., and Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2407–2415. doi:10.1016/j.soilbio.2008.05.021.
- Li, X., Zhang, J., Gai, J., Cai, X., Christie, P., and Li, X. (2015). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi of sedges to soil aggregation along an altitudinal alpine grassland gradient on the Tibetan Plateau. *Environ. Microbiol.* 17, 2841–2857. doi:10.1111/1462-2920.12792.
- Lienhard, P., Tivet, F., Chabanne, A., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Sayphoummie, S., et al. (2012). No-till and cover crops shift soil microbial abundance and diversity in Laos tropical grasslands. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 375–384. doi:10.1007/s13593-012-0099-4.
- Lloyd, D. A., Ritz, K., Paterson, E., and Kirk, G. J. D. (2016). Effects of soil type and composition of rhizodeposits on rhizosphere priming phenomena. *Soil Biol. Biochem.* 103, 512–521. doi:10.1016/j.soilbio.2016.10.002.
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005). UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., and Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J.* 5, 169–172. doi:10.1038/ismej.2010.133.
- Lu, Y., Wassmann, R., Neue, H. U., Huang, C., and Bueno, C. S. (2000). Methanogenic responses to exogenous substrates in anaerobic rice soils. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1683–1690. doi:10.1016/S0038-0717(00)00085-7.

- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., et al. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488, 86–90. doi:10.1038/nature11237.
- Lynch, J.M. (1983) *Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lynch, J. M., Benedetti, A., Insam, H., Nuti, M. P., Smalla, K., Torsvik, V., et al. (2004). Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* 40, 363–385. doi:10.1007/s00374-004-0784-9.
- Lynch, J. M., and Bragg, E. (1985). Microorganisms and Soil Aggregate Stability. 133–171. doi:10.1007/978-1-4612-5088-3_3.
- Lynch, J. M., and Whipps, J. M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129, 1–10. doi:10.1007/BF00011685.
- Lynch, J. P. (2007). Roots of the Second Green Revolution. *Aust. J. Bot.* 55, 493–512. doi:10.1071/BT06118.
- Lynch, J. P. (2011). Root Phenes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. *Plant Physiol.* 156, 1041–1049. doi:10.1104/pp.111.175414.
- Maiti, R. K., and Bidinger, F. R. (1981). Growth and development of the pearl millet plant. - Research Bulletin No 6. Patancheru, A P., India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Mansouri, H., Petit, A., Oger, P., and Dessaux, Y. (2002). Engineered Rhizosphere: the Trophic Bias Generated by Opine-Producing Plants Is Independent of the Opine Type, the Soil Origin, and the Plant Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2562–2566. doi:10.1128/AEM.68.5.2562-2566.2002.
- Marques, J. M., Silva, D., F, T., Vollu, R. E., Blank, A. F., Ding, G.-C., et al. (2014). Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 424–435. doi:10.1111/1574-6941.12313.
- Meharg, A. A. (1994). A critical review of labelling techniques used to quantify rhizosphere carbon-flow. *Plant Soil* 166, 55–62. doi:10.1007/BF02185481.
- Mendes, R., Kruijt, M., Bruijn, I. de, Dekkers, E., Voort, M. van der, Schneider, J. H. M., et al. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science* 332, 1097–1100. doi:10.1126/science.1203980.
- Mersi, W. von, and Schinner, F. (1991). An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils* 11, 216–220. doi:10.1007/BF00335770.

- Micallef, S. A., Shiaris, M. P., and Colón-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J. Exp. Bot.* 60, 1729–1742. doi:10.1093/jxb/erp053.
- Moreno-Espíndola, I. P., Rivera-Becerril, F., de Jesús Ferrara-Guerrero, M., and De León-González, F. (2007). Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2520–2526. doi:10.1016/j.soilbio.2007.04.021.
- Morgan, J. a. W., Bending, G. D., and White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1729–1739. doi:10.1093/jxb/eri205.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C., et al. (2006). Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytol.* 170, 165–175. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01650.x.
- Muehlig-Versen, B., Buerkert, A., Bationo, A., and Roemheld, V. (2003). PHOSPHORUS PLACEMENT ON ACID ARENOSOLS OF THE WEST AFRICAN SAHEL. *Exp. Agric.* 39, 307–325. doi:10.1017/S0014479703001261.
- Mueller, N. D., Gerber, J. S., Johnston, M., Ray, D. K., Ramankutty, N., and Foley, J. A. (2012). Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature* 490, 254–257. doi:10.1038/nature11420.
- Muyzer, G., and Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127–141. doi:10.1023/A:1000669317571.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., and Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655–670. doi:10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., et al. (2007). Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Cienc. Suelo* 25, 89–97.
- National Research Council (1996). *Lost Crops of Africa: Volume I: Grains*. Washington, DC: The National Academies Press doi:10.17226/2305.
- Neumann, G., Bott, S., Ohler, M., Mock, H.-P., Lippmann, R., Grosch, R., et al. (2014). Root exudation and root development of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Tizian) as affected by different soils. *Plant-Microbe Interact.* 5, 2. doi:10.3389/fmicb.2014.00002.
- Neumann, G., George, T. S., and Plassard, C. (2009). Strategies and methods for studying the rhizosphere—the plant science toolbox. *Plant Soil* 321, 431–456. doi:10.1007/s11104-009-9953-9.
- Neumann G., Römheld V., (2000) The release of root exudates as affected by the plant's

- physiological status, in: Pinton R., Varini Z., Nannipieri P. (Eds.), *Biochemistry and Organic substances at the soil-plant interface. The Rhizosphere, Biochemistry and Organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, Inc., pp. 41–93
- Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agron. Sustain. Dev.* 23, 22. doi:10.1051/agro:2003011.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., and Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *ResearchGate* 15, 327–337.
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., and Larsson, K.-H. (2008). Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol. Bioinforma. Online* 4, 193–201.
- Oades, J. M. (1978). MUCILAGES AT THE ROOT SURFACE. *Eur. J. Soil Sci.* 29, 1–16. doi:10.1111/j.1365-2389.1978.tb02025.x.
- Oades, J. M., Waters, A. G., Oades, J. M., and Waters, A. G. (1991). Aggregate hierarchy in soils. *Soil Res. Soil Res.* 29, 815–828. doi:10.1071/SR9910815.
- Oliver, K. L., Hamelin, R. C., and Hintz, W. E. (2008). Effects of Transgenic Hybrid Aspen Overexpressing Polyphenol Oxidase on Rhizosphere Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5340–5348. doi:10.1128/AEM.02836-07.
- Omidi, H., Tahmasebi, Z., Torabi, H., and Miransari, M. (2008). Soil enzymatic activities and available P and Zn as affected by tillage practices, canola (*Brassica napus* L.) cultivars and planting dates. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 443–450. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.05.002.
- Oren, A., and Steinberger, Y. (2008). Catabolic profiles of soil fungal communities along a geographic climatic gradient in Israel. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2578–2587. doi:10.1016/j.soilbio.2008.05.024.
- Panke-Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., Ley, R. E., and Kao-Kniffin, J. (2015). Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME J.* 9, 980–989. doi:10.1038/ismej.2014.196.
- Parham, J. A., and Deng, S. P. (2000). Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1183–1190. doi:10.1016/S0038-0717(00)00034-1.
- Passot, S., Gnacko, F., Moukouanga, D., Lucas, M., Guyomarc'h, S., Ortega, B. M., et al. (2016). Characterization of Pearl Millet Root Architecture and Anatomy Reveals Three Types of Lateral Roots. *Crop Sci. Hortic.*, 829. doi:10.3389/fpls.2016.00829.

- Paterson, E., Gebbing, T., Abel, C., Sim, A., and Telfer, G. (2007). Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytol.* 173, 600–610. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01931.x.
- Pathan, S. I., Ceccherini, M. T., Pietramellara, G., Puschenreiter, M., Giagnoni, L., Arenella, M., et al. (2015). Enzyme activity and microbial community structure in the rhizosphere of two maize lines differing in N use efficiency. *Plant Soil* 387, 413–424. doi:10.1007/s11104-014-2306-3.
- Paul, R. E., and Jones, R. L. (1975). Studies on the Secretion of Maize Root Cap Slime. *Plant Physiol.* 56, 307–312.
- Pausch, J., Loepmann, S., Kühnel, A., Forbush, K., Kuzyakov, Y., and Cheng, W. (2016). Rhizosphere priming of barley with and without root hairs. *Soil Biol. Biochem.* 100, 74–82. doi:10.1016/j.soilbio.2016.05.009.
- Payne, W. A., Lascano, R. J., Hossner, L. R., Wendt, C. W., and Onken, A. B. (1991). Pearl Millet Growth as Affected by Phosphorus and Water. *Agron. J.* 83, 942–948. doi:10.2134/agronj1991.00021962008300060005x.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., et al. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 6548–6553. doi:10.1073/pnas.1302837110.
- Peng, S., Guo, T., and Liu, G. (2013). The effects of arbuscular mycorrhizal hyphal networks on soil aggregations of purple soil in southwest China. *Soil Biol. Biochem.* 57, 411–417. doi:10.1016/j.soilbio.2012.10.026.
- Pérès, G., Cluzeau, D., Menasseri, S., Soussana, J. F., Bessler, H., Engels, C., et al. (2013). Mechanisms linking plant community properties to soil aggregate stability in an experimental grassland plant diversity gradient. *Plant Soil* 373, 285–299. doi:10.1007/s11104-013-1791-0.
- Peterson, R. L., and Farquhar, M. L. (1996). Root Hairs: Specialized Tubular Cells Extending Root Surfaces. *Bot. Rev.* 62, 1–40.
- Phillips, R. P., Brzostek, E., and Midgley, M. G. (2013). The mycorrhizal-associated nutrient economy: a new framework for predicting carbon–nutrient couplings in temperate forests. *New Phytol.* 199, 41–51. doi:10.1111/nph.12221.
- Pohl, M., Alig, D., Körner, C., and Rixen, C. (2009). Higher plant diversity enhances soil stability in disturbed alpine ecosystems. *Plant Soil* 324, 91–102. doi:10.1007/s11104-009-9906-3.
- Price, S. R. (1911). The Roots of Some North African Desert-Grasses. *New Phytol.* 10, 328–340. doi:10.1111/j.1469-8137.1911.tb06524.x.
- Prosser, J. A., Speir, T. W., and Stott, D. E. (2011). Soil Oxidoreductases and FDA Hydrolysis. *Methods Soil Enzymol.* sssabookseries, 103–124. doi:10.2136/sssabookser9.c6.

- Provencher, C., LaPointe, G., Sirois, S., Calsteren, M.-R. V., and Roy, D. (2003). Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers for Amplification of Priming Glycosyltransferase Genes of the Exopolysaccharide Locus in Strains of the *Lactobacillus casei* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3299–3307. doi:10.1128/AEM.69.6.3299-3307.2003.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., and Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341–361. doi:10.1007/s11104-008-9568-6.
- Radhouane, L. (2008). Caractéristiques hydriques du mil (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) en présence de contraintes hydriques. *C. R. Biol.* 331, 206–214. doi:10.1016/j.crv.2007.12.004.
- Rasche, F., Hödl, V., Poll, C., Kandeler, E., Gerzabek, M. H., Elsas, V., et al. (2006). Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 219–235. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00027.x.
- Rebafka, F.-P., Hebel, A., Bationo, A., Stahr, K., and Marschner, H. (1994). Short- and long-term effects of crop residues and of phosphorus fertilization on pearl millet yield on an acid sandy soil in Niger, West Africa. *Field Crops Res.* 36, 113–124. doi:10.1016/0378-4290(94)90060-4.
- Rengel, Z. (2002). “Genetic control of root exudation,” in *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants’ Genetic Capabilities* Developments in Plant and Soil Sciences., ed. J. J. Adu-Gyamfi (Springer Netherlands), 215–226. doi:10.1007/978-94-017-1570-6_24.
- Rengel, Z., and Marschner, P. (2005). Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytol.* 168, 305–312. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01558.x.
- Richards, R. A., Watt, M., and Rebetzke, G. J. (2007). Physiological traits and cereal germplasm for sustainable agricultural systems. *Euphytica* 154, 409–425. doi:10.1007/s10681-006-9286-1.
- Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.* 84, 355–363. doi:10.4141/S04-003.
- Rillig, M. C., Aguilar-Trigueros, C. A., Bergmann, J., Verbruggen, E., Veresoglou, S. D., and Lehmann, A. (2015). Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytol.* 205, 1385–1388. doi:10.1111/nph.13045.

- Ritz, K., and Young, I. (2011). *The Architecture and Biology of Soils: Life in Inner Space*. CABI.
- Rodriguez, R. J., Redman, R. S., and Henson, J. M. (2004). The Role of Fungal Symbioses in the Adaptation of Plants to High Stress Environments. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change* 9, 261–272. doi:10.1023/B:MITI.0000029922.31110.97.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., et al. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348–352. doi:10.1038/nature10242.
- Rougier M., Secretory activity of the root cap, in: Tanner B.W., Loewus F.A. (Eds.), *Extracellular Carbohydrates, Encyclopedia of Plant Physiol., New Series. Plant Carbohydrates II, Vol. 13, Springer-Verlag, Berlin, 1981, pp. 542–574.*
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., et al. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* 4, 1340–1351. doi:10.1038/ismej.2010.58.
- Rovira A.D., Foster R.C., Martin J.K. (1979). Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere, in: Harley J.L., Russell R.S. (Eds.), *The Soil Root Interface*, Academic Press, London, pp. 1–4.
- Ryan, P. R., Delhaize, E., and Jones, D. L. (2001). Function and Mechanism of Organic Anion Exudation from Plant Roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 527–560. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.527.
- Saïdou, A.-A., Mariac, C., Luong, V., Pham, J.-L., Bezançon, G., and Vigouroux, Y. (2009). Association Studies Identify Natural Variation at PHYC Linked to Flowering Time and Morphological Variation in Pearl Millet. *Genetics* 182, 899–910. doi:10.1534/genetics.109.102756.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Santaella, C., Schue, M., Berge, O., Heulin, T., and Achouak, W. (2008). The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environ. Microbiol.* 10, 2150–2163. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01650.x.
- Sassi, M. B., Dollinger, J., Renault, P., Tlili, A., and Bérard, A. (2012). The FungiResp method: An application of the MicroRespTM method to assess fungi in microbial communities as soil biological indicators. *Ecol. Indic.* 23, 482–490. doi:10.1016/j.ecolind.2012.05.002.
- Sawaya, W. N., Khalil, J. K., and Safi, W. J. (1984). Nutritional quality of pearl millet flour and bread. *Plant Foods Hum. Nutr.* 34, 117–125. doi:10.1007/BF01094839.
- Schlesinger, W. H., and Andrews, J. A. (2000). Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* 48, 7–20. doi:10.1023/A:1006247623877.

- Sehgal, D., Rajaram, V., Armstead, I. P., Vadez, V., Yadav, Y. P., Hash, C. T., et al. (2012). Integration of gene-based markers in a pearl millet genetic map for identification of candidate genes underlying drought tolerance quantitative trait loci. *BMC Plant Biol.* 12, 9. doi:10.1186/1471-2229-12-9.
- Sehgal, D., Skot, L., and Singh, R. (2015). Exploring Potential of Pearl Millet Germplasm Association Panel for Association Mapping of Drought Tolerance Traits. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0122165.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., and Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.* 21, 1794–1805. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.
- Singh, B. K., Dawson, L. A., Macdonald, C. A., and Buckland, S. M. (2009). Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Appl. Soil Ecol.* 41, 239–248. doi:10.1016/j.apsoil.2008.10.003.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., and Deneff, K. (2004). A History of Research on the Link Between (Micro)Aggregates, Soil Biota, and Soil Organic Matter Dynamics (PDF Download Available). *Soil Tillage Res.* 79, 7–31. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008.
- Six, J., Elliott, E. T., and Paustian, K. (2000). Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2099–2103. doi:10.1016/S0038-0717(00)00179-6.
- Six, J., Frey, S. D., Thiet, R. K., and Batten, K. M. (2006). Bacterial and Fungal Contributions to Carbon Sequestration in Agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 555–569. doi:10.2136/sssaj2004.0347.
- Smith, C. J., and Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6–20. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
- Smith, S., and Read, D. (2008). “Mycorrhizal Symbiosis - 3rd Edition,” in (New York, USA), 800. Available at: <https://www.elsevier.com/books/mycorrhizal-symbiosis/smith/978-0-12-370526-6> [Accessed March 8, 2017].
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12115–12120. doi:10.1073/pnas.0605127103.
- Stich, B., Haussmann, B. I., Pasam, R., Bhosale, S., Hash, C. T., Melchinger, A. E., et al. (2010). Patterns of molecular and phenotypic diversity in pearl millet [*Pennisetum glaucum*(L.) R. Br.] from West and Central Africa and their relation to geographical and environmental parameters. *BMC Plant Biol.* 10, 216. doi:10.1186/1471-2229-10-216.

- Sultan, B., and Gaetani, M. (2016). Agriculture in West Africa in the Twenty-First Century: Climate Change and Impacts Scenarios, and Potential for Adaptation. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01262.
- Tabatabai, M. A., and Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301–307. doi:10.1016/0038-0717(69)90012-1.
- Tiekling, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G., and Vogel, R. F. (2003). In Situ Production of Exopolysaccharides during Sourdough Fermentation by Cereal and Intestinal Isolates of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 945–952. doi:10.1128/AEM.69.2.945-952.2003.
- Torsvik, V., Sørheim, R., and Goksøyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities—A review. *J. Ind. Microbiol.* 17, 170–178. doi:10.1007/BF01574690.
- Tostain, S. (1998). Le mil, une longue histoire: hypothèses sur sa domestication et ses migrations. Available at: http://horizon.documentation.ird.fr/exldoc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_03_04/010013294.pdf [Accessed December 15, 2016].
- Tostain, S., and Marchais, L. (1993). “Evaluation de la diversité génétique des mils (*Pennisetum glaucum* (L.)R. BR.) au moyen de marqueurs enzymatiques et relations entre formes sauvages et cultivées,” in *Le mil en Afrique : diversité génétique et agro-physiologique : potentialités et contraintes pour l’amélioration et la culture* Colloques et Séminaires., eds. S. Hamon and Réunion Thématique sur le Mil (*#Pennisetum glaucum* \$ L.), Montpellier (FRA), 1992/11/24-26 (Paris: ORSTOM), 33–56. Available at: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:38948> [Accessed December 15, 2016].
- Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., et al. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *Int. Soc. Microb. Ecol.* 7, 2248–2258. doi:10.1038/ismej.2013.119.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., et al. (2007). Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 250–258. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.014.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438.
- Vermeer, J., and McCully, M. E. (1982). The rhizosphere in *Zea*: new insight into its structure and development. *Planta* 156, 45–61. doi:10.1007/BF00393442.
- Vigouroux, Y., Barnaud, A., Scarcelli, N., and Thuillet, A.-C. (2011a). Biodiversity, evolution and adaptation of cultivated crops. *C. R. Biol.* 334, 450–457. doi:10.1016/j.crvi.2011.03.003.
- Vigouroux, Y., Mariac, C., De Mita, S., Pham, J.-L., Gérard, B., Kapran, I., et al. (2011b). Selection for Earlier Flowering Crop Associated with Climatic Variations in the Sahel. *PLoS ONE* 6, e19563. doi:10.1371/journal.pone.0019563.

- Weir, T. L., Park, S.-W., and Vivanco, J. M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 472–479. doi:10.1016/j.pbi.2004.05.007.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- White, P. J., George, T. S., Dupuy, L. X., Karley, A. J., Valentine, T. A., Wiesel, L., et al. (2013). Root traits for infertile soils. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00193.
- Wu, L., Chen, J., Wu, H., Wang, J., Wu, Y., Lin, S., et al. (2016). Effects of consecutive monoculture of *Pseudostellaria heterophylla* on soil fungal community as determined by pyrosequencing. *Sci. Rep.* 6, 26601. doi:10.1038/srep26601.
- Wu, Q.-S., Cao, M.-Q., Zou, Y.-N., and He, X. (2014). Direct and indirect effects of glomalin, mycorrhizal hyphae, and roots on aggregate stability in rhizosphere of trifoliolate orange. *Sci. Rep.* 4. doi:10.1038/srep05823.
- Wu, Q.-S., Srivastava, A. K., Cao, M.-Q., and Wang, J. (2015). Mycorrhizal function on soil aggregate stability in root zone and root-free hyphae zone of trifoliolate orange. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 813–825. doi:10.1080/03650340.2014.952226.
- Yao, H., and Wu, F. (2010). Soil microbial community structure in cucumber rhizosphere of different resistance cultivars to fusarium wilt. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 456–463. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00859.x.
- Yu, C., Hu, X., Deng, W., Li, Y., Han, G., and Ye, C. (2016). Soil fungal community comparison of different mulberry genotypes and the relationship with mulberry fruit sclerotiniosis. *Sci. Rep.* 6. doi:10.1038/srep28365.
- Zancarini, A., Mougel, C., Terrat, S., Salon, C., and Munier-Jolain, N. (2012). Combining ecophysiological and microbial ecological approaches to study the relationship between *Medicago truncatula* genotypes and their associated rhizosphere bacterial communities. *Plant Soil* 365, 183–199. doi:10.1007/s11104-012-1364-7.
- Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29, 111–129. doi:10.1007/s003740050533.
- Zolla, G., Badri, D. V., Bakker, M. G., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2013). Soil microbiomes vary in their ability to confer drought tolerance to *Arabidopsis*. *Appl. Soil Ecol.* 68, 1–9. doi:10.1016/j.apsoil.2013.03.007.

Annexe 1: Liste des 86 lignées mil du premier lot : collection de l'UMR DIADE de l'IRD

Name	Seed accession origin	Original country of origin (if known)	Supplementary information from seed supplier/pedigree	DNA name (Line ID)
1/2 souna 74-10-1 pied B	CIRAD, montpellier France			111
103 2 A	CIRAD, montpellier France	Senegal		106
203-11 C (coll souna)	CIRAD, montpellier France	Senegal		20
3/4 ex bornu 74-342-2 s3	CIRAD, montpellier France	Senegal		31
3/4 hk 74-245-1-4	CIRAD, montpellier France	Niger		87
3/4 souna 74-32-1-1 s3	CIRAD, montpellier France	Senegal		29
s4 hkpv 95-3	CIRAD, montpellier France			26
ms 23 d2 b	CIRAD, montpellier France			85
Zongo 4.1 B	CIRAD, montpellier France	Niger		115
Zongo 4-1	CIRAD, montpellier France	Niger		82
452-P1 1B	ICRISAT, Patancheru, India	Sadore, Niger	(ITMV 8001 x INMV 8220)	11
454-P1 2B	ICRISAT, Patancheru, India	Sadore, Niger	DM resistant re-selection from ICMB 89111 made at ISC, Sadore, Niger	90
458990 LCICMB1	ICRISAT, Patancheru, India			109
458992 LCICMB2	ICRISAT, Patancheru, India			5
458994 LCICMB3	ICRISAT, Patancheru, India			18
458998 LCICMB5	ICRISAT, Patancheru, India			77
459000 LCICMB6	ICRISAT, Patancheru, India			8
459002 LCICMB7	ICRISAT, Patancheru, India			120
459004 LCICMB8	ICRISAT, Patancheru, India			105
462-P1 17B	ICRISAT, Patancheru, India	Sadore, Niger	DM resistant re-selection from ICMB 90111 made at ISC, Sadore, Niger	112
464-P1 18B	ICRISAT, Patancheru, India	Sadore, Niger	(ITMV 8001 x INMV 8220)	62
470-P1 588B	ICRISAT, Patancheru, India	Sadore, Niger	Selection from 81BHT=F4 (81B x Tiotande)	47
472-P1 624B	ICRISAT, Patancheru, India	Sadore, Niger	F4 progeny derived from (81BHT x Sadore local)	44
476-P1 SDEBL 137	ICRISAT, Patancheru, India	Bulawayo, Zimbabwe	{{(SDPC 144)-2-2-1-2-2*842B}-P1	84
480-P1 SDEBL 95	ICRISAT, Patancheru, India	Bulawayo, Zimbabwe	{{(SDPC 144)-1-3-4-2-3*1163B}-P1	32
484-P1 SDEBL 132	ICRISAT, Patancheru, India	Bulawayo, Zimbabwe	{{(SDPC 144)-1-2-2-3-2-4*842B}-P1	97

488-P1 SDEBL 160	ICRISAT, Patancheru, India	Bulawayo, Zimbabwe	{{(SDPC 247)-3-2-1-1-2*88004B}-P1	74
494-P1 SDEBL 87	ICRISAT, Patancheru, India	Bulawayo, Zimbabwe	{{(SDPC 144)-3-2-2-1-3*88006B}-P1	114
81B (73)	ICRISAT, Patancheru, India		Induced downy mildew resistant selection from Tift 23D2B	102
81B-P6	ICRISAT, Patancheru, India		Downy mildew resistant selection (apparently an outcross) from induced mutant population of Tift 23D2B	93
863B	ICRISAT, Patancheru, India	Togo	Togo-13-4-1	22
ICMB 00444	ICRISAT, Patancheru, India		(SPF3/S91-544 x SPF3/S91-5)-5-1-2-1	98
ICMB 00555	ICRISAT, Patancheru, India		HHVBC S1-16-6-3-5-2-B	35
ICMB 00666	ICRISAT, Patancheru, India		[(ICMB 89111 x ICMB 88002) x {(81B x SRL 53-1) x 843B}-3+]-31	76
ICMB 00777	ICRISAT, Patancheru, India		{IPC 1598 x (843B x DSA 105B)}-51-3-B-B	12
ICMB 00888	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x ICTP 8202-161-5)-20-3-B-B-3	70
ICMB 00999	ICRISAT, Patancheru, India		(ICMB 89111 x 863B)-65-8-B-B	61
ICMB 01222	ICRISAT, Patancheru, India		HHV S1-24-3-B-3-2-1	64
ICMB 01444	ICRISAT, Patancheru, India		[(843B x (B 816 x 3/4 EB-105-6-1)-3-3)-15-B-4-1]-12-2-4-1	71
ICMB 89111-P2	ICRISAT, Patancheru, India		DM resistant selection from original ICMB 89111 = {843B x (GNS x SS-48-40-4)-1-9-8}-30-B-B-1	14
ICMB 91222	ICRISAT, Patancheru, India		(26B x 81B)-4-1-2	45
ICMB 91444	ICRISAT, Patancheru, India		{843B x (Boudama-481 x Ankoutess-2)-4}-2-B	43
ICMB 91777	ICRISAT, Patancheru, India		{843B x (J 1623 x 3/4 EB-96-1-10)}-5-2	28
ICMB 92111	ICRISAT, Patancheru, India		(81B x 843B)-11-1-1-B	99
ICMB 92333	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x 81B)-30-1-1	60
ICMB 92444	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x ICMP5 1500-7-4-1-6)-23-1-B-1-4	88
ICMB 92666	ICRISAT, Patancheru, India		{ICMPES 34 x (843B x ICMPES 34)}-155-4-2	117
ICMB 92777	ICRISAT, Patancheru, India		{843B x (ICMP5 500-4-4-3 x ICMP5 1800-3-1-2-C3-4)}-7-1-3	37
ICMB 92888	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x ICMP5 900-9-3-2-2)-41-2-6-2-2	6
ICMB 93111	ICRISAT, Patancheru, India		{(81B x SRL 53-1) x 843B}-30-1-1	58
ICMB 93222	ICRISAT, Patancheru, India		(26B x 834B)-11-2-B-B	7
ICMB 93333	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x ICMP5 900-9-3-8-2)-21-8-4	53
ICMB 94222	ICRISAT, Patancheru, India		[{(843B x (843B x 700651)}-11-1-2-B x 81-1164B} x (ICMB 89111 x ICMB 88004)]-3-3	67
ICMB 94444	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x Pb 405B)-4-B	38

ICMB 95111	ICRISAT, Patancheru, India		[{843B x (GNS x SS-48-40-4)-1-9-8}-30-B-B-1 x {843B x (843B x 700651)-11-1-2-B}]-39-B	48
ICMB 95222	ICRISAT, Patancheru, India		[{843B x (GNS x SS-48-40-4)-29-7-4-B} x (843B x ICMPE5 29)-23-2-3]-16-B	73
ICMB 95444	ICRISAT, Patancheru, India		(81-1164DB/85-1856LR-16-B x 843DMR1)-14-6-3	110
ICMB 95555	ICRISAT, Patancheru, India		DMR1 S2-96-2-3-4	107
ICMB 96222	ICRISAT, Patancheru, India		[{26B x (81B x SRL 50-1)}-1-1-2 x 852B]-69-1-1	96
ICMB 97111	ICRISAT, Patancheru, India		HTBC-48-B-1-1-1-1	108
ICMB 97222	ICRISAT, Patancheru, India		{(ICMB 88006 x ICMB 88005) x (ICMB 89111 x ICMB 88004)}-28-2-B	100
ICMB 97444	ICRISAT, Patancheru, India		DMR1 S2-133-1-2-4-B	92
ICMB 97555	ICRISAT, Patancheru, India		(SPF3/S91-5 x ARD early non adhérent)-2-3-2	41
ICMB 98111	ICRISAT, Patancheru, India		HTBC HS-27-1-1-1	124
ICMB 98222	ICRISAT, Patancheru, India		ARD-288-1-10-1-2(RM)-5	57
ICMB 98333	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x ICTP 8202-161-5)-19-2-1-B-B-2	118
ICMB 98666	ICRISAT, Patancheru, India		-	55
ICMB 98777	ICRISAT, Patancheru, India		{(F4FC 1498-1-1-3 x J 104)-11-2-1-1}-7-3-1-B	1
ICMB 99111	ICRISAT, Patancheru, India		(843B x ICTP 8202-161-5)-17-1-2-B-1	104
ICMB 99333	ICRISAT, Patancheru, India		{(84-3869/85-4414)-8-B x 843DMR1}-1-3-2-B	119
ICMB 99444	ICRISAT, Patancheru, India		(SPF3/S91-327 x SPF3/S91-5)-6-2-2	83
ICMB 99555	ICRISAT, Patancheru, India		(BSECBPT/91-38 x SPF3/S91-529)-10-1-7	25
ICMP 451-P6	ICRISAT, Patancheru, India		DM resistant selection from elite pollinator line ICMP 451 = IPC 0107= LCSN 72-1-2-1-1	89
ICMP 451-P8	ICRISAT, Patancheru, India		DM resistant selection from elite pollinator line ICMP 451 = IPC 0107= LCSN 72-1-2-1-1	121
ICMP 85410-P7	ICRISAT, Patancheru, India		d2 dwarf, DM resistant restorer line of A1 CMS system; IPC 0736 = [(SC14(M) x (SD2 x EB 2 (D 1088-2))]-64	10
P 310-17	ICRISAT, Patancheru, India		Stable source of DM resistance selected from IP 6329 from Mali	46
P 7-3	ICRISAT, Patancheru, India	Cameroun	Stable source of DM resistance; selection from ICML 12 that was selected from IP 6118 from Cameroon	95
W 504-1-P1	ICRISAT, Patancheru, India		DM susceptible, genetically tall, breeding line from Indian Agricultural Research Institute, New Delhi	75
M 194.80	University of Orsay, Paris, France		Massue	56
M 32.97	University of Orsay, Paris, France			94
9(B)				9
39AF				39

50(A)	50
113AF	113
2006 B	33
125 AF WRAC	125

Pour chaque lignée de mil, le nom, l'origine de l'accession, le pays d'origine (si connu) et le code sont donnés dans ce tableau.

Annexe 2: Liste des 181 lignées de mil du second lot : collection de l'ICRISAT

ENTREE	DESIGNATION	CROSS	SOURCE	IDENTIFICATION
15001	ICML-IS 11001	IBL 001-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 16, P-1Ø	L1
15002	ICML-IS 11001	IBL 001-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 54, P-1Ø	L2
15003	ICML-IS 11002	IBL 002-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 20, P-1Ø	L3
15006	ICML-IS 11003	IBL 003-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 21, P-1Ø	L6
15007	ICML-IS 11004	IBL 004-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 56, P-1Ø	L7
15008	ICML-IS 11004	IBL 004-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 22, P-1Ø	L8
15010	ICML-IS 11005	IBL 005-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 57, P-1Ø	L10
15011	ICML-IS 11006	IBL 006-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 20, P-1Ø	L11
15014	ICML-IS 11007	IBL 007-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 25, P-1Ø	L14
15018	ICML-IS 11010	IBL 010-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 24, P-1Ø	L18
15021	ICML-IS 11011	IBL 011-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 63, P-1Ø	L21
15022	ICML-IS 11012	IBL 012-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 26, P-1Ø	L22
15023	ICML-IS 11012	IBL 012-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 64, P-1Ø	L23
15024	ICML-IS 11013	IBL 013-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 27, P-1Ø	L24
15029	ICML-IS 11021	IBL 021-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 68, P-1Ø	L29
15033	ICML-IS 11024	IBL 024-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 70, P-1Ø	L33
15037	ICML-IS 11026	IBL 026-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 34, P-1Ø	L37
15038	ICML-IS 11026	IBL 026-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 72, P-1Ø	L38
15039	ICML-IS 11028	IBL 028-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 38, P-1Ø	L39
15040	ICML-IS 11029	IBL 029-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 37, P-1Ø	L40
15042	ICML-IS 11030	IBL 030-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 38, P-1Ø	L42
15046	ICML-IS 11033	IBL 033-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 41, P-1Ø	L46
15052	ICML-IS 11036	IBL 036-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 44, P-1Ø	L52
15055	ICML-IS 11039	IBL 039-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 46, P-1Ø	L55
15056	ICML-IS 11039	IBL 039-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 08, P-1Ø	L56
15058	ICML-IS 11040	IBL 040-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 09, P-1Ø	L58
15059	ICML-IS 11041	IBL 041-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 48, P-1Ø	L59
15061	ICML-IS 11043	IBL 043-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 50, P-1Ø	L61
15062	ICML-IS 11043	IBL 043-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 12, P-1Ø	L62
15063	ICML-IS 11044	IBL 044-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 51, P-1Ø	L63
15064	ICML-IS 11044	IBL 044-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 13, P-1Ø	L64
15065	ICML-IS 11045	IBL 045-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 52, P-1Ø	L65
15066	ICML-IS 11045	IBL 045-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 53, P-1Ø	L66
15069	ICML-IS 11047	IBL 047-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 54, P-1Ø	L69
15070	ICML-IS 11047	IBL 047-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 16, P-1Ø	L70
15071	ICML-IS 11048	IBL 048-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 55, P-1Ø	L71
15073	ICML-IS 11049	IBL 049-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 56, P-1Ø	L73
15074	ICML-IS 11049	IBL 049-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 18, P-1Ø	L74
15075	ICML-IS 11050	IBL 050-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 57, P-1Ø	L75
15078	ICML-IS 11051	IBL 051-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 20, P-1Ø	L78

15081	ICML-IS 11053	IBL 053-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 22, P-1Ø	L81
15082	ICML-IS 11053	IBL 053-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 60, P-1Ø	L82
15083	ICML-IS 11053	IBL 053-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 53, P-1Ø	L83
15084	ICML-IS 11054	IBL 054-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 61, P-1Ø	L84
15086	ICML-IS 11055	IBL 055-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 62, P-1Ø	L86
15087	ICML-IS 11055	IBL 055-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 24, P-1Ø	L87
15088	ICML-IS 11056	IBL 056-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 63, P-1Ø	L88
15091	ICML-IS 11057	IBL 057-6-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 26, P-1Ø	L91
15092	ICML-IS 11058	IBL 058-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 65, P-1Ø	L92
15095	ICML-IS 11061	IBL 061-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 68, P-1Ø	L95
15097	ICML-IS 11062	IBL 062-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 69, P-1Ø	L97
15098	ICML-IS 11062	IBL 062-6-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 31, P-1Ø	L98
15099	ICML-IS 11064	IBL 064-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 71, P-1Ø	L99
15100	ICML-IS 11064	IBL 064-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 33, P-1Ø	L100
15101	ICML-IS 11065	IBL 065-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 71, P-1Ø	L101
15102	ICML-IS 11066	IBL 066-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 73, P-1Ø	L102
15105	ICML-IS 11067	IBL 067-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 73, P-1Ø	L105
15106	ICML-IS 11068	IBL 068-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 04, Row 75, P-1Ø	L106
15109	ICML-IS 11069	IBL 069-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 38, P-1Ø	L109
15110	ICML-IS 11070	IBL 070-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 01, P-1Ø	L110
15111	ICML-IS 11070	IBL 070-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 39, P-1Ø	L111
15112	ICML-IS 11071	IBL 071-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 02, P-1Ø	L112
15115	ICML-IS 11072	IBL 072-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 41, P-1Ø	L115
15116	ICML-IS 11073	IBL 073-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 04, P-1Ø	L116
15117	ICML-IS 11073	IBL 073-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 03, P-1Ø	L117
15118	ICML-IS 11074	IBL 074-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 43, P-1Ø	L118
15119	ICML-IS 11074	IBL 074-2-2	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 43, P-2Ø	L119
15120	ICML-IS 11075	IBL 075-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 06, P-1Ø	L120
15121	ICML-IS 11075	IBL 075-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 44, P-1Ø	L121
15122	ICML-IS 11076	IBL 076-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 45, P-1Ø	L122
15123	ICML-IS 11077	IBL 077-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 08, P-1Ø	L123
15124	ICML-IS 11077	IBL 077-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 46, P-1Ø	L124
15126	ICML-IS 11079	IBL 079-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 07, P-1Ø	L126
15127	ICML-IS 11081	IBL 081-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 11, P-1Ø	L127
15128	ICML-IS 11081	IBL 081-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 49, P-1Ø	L128
15129	ICML-IS 11082	IBL 082-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 50, P-1Ø	L129
15130	ICML-IS 11082	IBL 082-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 09, P-1Ø	L130
15131	ICML-IS 11083	IBL 083-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 10, P-1Ø	L131
15132	ICML-IS 11084	IBL 084-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 14, P-1Ø	L132
15136	ICML-IS 11090	IBL 090-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 16, P-1Ø	L136
15137	ICML-IS 11090	IBL 090-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 54, P-1Ø	L137
15138	ICML-IS 11090	IBL 091-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 17, P-1Ø	L138
15139	ICML-IS 11091	IBL 091-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 55, P-1Ø	L139

15140	ICML-IS 11092	IBL 092-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 18, P-1Ø	L140
15141	ICML-IS 11092	IBL 092-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 56, P-1Ø	L141
15144	ICML-IS 11094	IBL 094-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 20, P-1Ø	L144
15145	ICML-IS 11094	IBL 094-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 58, P-1Ø	L145
15146	ICML-IS 11095	IBL 095-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 21, P-1Ø	L146
15147	ICML-IS 11095	IBL 095-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 59, P-1Ø	L147
15149	ICML-IS 11096	IBL 096-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 60, P-1Ø	L149
15150	ICML-IS 11097	IBL 097-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 23, P-1Ø	L150
15151	ICML-IS 11097	IBL 097-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 61, P-1Ø	L151
15152	ICML-IS 11098	IBL 098-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 24, P-1Ø	L152
15153	ICML-IS 11098	IBL 098-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 62, P-1Ø	L153
15155	ICML-IS 11099	IBL 099-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 63, P-1Ø	L155
15156	ICML-IS 11100	IBL 100-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 64, P-1Ø	L156
15157	ICML-IS 11100	IBL 100-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 23, P-1Ø	L157
15158	ICML-IS 11101	IBL 101-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 27, P-1Ø	L158
15159	ICML-IS 11101	IBL 101-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 65, P-1Ø	L159
15160	ICML-IS 11102	IBL 102-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 66, P-1Ø	L160
15161	ICML-IS 11102	IBL 102-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 25, P-1Ø	L161
15162	ICML-IS 11103	IBL 103-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 29, P-1Ø	L162
15163	ICML-IS 11103	IBL 103-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 67, P-1Ø	L163
15164	ICML-IS 11104	IBL 104-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 30, P-1Ø	L164
15165	ICML-IS 11104	IBL 104-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 68, P-1Ø	L165
15166	ICML-IS 11105	IBL 105-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 31, P-1Ø	L166
15167	ICML-IS 11105	IBL 105-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 28, P-1Ø	L167
15169	ICML-IS 11106	IBL 106-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 29, P-1Ø	L169
15170	ICML-IS 11107	IBL 107-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 71, P-1Ø	L170
15171	ICML-IS 11107	IBL 107-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 30, P-1Ø	L171
15172	ICML-IS 11108	IBL 108-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 34, P-1Ø	L172
15177	ICML-IS 11110	IBL 110-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 32, P-1Ø	L177
15181	ICML-IS 11112	IBL 112-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 07, Row 76, P-1Ø	L181
15182	ICML-IS 11114	IBL 114-6-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 39, P-1Ø	L182
15186	ICML-IS 11116	IBL 116-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 41, P-1Ø	L186
15187	ICML-IS 11116	IBL 116-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 03, P-1Ø	L187
15188	ICML-IS 11117	IBL 117-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 04, P-1Ø	L188
15191	ICML-IS 11119	IBL 119-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 38, P-1Ø	L191
15192	ICML-IS 11120	IBL 120-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 44, P-1Ø	L192
15193	ICML-IS 11120	IBL 120-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 06, P-1Ø	L193
15194	ICML-IS 11121	IBL 121-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 45, P-1Ø	L194
15195	ICML-IS 11121	IBL 121-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 40, P-1Ø	L195
15205	ICML-IS 11128	IBL 128-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 13, P-1Ø	L205
15206	ICML-IS 11130	IBL 130-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 47, P-1Ø	L206
15208	ICML-IS 11131	IBL 131-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 48, P-1Ø	L208
15209	ICML-IS 11133	IBL 133-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 55, P-1Ø	L209

15211	ICML-IS 11134	IBL 134-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 56, P-1Ø	L211
15213	ICML-IS 11135	IBL 135-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 51, P-1Ø	L213
15214	ICML-IS 11136	IBL 136-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 58, P-1Ø	L214
15215	ICML-IS 11136	IBL 136-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 20, P-1Ø	L215
15216	ICML-IS 11137	IBL 137-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 21, P-1Ø	L216
15220	ICML-IS 11139	IBL 139-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 23, P-1Ø	L220
15222	ICML-IS 11140	IBL 140-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 62, P-1Ø	L222
15226	ICML-IS 11143	IBL 143-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 27, P-1Ø	L226
15233	ICML-IS 11147	IBL 147-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 69, P-1Ø	L233
15239	ICML-IS 11150	IBL 150-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 72, P-1Ø	L239
15240	ICML-IS 11150	IBL 150-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 10, Row 66, P-1Ø	L240
15242	ICML-IS 11151	IBL 151-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 35, P-1Ø	L242
15246	ICML-IS 11153	IBL 153-6-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 37, P-1Ø	L246
15247	ICML-IS 11154	IBL 154-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 05, Row 76, P-1Ø	L247
15249	ICML-IS 11155	IBL 155-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 01, P-1Ø	L249
15250	ICML-IS 11155	IBL 155-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 39, P-1Ø	L250
15253	ICML-IS 11158	IBL 158-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 04, P-1Ø	L253
15254	ICML-IS 11158	IBL 158-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 42, P-1Ø	L254
15255	ICML-IS 11159	IBL 159-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 05, P-1Ø	L255
15257	ICML-IS 11160	IBL 160-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 06, P-1Ø	L257
15258	ICML-IS 11160	IBL 160-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 44, P-1Ø	L258
15259	ICML-IS 11161	IBL 161-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 07, P-1Ø	L259
15260	ICML-IS 11161	IBL 161-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 45, P-1Ø	L260
15261	ICML-IS 11163	IBL 163-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 08, P-1Ø	L261
15262	ICML-IS 11163	IBL 163-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 11, Row 01, P-1Ø	L262
15263	ICML-IS 11165	IBL 165-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 09, P-1Ø	L263
15267	ICML-IS 11168	IBL 168-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 11, P-1Ø	L267
15268	ICML-IS 11168	IBL 168-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 49, P-1Ø	L268
15272	ICML-IS 11170	IBL 170-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 11, Row 05, P-1Ø	L272
15274	ICML-IS 11171	IBL 171-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 52, P-1Ø	L274
15278	ICML-IS 11173	IBL 173-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 54, P-1Ø	L278
15295	ICML-IS 11184	IBL 184-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 26, P-1Ø	L295
15309	ICML-IS 11192	IBL 192-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 33, P-1Ø	L309
15310	ICML-IS 11192	IBL 192-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 71, P-1Ø	L310
15313	ICML-IS 11194	IBL 194-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 35, P-1Ø	L313
15316	ICML-IS 11197	IBL 197-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 08, Row 75, P-1Ø	L316
15319	ICML-IS 11199	IBL 199-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 39, P-1Ø	L319
15320	ICML-IS 11199	IBL 199-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 01, P-1Ø	L320
15321	ICML-IS 11199	IBL 199-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 11, Row 29, P-1Ø	L321
15325	ICML-IS 11201	IBL 201-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 03, P-1Ø	L325
15328	ICML-IS 11204	IBL 204-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 43, P-1Ø	L328
15329	ICML-IS 11205	IBL 205-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 44, P-1Ø	L329
15330	ICML-IS 11205	IBL 205-5-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 06, P-1Ø	L330

15331	ICML-IS 11206	IBL 206-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 45, P-1Ø	L331
15332	ICML-IS 11206	IBL 206-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 07, P-1Ø	L332
15334	ICML-IS 11215	IBL 215-2-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 47, P-1Ø	L334
15335	ICML-IS 11215	IBL 215-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 09, P-1Ø	L335
15336A	SL 1	SL 1-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 48, P-1Ø	L336
15337	SL 2	SL 2-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 11, P-1Ø	L337
15338	SL 2	SL 2-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 11, Row 36, P-1Ø	L338
15339	SL 3	SL 3-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 50, P-1Ø	L339
15341	SL 4	SL 4-3-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 13, P-1Ø	L341
15342	SL 4	SL 4-B-1	CS 2012-2013 4E: Band 11, Row 38, P-1Ø	L342
15343	SL 5	SL 5-1-1	CS 2012-2013 4E: Band 06, Row 52, P-1Ø	L343
15344	SL 5	SL 5-4-1	CS 2012-2013 4E: Band 09, Row 14, P-1Ø	L344

Annexe 3: Corrélation entre le ratio MSA/BR et les paramètres de croissance des lignées de mil cultivées en pot.

Matrice de corrélation de Pearson entre le ratio MSA/BR, la MSA et les paramètres de croissance des lignées de mil lors du phénotypage des 181 lignées de mil. Les corrélations significatives au seuil de 5% sont indiquées en gras. BA : biomasse aérienne, BR : Biomasse racinaire, MSA : Masse de sol adhérent aux racines et H27 : hauteur des plantes au 27^{em} jour.

Variables	BA	MSA	BR	MSA/BR	H27
BA	1	0.608	0.638	-0.171	0.335
MSA	0.608	1	0.792	0.141	0.002
BR	0.638	0.792	1	-0.294	0.054
MSA/BR	-0.171	0.141	-0.294	1	-0.130
H27	0.335	0.002	0.054	-0.130	1

P-Values :

Variables	BA	MSA	BR	MSA/BR	H27
BA	0	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MSA	< 0,0001	0	< 0,0001	< 0,0001	0.95418051
BR	< 0,0001	< 0,0001	0	< 0,0001	0.04377057
MSA/BR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0	< 0,0001
H27	< 0,0001	0.95418051	0.04377057	< 0,0001	0

Annexe 4: Corrélation entre le ratio MSA/BR et les paramètres agronomiques des lignées de mil cultivées au champ

Matrice de corrélation de Spearman entre ratio MSA/BR et paramètres agronomiques des lignées. Les corrélations significatives au seuil de 5% sont marquées en gras.

Variables	Masse graine	Masse paille	masse épis	biomasse aérienne	MSA/BR
Masse graine	1	0.467	0.903	0.830	0.018
Masse paille	0.467	1	0.491	0.855	-0.164
masse épis	0.903	0.491	1	0.842	-0.055
biomasse aérienne	0.830	0.855	0.842	1	-0.188
MSA/BR	0.018	-0.164	-0.055	-0.188	1

P-values :

Variables	Masse graine	Masse paille	masse épis	biomasse aeriennne	MSA/BR
Masse graine	0	0.172	0.001	0.005	0.959
Masse paille	0.172	0	0.149	0.003	0.657
masse épis	0.001	0.149	0	0.004	0.892
biomasse aeriennne	0.005	0.003	0.004	0	0.608
MSA/BR	0.959	0.657	0.892	0.608	0

Annexe 5 : Valorisation de la thèse

✚ Article publié dans une revue internationale

Annexe 5.1: Ndour PMS, Gueye M, Barakat M, Ortet P, Bertrand-Huleux M, Pablo A-L, Dezette D, Chapuis-Lardy L, Assigbetsé K, Kane NA, Vigouroux Y, Achouak W, Ndoye I, Heulin T and Cournac L (2017) *Pearl Millet Genetic Traits Shape Rhizobacterial Diversity and Modulate Rhizosphere Aggregation*. *Frontiers in Plant Science*. 8:1288. doi: 10.3389/fpls.2017.01288.

✚ Article en préparation

Ndour PMS, Gueye M, Barakat M, Ortet P, Tine D, Barry CM, Kane NA, Vigouroux Y, Achouak W, Ndoye I, Heulin T and Cournac L. *Microbial diversity and activity in rhizosphere of different pearl millet lines grown at field condition*.

✚ Communications orale et affichées

Annexe 5.2 : Diversité et activités microbiennes rhizosphériques de différentes lignées de mil cultivées au champ. Poster présenté à la *Conférence internationale Intensification Durable : Biodiversité et ingénierie écologique pour une intensification durable de l'agriculture* tenue du 24 au 26 avril 2017 à l'hôtel Ngor Diarama, Dakar, Sénégal.

Annexe 5.3 : Effet de la diversité intra spécifique du mil sur l'agrégation et les caractéristiques microbiennes du sol rhizosphérique. Communication orale présentée au Colloque international *Biodiversité et processus écologiques au service d'une agriculture durable en Afrique de l'Ouest* 10 et 11 Mai 2016, à l'hôtel des Almadies, Dakar, Sénégal.

Annexe 5.4 : Effet de la variabilité génétique du mil sur l'agrégation du sol rhizosphérique et sur la diversité, la densité et l'activité des rhizo-bactéries. Poster présenté aux *Doctoriales de l'école doctorale SEV en Novembre 2015 et à l'Atelier de formation SENE BIO du 16 au 20 Novembre 2015 au campus de Bel Air, Dakar*.

Annexe 5.1



ORIGINAL RESEARCH
published: 27 July 2017
doi: 10.3389/fpls.2017.01288



Pearl Millet Genetic Traits Shape Rhizobacterial Diversity and Modulate Rhizosphere Aggregation

Papa M. S. Ndour^{1,2}, Mariama Gueye¹, Mohamed Barakat³, Philippe Ortet³, Marie Bertrand-Huleux³, Anne-Laure Pablo⁴, Damien Dezette⁴, Lydie Chapuis-Lardy⁴, Komi Assigbetsé¹, Ndjido Ardo Kane⁵, Yves Vigouroux⁶, Wafa Achouak³, Ibrahima Ndoye², Thierry Heulin^{3†} and Laurent Courmac^{1*†}

¹IRD, UMR Eco&Sols, IMI ESOL, Centre de recherche ISRA-IRD, Dakar, Sénégal, ²Département de Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, ³Aix Marseille Université, CEA, CNRS, UMR7265, LEMRE, Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et Environnement extrêmes, ECCOREV FR3098, F-13108 St Paul Les Durance, France, ⁴Eco&Sols, Cirad, INRA, IRD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Montpellier, France, ⁵Laboratoire National de Recherches sur les Productions Végétales, Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Centre de Recherche de Bel Air, Dakar, Senegal, ⁶IRD UMR DIWDE, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Davide Bulgarelli,
University of Dundee, United Kingdom

Reviewed by:
Tim George,
James Hutton Institute,
United Kingdom
Matthew Agler,
Max Planck Institute for Plant
Breeding Research (MPG), Germany

***Correspondence:**
Laurent Courmac
laurent.courmac@ird.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:
This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 10 May 2017
Accepted: 07 July 2017
Published: 27 July 2017

Citation:
Ndour PMS, Gueye M, Barakat M,
Ortet P, Bertrand-Huleux M,
Pablo A-L, Dezette D,
Chapuis-Lardy L, Assigbetsé K,
Kane NA, Vigouroux Y, Achouak W,
Ndoye I, Heulin T and Courmac L
(2017) Pearl Millet Genetic Traits
Shape Rhizobacterial Diversity and
Modulate Rhizosphere Aggregation.
Front. Plant Sci. 8:1288.
doi: 10.3389/fpls.2017.01288

Root exudation contributes to soil carbon allocation and also to microbial C and energy supply, which subsequently impacts soil aggregation around roots. Biologically-driven soil structural formation is an important driver of soil fertility. Plant genetic determinants of exudation and more generally of factors promoting rhizosphere soil aggregation are largely unknown. Here, we characterized rhizosphere aggregation in a panel of 86 pearl millet inbred lines using a ratio of root-adhering soil dry mass per root tissue dry mass (RAS/RT). This ratio showed significant variations between lines, with a roughly 2-fold amplitude between lowest and highest average values. For 9 lines with contrasting aggregation properties, we then compared the bacterial diversity and composition in root-adhering soil. Bacterial α -diversity metrics increased with the “RAS/RT ratio.” Regarding taxonomic composition, the *Rhizobiales* were stimulated in lines showing high aggregation level whereas *Bacillales* were more abundant in lines with low ratio. 184 strains of cultivable exopolysaccharides-producing bacteria have been isolated from the rhizosphere of some lines, including members from *Rhizobiales* and *Bacillales*. However, at this stage, we could not find a correlation between abundance of EPS-producing species in bacterial communities and the ratio RAS/RT. These results illustrated the impact of cereals genetic trait variation on soil physical properties and microbial diversity. This opens the possibility of considering plant breeding to help management of soil carbon content and physical characteristics through carbon rhizodeposition in soil.

Keywords: pearl millet, rhizosphere, soil aggregation, 16S rDNA sequencing, metabarcoding, EPS producing bacteria, rhizosheath

INTRODUCTION

The last decades in Sahelian regions led to shorter rainy seasons. As a response, farmers in Niger have selected for short-cycle millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br] varieties (Vigouroux et al., 2011a). This adaptation has been based on the available genetic diversity of the species, including the genetic variability for the duration of its growth cycle (Vigouroux et al., 2011b). If above ground phenotypic diversity has been consequently largely documented, phenotypic diversity

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

1

July 2017 | Volume 8 | Article 1288

Annexe 5.2





UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT

Diversité et activités microbiennes rhizosphériques de différentes lignées de mil cultivées au champ

Papa Mamadou Sitor NDOUR^{(1) (2)}, Diamé TINE^{(1) (2)}, Cheikh Mbacké BARRY^{(1) (2)}, Mariama GUEYE⁽¹⁾, Mohamet BARAKAT⁽³⁾, Thierry HEULIN⁽³⁾, Ibrahim NDOYE⁽²⁾, Laurent COURNAC⁽¹⁾
 (1) LMI Intensification Ecologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest (IESOL),
 (2) Département de Biologie végétale / Faculté des Sciences et Techniques / Université Cheikh Anta Diop de Dakar
 (3) Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère CEA de Cadarache, Saint Paul lez-Durance France
 Contacts auteur : sitorndour@yahoo.fr/ Tél: (+221) 77 532 74 74

Contexte:

Les communautés microbiennes rhizosphériques participent activement à la fertilité des sols en recyclant la matière organique et en assurant la biodisponibilité des nutriments. Nous avons démontré dans une précédente étude un effet lignée sur la diversité de ces communautés microbiennes chez le mil, indiquant que les caractéristiques génétiques de la plante peuvent influencer sur la composition de ces communautés du sol. Si de telles variations pouvaient être mises à profit pour orienter favorablement les activités microbiennes associées dans des conditions réelles de culture, la sélection de variétés contribuant à améliorer les propriétés biologiques des sols pourrait participer à une stratégie d'intensification durable de la production agricole.

L'objectif de cette étude est de **tester au champ l'effet lignée** d'accessions de mil précédemment sélectionnées en serre comme présentant différents niveaux d'agrégation rhizosphérique sur:

- la **diversité** des microorganismes rhizosphériques et
- les **activités** microbiennes impliquées dans le cycle des nutriments essentiels au développement des plantes.

Méthodologie:

Echantillonnage de sols




- 77 jours après semis
- 4 échantillons par lignée
- A 10 cm des poquets
- Profondeur de 0-20 cm
- 4 échantillons témoins à l'extérieur de la parcelle

Analyses effectuées

Diversité microbienne

- Séquençage (NGS) 16S
- Séquençage (NGS) ITS
- QIIME (analyse des données)

Activité respiratoire

- (micro-CPG)

Dosage des Glomalines

- Colorimétrie (Réactif de Bradford)

Activités enzymatiques

- Béta-Glucosidase
- Phosphatases acide et alcaline
- Chitinase
- Uréase
- FDA
- Déshydrogénase

Résultats:

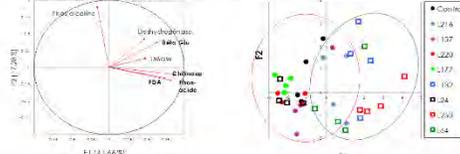
Alpha-Diversité Fongique

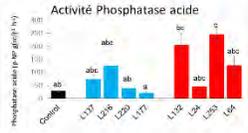
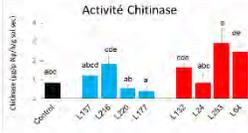
Line	Chao1	OTUs	Shannon
Control	3548.83 ^{ab}	1553.18 ^{abc}	7.078 ^a
L137	4327.92 ^a	1896.03 ^a	7.533 ^a
L216	3932.04 ^{ab}	1629.70 ^{bc}	6.728 ^a
L220	4359.42 ^a	1833.25 ^a	7.544 ^a
L177	3443.66 ^{ab}	1523.45 ^{abc}	6.769 ^a
L132	3976.00 ^{ab}	1689.88 ^{abc}	7.002 ^a
L24	2346.83 ^b	1063.08 ^c	5.448 ^b
L253	3181.10 ^{abc}	1410.85 ^{bc}	6.302 ^a
LE4	2428.58 ^b	1128.82 ^{cd}	6.184 ^b

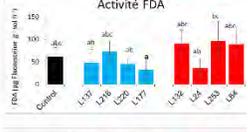
Alpha-Diversité Bactérienne

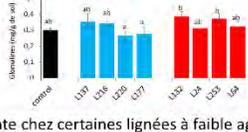
Line	Shannon	PD_whole	chao1	OTU
Control	11.0 ^a	526.0 ^b	19500.2 ^a	7727.0 ^b
L137	10.7 ^{ab}	514.0 ^b	20835.2 ^a	7382.2 ^b
L216	10.6 ^{ab}	494.5 ^{bc}	19654.1 ^a	7163.3 ^{bc}
L220	10.6 ^{ab}	485.1 ^{bc}	19288.9 ^a	7118.5 ^{bc}
L177	10.5 ^{ab}	482.9 ^{bc}	17490.4 ^a	6955.0 ^{bc}
L132	10.6 ^{ab}	490.2 ^{bc}	19772.0 ^a	7131.4 ^{bc}
L24	10.8 ^a	493.1 ^{bc}	18195.4 ^a	7248.1 ^{bc}
L253	10.8 ^{ab}	476.9 ^{bc}	18630.4 ^a	6879.0 ^{bc}
LE4	10.8 ^{ab}	476.1 ^{bc}	16849.7 ^a	7014.7 ^{bc}

ACP sur les activités enzymatiques







- La diversité fongique est plus importante chez certaines lignées à faible agrégation
- La diversité bactérienne ne présente aucune variabilité significative
- Les activités Phosphatase acide, Chitinase, Béta-glucosidase et FDA sont plus importantes chez certaines lignées à forte agrégation
- La quantité de Glomalines est plus importante chez certaines lignées à forte agrégation rhizosphérique et est positivement corrélée à l'activité chitinase.

Au champ, les interactions plante-champignons jouent un rôle majeur dans la variabilité des activités biologiques en lien avec le processus d'agrégation du sol rhizosphérique des lignées sélectionnées.




Annexe 5.3






**Effet de la diversité intra spécifique du mil sur
l'agrégation et les caractéristiques microbiennes du sol
rhizosphérique**

Papa Mamadou Sitor NDOUR

Doctorant UCAD /LMI-IESOL

Encadrants:	Pr Ibrahima Dr Laurent	NDOYE COURNAC	UCAD IRD	Co-directeur Co-directeur
-------------	---------------------------	------------------	-------------	------------------------------





Colloque: Biodiversité et processus écologiques au service d'une agriculture durable en Afrique de l'Ouest 10 et 11 Mai 2015, Dakar

Annexe 5.4



UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT (ED-SEV)



Effets de la variabilité génétique du mil (*Pennisetum glaucum* L.R.Br.) sur la diversité et l'activité des micro-organismes du sol rhizosphérique : conséquences agronomiques et physiologiques.

UER 301 :
Biotechnologies végétales, microbiennes et Amélioration des Plantes

Papa Mamadou Sitor NDOUR E-mail: sitndour@yahoo.fr
Directeurs de thèse: Pr Ibrahim NDOYE Département de biologie végétale Faculté des Sciences et Techniques: ibrahima.ndoye@ird.fr Tel: 33 849 33 26
Dr Laurent COURNAC Directeur de recherche IRD, Laboratoire Mixte International IESOL / IRD de Bel Air, E-mail: laurent.cournac@ird.fr

LMI:
Intensification écologique des sols cultivés en Afrique de l'Ouest

INTRODUCTION :
L'agrégation est un facteur clé pour la fertilité physique du sol qui impacte la dynamique de la matière organique (MO). Elle est en retour fortement influencée par cette MO à laquelle les plantes contribuent par les litières et par l'exsudation racinaire qui peut représenter jusqu'à 15% des photosynthétats des plantes. Ce carbone issu de l'exsudation est en partie utilisé par certains microorganismes rhizosphériques (bactéries en particulier) qui les transforment en exopolysaccharides (EPS) favorisant ainsi l'agrégation du sol autour des racines. Cette agrégation permet une amélioration de la nutrition hydrominérale des plantes. Cependant chez les céréales, la variabilité génétique intra-spécifique de l'exsudation est mal appréhendée.

Cette étude vise ainsi à identifier la variabilité de l'exsudation racinaire sur une collection de lignées de mil et le cas échéant d'étudier l'effet de cette variabilité sur la densité, la diversité et l'activité des bactéries rhizosphériques.

METHODOLOGIE:

- Caractérisation de l'exsudation racinaire de 86 lignées de mil:
 - Croissance des plantes en serre pendant 4 semaines.
 - Dépôtage et évaluation de l'exsudation racinaire en utilisant la *masse de sol adhérent aux racines par unité de biomasse racinaire (MSA/BR)* définie par Atami et al (2000); Kaci et al (2005) qui est dépendante de l'exsudation comme critère de phénotypage selon le schéma suivant:

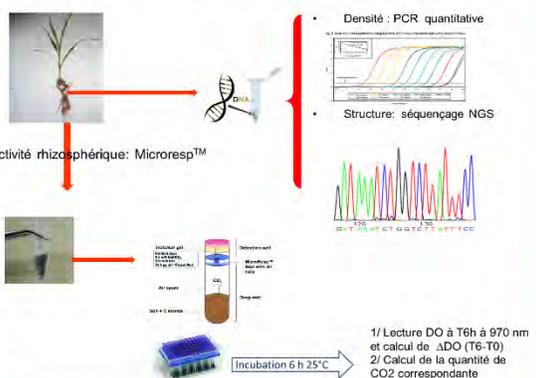





1: culture en serre 2:secouement des racines 3: récupération du S.A 4: séchage du S.A

- Etudes des microorganismes rhizosphériques sur des lignées contrastées:
 - Densité : PCR quantitative
 - Structure: séquençage NGS

Activité rhizosphérique: Microresp™

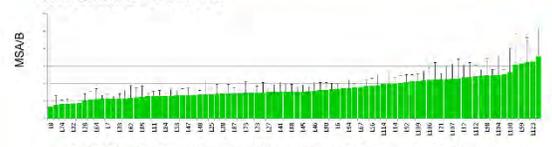


1/ Lecture DO à T6h à 970 nm et calcul de ΔDO (T6-T0)
2/ Calcul de la quantité de CO2 correspondante

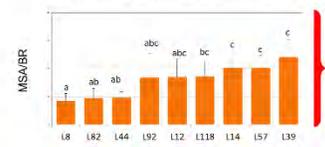
Incubation 6 h 25°C

- Isolement et caractérisation de Bactéries productrices d'exo-polysaccharides
- Etude des caractères agro-physiologiques de lignées contrastées aux champs

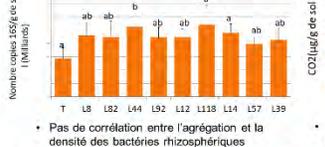
RESULTATS OBTENUS:



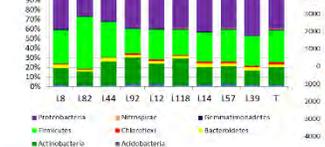
• Variabilité génétique de l'exsudation racinaire de 86 lignées de mil



• MSA/BR des 9 lignées de mil contrastées sélectionnées à l'issue du phénotypage
• Bonne reproductibilité du phénotypage MSA/BR des lignées

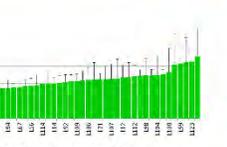


• Pas de corrélation entre l'agrégation et la densité des bactéries rhizosphériques

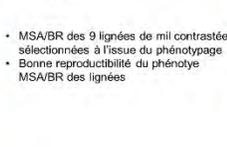


Abondance relative des principaux phyla bactériens associés à la rhizosphère des lignées contrastées:

- Les firmicutes sont plus abondantes dans la rhizosphère des lignées à faible agrégation racinaire
- Les Protobactéries sont plus abondantes dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation racinaire



• Pas de corrélation entre l'agrégation et l'activité des microorganismes rhizosphériques



Abondance relative des rhizobiales par rapport au témoin (sol nu) dans les sols rhizosphériques des lignées contrastées:

- Déplétion dans la rhizosphère de lignées à faible agrégation
- Enrichissement dans la rhizosphère des lignées à forte agrégation

CONCLUSIONS PARTIELLES:

- L'agrégation rhizosphérique présente une variabilité intra-spécifique.
- Cette variabilité n'est liée ni à la densité ni à l'activité globale des microorganismes du sol rhizosphérique.
- Par contre elle s'accompagne d'une modification de la structure des communautés bactériennes rhizosphériques.

RETOMBÉES SCIENTIFIQUES:

- Meilleure connaissance des bases génétiques de l'exsudation racinaire
- Effet de sur la diversité des communautés microbiennes rhizosphériques
- Une détermination de la relation entre exsudation racinaire et le comportement éco-physiologique et agronomique des plantes au champ
- Mise à disposition d'un Nouvel critère pour la sélection de plantes.

IMPACTS SOCIOECONOMIQUES:

- Maintien de la fertilité des sols cultivés pour une agriculture durable









Effet de la variabilité génétique du mil (*Pennisetum glaucum* L.R.Br.) sur la diversité et l'activité des micro-organismes du sol rhizosphérique : Conséquences agronomiques et physiologiques

Le mil est une céréale très résistante à la sécheresse, cultivée principalement en Inde et en Afrique sahélienne et présentant une grande diversité génétique. Cette dernière offre des possibilités en matière de sélection variétale pour une intensification durable de la production. Outre les critères liés aux performances agronomiques, à la résistance aux stress biotiques et abiotiques, les relations entre la plante et les communautés microbiennes rhizosphériques, en grande partie gouvernées par l'exsudation racinaire, pourraient être des cibles de sélection intéressantes à intégrer dans les programmes d'amélioration variétale. En effet, celles-ci influencent les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol et impactent la disponibilité des nutriments et de l'eau. Notre étude avait pour objectif de déterminer s'il existe chez le mil une variabilité génétique intra-spécifique de ces interactions en vue de tester leurs répercussions éventuelles sur les performances agronomiques. Pour ce faire un travail de criblage a été effectué sur deux collections de lignées de mil en utilisant comme paramètre test de ces interactions l'agrégation du sol rhizosphérique, mesurée via le ratio entre la masse de sol adhérent aux racines et la biomasse racinaire (MSA/BR). Des lignées contrastées ont été sélectionnées et des analyses de la diversité et de l'activité des communautés microbiennes rhizosphériques associées ont été effectuées dans deux expérimentations dont l'une en conditions semi contrôlées et l'autre au champ. Les expérimentations de phénotypage ont montré qu'il y avait bien une variabilité génétique de l'agrégation rhizosphérique entre les lignées de mil. En conditions semi contrôlées, la diversité et la composition de la communauté bactérienne au sein de la rhizosphère étaient variables et corrélées à l'intensité du ratio MSA/BR. Lors de l'expérimentation au champ, cette relation n'a pas été retrouvée. Toutefois, certaines activités enzymatiques du sol comme la chitinase, la phosphatase acide et la bêta glucosidase y présentent une variabilité entre lignées et une certaine relation avec l'agrégation du sol rhizosphérique. Les corrélations entre les indicateurs de structure et d'activité des communautés rhizosphériques et l'agrégation ne sont pas univoques, indiquant que d'autres processus sont probablement impliqués dans la variabilité de ces paramètres. Cependant les observations réalisées confirment l'intérêt de poursuivre l'étude du déterminisme génétique des interactions rhizosphériques chez le mil et de poursuivre de manière plus détaillée l'évaluation de leur impact agronomique.

Mots-clés : mil, exsudation racinaire, agrégation rhizosphérique, séquençage 16S, séquençage ITS, exo-polysaccharide, diversité microbienne, activités microbiennes, qPCR

Effect of pearl-millet (*Pennisetum glaucum* L.R.Br.) genetic variability on the diversity and activity of rhizospheric soil microorganisms: Agronomic and physiological consequences

Millet is a drought-tolerant cereal crop, mainly grown in India and Sahelian Africa, with high genetic diversity. The latter offers opportunities for varietal selection for its sustainable intensification. In addition to criteria related to agronomic performances, resistance to biotic and abiotic stresses, the relationships between varieties and rhizospheric microbial communities could be very interesting to take in account in breeding programs. Indeed, these relationships can influence the soil physico-chemical and biological characteristics, which affect the availability of nutrients and water. Our study aimed to determine whether there is an intra-specific genetic variability which governs these interactions in millet and to evaluate their possible repercussions on agronomical performances. A screening experiment of rhizospheric soil aggregation, used as a proxy of rhizospheric interactions, was carried out on two collections of millet lines using the ratio between the mass of the soil adhering to the roots and the root tissue mass (RAS/RT). Contrasted lines were selected and an analysis of the diversity and activity of the rhizospheric microbial communities were carried out in two experiments, one in semi-controlled conditions and one in the field. Phenotyping experiments showed a significant genetic variability rhizospheric soil aggregation in pearl millet. Under semi-controlled conditions, the bacterial community diversity and structure was variable between millet lines and correlated with rhizosphere soil aggregation. However, on the field experimentation, this relationship has not been found. However, some specific enzymatic activities such as chitinase, acid phosphatase and beta glucosidase showed significant variability between lines and some relation with soil aggregation. Correlations between indicators of structure and activity of microbial communities and soil aggregation are not unique and other processes are likely implied in the variability of these parameters. However, our observations confirm the interest in continuing the study of genetic determinism of rhizospheric interactions in millet, and in investigating more thoroughly their agronomical impacts.

Keywords: Pearl-millet, root exudation, rhizosphere aggregation, 16S sequencing, ITS sequencing, exo-polysaccharide, microbial diversity, microbial activities, qPCR