

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

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

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2018

N° d'ordre : 2018.38



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales, Microbiennes et Amélioration des
Plantes

Présentée par : Nogaye NIANG

**Caractérisation structurale et fonctionnelle des communautés
bactériennes associées à *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst
dans deux zones contrastées du Sénégal**

Soutenue le 20 décembre 2018 devant le jury composé de :

<u>Président</u> :	M. Samba Ndao SYLLA	Professeur titulaire	BV-UCAD
<u>Rapporteurs</u> :	M. Diégane DIOUF	Professeur titulaire	BV-UCAD
	M. Malick MBENGUE	Maître de conférences	ESP-UCAD
	Mme Lydie CHAPUIS-LARDY	Directrice de recherche	LMI IESOL-IRD
<u>Examineur</u> :	M. Anicet G B MANGA	Maître de conférences	UGB
<u>Co-directeur de thèse</u> :	M. Saliou FALL	Maître de recherches	ISRA
<u>Directeur de thèse</u> :	M. Ibrahima NDOYE	Professeur titulaire	BV-UCAD

DEDICACES

A la mémoire de Feu Fatou Kinè MBAYE, qui est partie sur la pointe des pieds, que Dieu ait pitié de son âme

Je dédie ce travail à :

A mon fils Elhadji Malick Djigo, mon plus grand bonheur, ma source de motivation

A ma maman, mon papa, mon homonyme, ma tata

Sassoum

A toute ma famille, sœurs, frères, tantes, belles-sœurs

A mon mari

A tous mes enseignants et amis

L'intelligence ne mène qu'à l'inaction. C'est la foi qui donne à l'homme l'élan qu'il faut pour agir et l'entêtement qu'il faut pour persévérer (Roger Martin du Gard)

Nogaye NIANG

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué en partie au *Laboratoire Commun de Microbiologie* (IRD/ISRA/UCAD, Dakar, Sénégal), au *Laboratoire Ampère* de l'université de Lyon (Ecully, France) et au *Laboratoire Mixte International Intensification Ecologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest* (LMI IESOL, Dakar, Sénégal).

Il a pu être effectué grâce à la contribution financière du *Ministère de l'Enseignement Supérieur du Sénégal* (à travers le projet PAPES), le *Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'ambassade de France à Dakar* (bourse SCAC), l'*Institut Sénégalais de Recherches Agricoles* à travers le projet (WAAPP) et l'*USAID/ERA*.

Ces différents financements m'ont permis de travailler dans des conditions correctes. Que les autorités et le personnel de ces organismes trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Je rends grâce à **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé, l'endurance et la persévérance durant toutes ces années. Ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apportée leur concours et leur soutien lors de la réalisation de ce travail.

Je tiens, dans un premier temps, à remercier tous les **professeurs** de la faculté des sciences et techniques en particulier ceux du **Département de Biologie Végétale** (UCAD), je veux citer : **M. Kandjioura Noba**, **M. Ibrahima Ndoye**, **M. Mame Samba Mbaye**, pour avoir autorisé mon inscription en thèse. Merci pour votre confiance.

Mes remerciements sincères et respectueux s'adressent aussi au **Pr Pape Mbacké Sembéne** et au **Pr Samba Ndao Sylla** pour avoir donné un avis favorable à mon inscription à l'École Doctorale SEV.

Je remercie **Pr Amadou Ba**, **Pr Diégane Diouf** et **Dr Saliou Fall** pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein du *Laboratoire Commun de Microbiologie* depuis mon master. J'adresse mes plus sincères remerciements au **Pr Pascal Simonet** pour m'avoir accueillie au *laboratoire Ampère*.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à mes encadreur : **Pr Ibrahima Ndoye** et **Dr Saliou Fall**. Merci de tout cœur pour votre patience, votre

enthousiasme, votre confiance, votre grande disponibilité et pour vos nombreux conseils et encouragements. Merci également de m'avoir léguée un petit fragment de votre érudition, Je sors vraiment grandie de cette expérience grâce à l'autonomie que vous n'avez pas hésité à m'accorder. Votre humanisme m'inspire énormément.

Je renouvelle toute ma gratitude au Pr **Samba Ndao Sylla** pour avoir accepté de juger et de présider ce jury de thèse. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par votre participation.

Je remercie les autres membres du jury à savoir Dr **Lydie Chapuis-Lardy**, Pr **Diégane Diouf**, Dr **Malick Mbengue** et Dr **Anicet Georges Bruno Manga** pour avoir accepté de juger ce travail malgré le délai contraignant et leurs occupations multiples.

J'exprime mes profonds remerciements à Mme **Isabelle Navarro** et Mme **Sandrine Démanèche** pour leur encadrement durant les deux séjours en France. Merci pour vos conseils avisés, votre patience. Merci de m'avoir donné la chance de travailler dans un laboratoire de référence en métagénomique.

Ma gratitude s'adresse au Pr **Mame Ourèye Sy** et au Pr **Diaga Diouf** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire LCBV durant toute la période de la rédaction de ce manuscrit. Je suis profondément touchée par leur gentillesse et leur compréhension.

Ma gratitude infinie s'adresse également au Dr **Abdoulaye Soumaré** pour la part importante qu'il a pris dans la rédaction de l'article et du manuscrit. Merci pour les nombreuses et pertinentes remarques et suggestions, les judicieux conseils. Je suis très reconnaissante au Dr **Amadou Dieng**, Dr **Niokhor Bakhoum** pour leurs remarques, conseils et discussions enrichissants.

Merci à tous les chercheurs du Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD : **Adama Diouf**, **Abdallah Diédhiou**, **Aboubacry Kane**, **Ramatoulaye Samba Mbaye**, **Tatiana Krassova Wade**, **Laurent Laplace**, **Dioumacor Fall**, **Nathalie Diagne**, pour leur sympathie et leur disponibilité pour discuter sur des questions scientifiques, à tout le personnel du LCM : **Maimouna**, **Ta Marie**, **Mme Diagne**, **Mame Dieumb**, **Francis**, **Mathieu**, **Paul**, **Cheikh Ndiaye**, pour leur aide quotidienne, à tous les docteurs : **Mariama**, **Fatoumata**, **Babacar**, **Issa**, **Fatou Ndoye**, **Fatou Diouf**, **Michaëlla**, aux doctorants et étudiants **Aïda**, **Thesy**, **Arlette**, **Awa**, **Seynabou**, **Diary**, **Pape Djighaly**,

Adama, Sally, Arona. Merci pour la bonne ambiance, la complicité et les bons moments passés ensemble.

Je suis extrêmement reconnaissante à tout le personnel de LMI IESOL, plus particulièrement à maman *Mariama Gueye*, au Dr *Komí*, Dr *Sidy*, Dr *Tidiane*, Dr *Sitor* et tous les doctorants et étudiants.

J'exprime ma reconnaissance aux chercheurs, doctorants et personnel de LNRPV. Un énorme merci, aux chercheurs, doctorants, étudiants et personnel du laboratoire Ampère et du LCBV. Soyez tous remerciés pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de la thèse. Un grand merci à *Pape Mamadou Sarr (IRD)* et au *Dr Lamíne Ndoye (FST)* pour l'appui informatique.

Je tiens à adresser toute ma reconnaissance à tous les professeurs qui ont participé à ma formation de l'école primaire à l'université (UCAD).

Merci à mes amis : *Ndack, M.* et *Mme Sall, Mamadou, Thiam, Nourou Sylla* pour leur disponibilité et leur soutien sans faille durant tous mes séjours en France ; à *Fatou Sy Diagne* et *Khady Cissé* mes jumelles ; à *tata Sophia* et sa famille merci de veiller sur mon fils ; à *Ndeye* et *Fatou* (les nounous) de mon fils ; à *Diarra, Pape Sarr, Pape Mbaye, Amadou Sow (COUD), Papa Aly Ndiaye (ISRA), Mouhamadou Mbaye* (direction commerce), *Mame Sokhna Sarr, Pape Sall* pour les encouragements ; à *Pape Abdou Sarr, Mame Malick Sy, Assane Faye* pour les prières.

Je ne saurais terminer sans remercier toute ma famille : *ma maman* (ma référence), *mon papa* (mon guide), *mon homonyme* (*Badjéne*), mes sœurs (*Absa, Maty, Salla, Mbodja*), mes frères (*Moustapha, Mansour, Djily, Mass, Baba*), mes tantes, *ma belle-famille* qui m'ont toujours soutenue et encouragée à aller de l'avant. Soyez tous remerciés pour votre confiance, votre soutien inconditionnel et pour m'avoir accompagné sans faille tout au long de mes études.

Enfin, merci à toi *mon Mari*, pour tout

DIEUREUDIÉUF

Nogaye NIANG

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement
FACULTE : Sciences et Techniques

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Nom et prénoms du candidat : NIANG Nogaye

Titre de la thèse : Caractérisation structurale et fonctionnelle des communautés bactériennes associées à *P. reticulatum* (DC.) Hochst dans deux zones contrastées du Sénégal

Date et lieu de soutenance : le 20 décembre 2018 à l'UCAD, Dakar, Sénégal

Composition du jury :

M. Samba Ndao SYLLA	Professeur titulaire BV-UCAD	Président
M. Diégane DIOUF	Professeur titulaire BV-UCAD	Rapporteur interne
M. Malick MBENGUE	Maître de conférences ESP-UCAD	Rapporteur interne
Mme Lydie CHAPUIS-LARDY	Directrice de recherches LMI IESOL-IRD	Rapporteur externe
M. Anicet G B MANGA	Maître de conférences UGB	Examineur
M. Saliou FALL	Maître de recherches ISRA	Co-directeur de thèse
M. Ibrahima NDOYE	Professeur titulaire BV-UCAD	Directeur de thèse

Résumé :

Le Sahel est un environnement très touché par la dégradation des terres causée entre autre par la désertification, les feux de brousse, le surpâturage, les mauvaises pratiques agricoles et l'abandon des jachères de longue durée. Pour faire face à ces contraintes et créer les conditions d'une sécurité alimentaire, des approches et stratégies ont été proposées. L'association *Piliostigma reticulatum* et cultures céréalières (mil et sorgho) ou légumineuses (arachide) a fourni de bons résultats au Sénégal. En plus de ces effets agronomiques, l'arbuste contribuerait aussi à l'amélioration du bilan hydrique et à la fertilité du sol, pour laquelle les micro-organismes associés joueraient un rôle clé. Notre étude vise ainsi à mieux comprendre les interactions entre *P. reticulatum* et les communautés bactériennes du sol et en particulier celles impliquées dans le cycle de l'azote. Elle a porté sur l'étude (i) de la diversité génétique des *Rhizobia* et des endophytes des sols sous influence de *P. reticulatum* et leur impact sur la croissance de l'arbuste in vitro, (ii) de l'impact de *P. reticulatum* sur la structure des communautés bactériennes du sol et enfin (iii) de la diversité métagénomique et l'influence des méthodes d'extraction sur les communautés bactériennes associées à *P. reticulatum*.

Pour ce faire, les sols sous influence de l'arbuste *P. reticulatum* ont été échantillonnés dans deux zones contrastées du Sénégal (Ouest et Sud) et comparés avec des sols sous influence de *Erythrophleum guineense* et des sols témoin. De même, des approches par culture bactérienne et de séquençage du gène 16S ARNr ont été utilisées pour tenter d'accéder à une plus grande diversité bactérienne de ces sols.

L'étude a montré que la diversité des *Rhizobia* et endophytes des sols sous influence de *P. reticulatum* est variable en fonction de la zone d'étude. Le sol provenant de la zone Sud (Saré yorobana) est plus riche en bactéries infectives que le sol de la zone Ouest (Ndiassane). Cette tendance a été corrélée aux paramètres abiotiques tels que l'humidité du sol, le phosphore assimilable, le nitrate et l'ammonium. La caractérisation des *Rhizobia* et endophytes des sols sous *P. reticulatum* a aussi montré que l'arbuste exerce une influence sur les communautés bactériennes en favorisant les genres non symbiotiques (*Cohnella* et *Paenibacillus*). L'analyse par DGGE a confirmé que *P. reticulatum* modifiait la structure des communautés bactériennes du sol en exerçant une influence positive sur la composition de la population bactérienne. L'étude métagénomique a permis d'identifier plus de 30 ordres affiliés à 20 phyla avec toutefois une abondance relative très déséquilibrée. Onze (11) ordres (*Acidiales*, *Solibacterales*, *Actinomycetales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatissporales*, *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* et *Chthoniobacterales*) ont une abondance relative très grande dans tous les sols étudiés (sous *P. reticulatum*, sous *E. guineense* et sol nu).

D'un point de vue méthodologique, l'analyse des données RISA et métagénomique a révélé que la méthode d'extraction influence fortement la structure des communautés bactériennes du sol. Parmi les 3 méthodes utilisées, le kit Fast DNA a présenté le meilleur profil RISA avec une concentration en ADN importante en qualité et en quantité avant et après purification. Et d'un point de vue appliqué, l'inoculation de plants de *P. reticulatum* in vitro a révélé que deux (2) souches appartenant au genre *Ensifer* et *Cohnella*, parmi celles testées induisaient une amélioration significative de la croissance des plants et la teneur en chlorophylle des feuilles.

Dans sa globalité, les résultats de l'étude ont contribué à une meilleure compréhension du rôle et de la diversité bactérienne des sols sous influence de *P. reticulatum* à travers les bactéries isolées et testées. Nos résultats dégagent des perspectives d'améliorer la croissance de l'arbuste par la technique d'inoculation bactérienne.

Mots clés : Diversité, *Rhizobia*, Endophytes, *P. reticulatum*, NGS, RISA, DGGE, Isolement, ARNr 16S, Sol.

UNIVERSITY CHEIKH ANTA DIOP OF DAKAR
DOCTORAL SCHOOL: Life, Health and Environment Sciences
FACULTY: Sciences and Technologies
PhD THESIS

Specialty: Plant and Microbial Biotechnology and Plant Breeding

Surname and First name of the candidate: NIANG Nogaye

Thesis title: Structural and functional characterization of bacterial communities associated with *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst in two contrasting zones of Senegal

Date and place of the defense: December 20th, 2018, UCAD, Dakar, Senegal

Abstract:

The Sahel is an environment very affected by land degradation caused by desertification, bushfires, overgrazing, poor agricultural practices and the abandonment of long-term fallows. To address these constraints and create the conditions for food security, approaches and strategies were proposed. Association *Piliostigma reticulatum* and cereal crops (millet, sorghum) or (peanut) was proposed by research and practiced in the central and southern part of Senegal. In addition to its agronomic effects, the shrub would also contribute to improved water balance and soil fertility, for which associated microorganisms would play a key role. Our study aims to better understand the interactions between *P. reticulatum* and soil bacteria and in particular those involved in the nitrogen cycle. It focused on the study of (i) the genetic diversity of *Rhizobia* and PGPR of soil under *P. reticulatum* and their impact on shrub growth, (ii) the impact of *P. reticulatum* on soil bacterial structure and (iii) metagenomic diversity and influence of DNA extraction methods on bacteria associated with *P. reticulatum*.

Soil under influence of *P. reticulatum* was sampled at two climatically and environmentally contrasted sites (western and southern Senegal) and compared to a soil under the influence of *Erythrophleum guineense* and a bare soil. Similarly, bacteria culture and 16S rRNA sequencing or metagenomic have been used to access to the greater microbial diversity of these soils.

Result showed that the diversity of *Rhizobia* and endophytes in soil under the influence of *P. reticulatum* was varied according to the study site. The soil from the South zone (Saré yorobana) was richer in infective bacteria than the soil from western zone (Ndiassane). This trend was correlated with abiotic parameters such as soil moisture, assimilable phosphorus, nitrate and ammonium. The characterization of *Rhizobia* and endophytes were showed that the shrub influenced these bacteria by promoting non-symbiotic genera (*Cohnella* and *Paenibacillus*). The analysis by DGGE confirmed that *P. reticulatum* exerts an impact on the bacterial communities of the soil. The metagenomic study was identified 30 orders belong to 20 phyla with however a relative abundance very unbalanced. Eleven (11) orders (*Acidiales*, *Solibacterales*, *Actinomycetales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatisporales*, *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* and *Chthoniobacterales*) had a very high relative abundance in all soils studied (under *P. reticulatum*, under *E. guineense* and bare soil). The comparative analysis also revealed that all phyla recorded were dominant under *P. reticulatum* soil except *Firmicutes* phylum which has a much higher relative abundance in bare soil than in *P. reticulatum* soil. From a methodological point of view, analysis of RISA and metagenomic data revealed that the extraction method was influenced the structure of soil bacterial communities. Among the three-extraction method, the Fast DNA kit was presented the best RISA profile with high concentration of DNA in quality and quantity before and after purification. Inoculation of *P. reticulatum* plants in vitro revealed that two (2) strains belonging to the genus *Ensifer* and *Cohnella*, among those tested, induced a significant improvement in the growth of the plants and the content in chlorophyll of the leaves.

In summary, the results of the study contributed to better understanding of the bacterial role and diversity of soils under the influence of *P. reticulatum* through isolated and tested bacteria. Our results point out prospects for improving shrub growth through the bacterial inoculation technique.

Keywords: Diversity, *Rhizobia*, Endophytic, *P. reticulatum*, NGS, RISA, DGGE, Trapping, ARNr 16S, Structure and communities bacterial, Soil.

LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS

ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide Désoxyribonucléique Ribosomique
ANOVA	Analysis Of Variance
ANRr	Acide Ribonucléique Ribosomique
ATP	Adénosine 5'-Triphosphate
BA	Biomasse Aérienne
BET	Bromure d'Ethidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BR	Biomasse racinaire
C	Carbone
CFU	Colony Forming Unit
Cm	Centimètre
CO₂	Dioxyde de Carbone
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétate
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
G	Gramme
H	Heure
H⁺	Ion hydrogène
IESOL	Intensification Ecologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest
IGS	Intergenic Spacer (Espace Intergénique)
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
ISRA	Institut Sénégalaise de Recherches Agricoles
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kb	Kilobase ou Kilo-Paire de Bases
L	Litre
LAMA	Laboratoire des Moyens Analytiques
LCM	Laboratoire Commun de Microbiologie (IRD/ISRA/UCAD)
LMI	Laboratoire Mixte Internationale

M	Molaire
Mg	Milligramme
Min	Minute
ML	Maximum Likelihood
ml	Millilitre
mM	millimolaire
NCBI	National Center For Bioinformatics Institute
nm	Nanomètre
NGS	Next Generation Sequencing
ORS	Collection de Rhizobiums du LCM IRD/ISRA/UCAD, Dakar, Sénégal
OTU	Operational taxonomic unit
PAPES	Projet d'Appui à la Promotion des Enseignantes-chercheuses du Sénégal
p/v	Poids par Volume
Pb	Paire de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
pH	Potentiel Hydrogène
Ppm	Parties par Million PROGERT
P	Phosphore
Qiime	Quantitative Insight In Microbial Ecology
QSP	Quantité Suffisamment Proportionnelle
RDP	Ribosomal Database Project
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RISA	Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
Rpm	Rotation par Minute
S	Seconde
TAE	Tris Acétate Edta
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borate Edta
TE	Tampon Tris-Hcl, EDTA
UGB	Université Gaston Berger des Saint-Louis
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Average
USAID/ERA	United States Agency for International Development / Education Research in Agriculture
µg	Microgramme

μl	Microlitre
v/cm	Volt par Centimètre
v/v	Volume par Volume
WAAPP	West African Agriculture Productivity Program
YEM	YEM Yeast Extract Mannitol
YMA	YMA Yeast Extract Mannitol Agar

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Approche globale pour étudier les bactéries de la rhizosphère de <i>Piliostigma reticulatum</i> et leur potentiel impact sur la croissance de l'arbuste	4
Figure 2. Estimation du niveau de dégradation des sols au niveau mondial (Source UNEP/GRID-Arendal)	6
Figure 3. Schéma général des trois zones qui constituent la rhizosphère (Lynch, 1983).....	9
Figure 4. Arbre phylogénétique des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques et non symbiotiques (Kneip <i>et al.</i> , 2007)	11
Figure 5. Mécanismes connus pour la promotion de la croissance et la protection des plantes (Kumar <i>et al.</i> , 2011)	14
Figure 6. Différentes étapes de la technologie Illumina Miseq	32
Figure 7. Approche pour étudier les <i>Rhizobia</i> et PGPR des sols sous influence de <i>P. reticulatum</i> et leur impact sur la croissance de l'arbuste.....	35
Figure 8. Localisation des deux sites de prélèvement des sols.....	37
Figure 9. Piégeage des bactéries du sol prélevé sous <i>P. reticulatum</i>	39
Figure 10. Isolement des souches piégées	41
Figure 11. Arbre phylogénétique basé sur des séquences du gène de l'ARNr 16S des souches isolées (en gras) et des séquences de référence de la base de données NCBI en utilisant la méthode de neighbor-joining.....	52
Figure 12. Arbre phylogénétique basé sur des séquences 16S des souches de <i>Cohnella</i> et des séquences de références NCBI.	53
Figure 13a. Relation phylogénétique entre les bactéries isolées et la provenance de sols (site d'échantillonnage).....	54
Figure 13b. Relation phylogénétique entre les bactéries isolées et les plantes pièges utilisées.....	55
Figure 14. Réponse à l'inoculation de <i>P. reticulatum</i> à différentes souches. H (hauteur) et SPAD (Chlorophylle)	57
Figure 15. Réponse à l'inoculation de <i>P. reticulatum</i> à différentes souches. BA (biomasse aérienne) et BR (biomasse racinaire)	57
Figure 15. Approche pour étudier la structure des communautés bactériennes associées à <i>P. reticulatum</i>	63
Figure 17. Carte du Sénégal montrant la position de la région de Kolda ; la commune de Dioulacolon qui héberge le site de prélèvement (Saré Yorobana)	65
Figure 18. Empreintes DGGE montrant la structure des communautés bactériennes totales des échantillons de sols prélevés sous <i>P. reticulatum</i> et des témoins	73
Figure 19. Analyse en composante principale (ACP) des données de «comparaison» de la DGGE.....	75
Figure 20. Dendrogramme similarité montrant les relations des profils DGGE entre les échantillons sous et hors influence de l'arbuste <i>P. reticulatum</i>	76
Figure 21. Approche pour évaluer la diversité métagénomique associée à <i>P. reticulatum</i>	82
Figure 22. Méthode de quantification de l'ADN au Qubit® fluorometer (invitrogen) avec le kit Quant-iT™ dsDNA BR	86
Figure 23. Type d'électrophorégrammes obtenu avec un Ladder	89
Figure 24. Type d'électrophorégrammes obtenu avec un l'échantillon	89

Figure 25. Alignement des profils sur le logiciel RisaAligner	90
Figure 26. Quantification de l'ADN non purifié au Qubit.....	966
Figure 27. Quantification de l'ADN après purification au thermo scientific multiskan.....	966
Figure 28. Profils RISA des échantillons de <i>P. reticulatum</i> extraits avec les 3 kits utilisés..	988
Figure 29. Profils RISA des échantillons de <i>E. guineense</i> extraits avec les 3 kits utilisés...	988
Figure 30. Profils RISA des échantillons des témoins extraits avec les 3 kits utilisés.....	999
Figure 31. ACP de l'intergène 16S-23S selon la méthode d'extraction : a) MoBio ; b) NucleoSpin et c) FastDNA.....	100
Figure 32. ACP globale de tous les échantillons selon : a) la méthode d'extraction ; b) les sols étudiés et c) par répétition : E (<i>E. guineense</i>), P (<i>P. reticulatum</i>) et T (Témoin)	1011
Figure 33. Séquences obtenues avec la méthode d'extraction ADN MoBio	1033
Figure 34. Séquences obtenues avec la méthode d'extraction ADN FastDNA	1033
Figure 35. Séquences obtenues avec la méthode d'extraction ADN NucleoSpin.....	1044
Figure 36. Distribution des échantillons par rapport à l'espace (PCo1, PCo2 et PCo3).....	1077
Figure 37. Les différents phyla obtenus dans les sols d'étudiés.....	1099
Figure 38. Les classes dominantes dans les sols étudiés	1111

LISTE DES PLANCHES

Planche 1. Touffe de <i>Piliostigma reticulatum</i>	17
Planche 2. <i>P. reticulatum</i> en association avec du manguier (Crédit photo : Diédhiou et Diédhiou).....	20
Planche 3. <i>P. reticulatum</i> en association avec du mil (Crédit photo : S. Diakhaté)	21
Planche 4. <i>Erythrophleum guineense</i> (Crédit photo N. Bourland).....	23
Planche 5. Photo d'appareil Gel DGGE a) Cuve de dépôt et b) appareil d'électrophorèse....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Analyse physico-chimique des sols des deux zones d'étude	45
Tableau 2. Nodules récoltés en fonction des plantes pièges et de la zone de prélèvement....	46
Tableau 3. Distribution des profils RFLP 16S en fonction des plantes pièges et de la zone de prélèvement	47
Tableau 4. Séquençage avec numéros d'accession des souches isolées et signaux <i>nifH</i> : (+) <i>nifH</i> positif ; (-) <i>nifH</i> négatif	50
Tableau 5. Caractéristiques chimiques des sols prélevés dans les zones sous et hors influence de <i>P. reticulatum</i> . Les données en ligne portant des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$).....	71
Tableau 6. Indices de diversité Shannon (H) et Simpson (D). Les données en ligne portant des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)	74
Tableau 7. Propriétés physico-chimique des sols étudiés.....	94
Tableau 8. Indices de diversité (Chao1, Simpson's et Shannon) des sols étudiés	105
Tableau 9. Sept (7) phyla les plus dominants dans les sols.....	110
Tableau 10. Proportion relative des classes de bactéries dans les sols étudiés	112
Tableau 11. Pourcentage comparatif des 11 dominants ordres dans les sols étudiés	113

TABLE DES MATIERES

<i>Introduction générale</i>	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	5
I. Désertification et dégradation des milieux sahéliens	5
II. Les communautés bactériennes du sol	7
II.1. Le sol comme support de la biodiversité	7
II. 2. La diversité des communautés bactériennes du sol	7
II. 3. La rhizosphère et les bactéries rhizosphériques	8
II. 3 1. Les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote	10
II. 3 2. Les bactéries bénéfiques non symbiotiques	12
II. 3 2 1. Les bactéries libres fixatrices d'azote	12
II. 3 2 2. Les bactéries endophytes promotrices de la croissance des plantes	12
III. Les légumineuses partenaires des bactéries	15
III. 1. Généralité sur les légumineuses	15
III. 2. Sous famille des <i>Cercidoideae</i>	16
III. 2 1. <i>Piliostigma reticulatum</i>	16
III. 2 1 1. Description botanique de <i>Piliostigma reticulatum</i> (DC.) Hochst	16
III.2 1 2. <i>Piliostigma reticulatum</i> et les propriétés du sol	18
III. 3. La sous famille des <i>Caesalpinioideae</i>	22
III. 3 1. <i>Erythrophleum guineense</i> (ou <i>Erythrophleum suaveolens</i>) (J. Berhaut)	22
III. 3 1 1. Description botanique du genre <i>Erythrophleum</i>	22
III. 3 1 2. Répartition géographique et intérêt de l'espèce <i>E. guineense</i>	24
III. 3 2. <i>Acacia bivenosa</i>	25
III. 3 3. <i>Vachellia seyal</i>	25
III. 3 4. <i>Faidherbia albida</i>	25
III. 3 5. Justification de l'utilisation de quelques espèces de <i>Caesalpinioideae</i>	26
IV. Approches utilisées dans l'étude de la diversité des communautés bactériennes	26
IV. 1. Isolement par piégeage des bactéries	26
IV. 2. Techniques d'empreintes moléculaires	27
IV. 2 1. «Restriction Fragment Length Polymorphism» (RFLP)	27
IV. 2 2. "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (DGGE)	28
IV. 2 3. «Ribosomal Intergenic Spacer Analysis» (RISA)	28
IV. 3. Les nouvelles techniques de séquençage ou NGS (next-generation sequencing)	29
IV. 3 1. La métagénomique	30
IV. 3 1 1. Contexte et origine de la métagénomique	30
IV. 3 1 2. Métagénomique bactérienne	31
IV. 3 1 3. La technologie Illumina/Solexa	31
 Chapitre II. Diversité des Rhizobia et PGPR des sols sous influence de <i>Piliostigma reticulatum</i> (DC.) Hochst et leur impact sur la croissance de l'arbuste	 33
I. Introduction	33
II. Matériel et méthodes	36
II. 1. Sites et échantillonnage du sol	36
II. 2. Caractérisation physico-chimique des sols	38
II. 3. Piégeage des bactéries associées au sol de <i>P. reticulatum</i>	38
II. 4. Isolement et conservation des bactéries	40
II. 5. Étude phylogénétique des souches isolées	42

II. 5 1. Extraction d'ADN et amplification de la région 16S et du gène <i>nifH</i>	42
II. 5 2. Evaluation de la diversité par RFLP du gène de l'ARNr 16S	43
II. 5 3. Identification taxonomique des souches isolées	43
II. 6. Impact des souches isolées sur la croissance de <i>P. reticulatum</i>	43
II. 7. Analyse statistique	44
III. Résultats	45
III. 1. Analyse physico-chimiques des sols	45
III. 2. Piégeage des bactéries associées aux sols sous <i>P. reticulatum</i>	45
III. 3. Diversité génétique des souches isolées	46
III. 3 1. Evaluation de la diversité par PCR-RFLP de l'ARNr 16S	46
III. 3 1 1. Amplification du gène <i>nifH</i>	48
III. 3 2. Analyse phylogénétique des séquences de l'ARNr 16S	48
III. 4. Impact des souches isolées sur la croissance de <i>P. reticulatum</i>	56
IV. Discussion	58
V. Conclusion	60

Chapitre III. Étude de la structure par DGGE des communautés bactériennes du sol associées à l'arbuste *Piliostigma reticulatum* 61

I. Introduction	61
II. Matériel et Méthodes	64
II. 1. Site d'étude et échantillonnage	64
II. 2. Caractérisation physico-chimique des sols	66
II. 3. Extraction de l'ADN total des sols	67
II. 4. Amplification par PCR de l'ARNr 16S	67
II. 5. Electrophorèse sur gel en gradient de dénaturation (DGGE)	68
II. 6. Analyse du gel et de la structure des communautés bactériennes du sol	69
II. 7. Analyse statistique	69
III. Résultats	70
III. 1. Caractéristiques physico-chimiques des sols	70
III. 2. Structure et diversité des communautés bactériennes du sol sous <i>P. reticulatum</i>	72
III. 2 1. Analyse de la structure des communautés bactériennes par comparaison de profils DGGE	72
III. 2 2. Analyse des indices de diversité	74
III. 2 3. Analyse globale de la structure des communautés sur R avec le package ade4TkGUI	75
IV. Discussion	77
V. Conclusion	79

Chapitre IV. Diversité métagénomique et influence des méthodes d'extraction sur les communautés bactériennes associées à *P. reticulatum* comparées à celles de *E. guineense* 80

I. Introduction	80
II. Matériel et Méthodes	83
II. 1. Site d'étude et échantillonnage	83
II. 2. Analyse physico-chimique des sols	83
II. 3. Extraction de l'ADN des sols avec 3 méthodes (kits)	84
II. 3 1. Méthode avec le PowerSoil DNA Isolation Kit	84
II. 3 2. Méthode avec le NucleoSpin soil Macherey Nagel Isolation Kit	84
II. 3 3. Méthode avec le FastDNA Isolation Kit	85
II. 3 4. Quantification de l'ADN obtenu	85
II. 4. Amplification de la région intergénique 16S-23S	87

II. 4 1. La RISA des communautés bactériennes des échantillons de sol	87
II. 4 2. Analyse des profils RISA	91
II. 5. Amplification V3-V4 de la région 16S génomique	91
II. 5 1. Purification et quantification des ADNs au thermo scientific multiskan	91
II. 6. Séquençage massif du 16S avec la technologie Illumina MiSeq	92
II.7. Traitement et analyse bio-informatique des données	92
II. 8. Analyse statistique	93
III. Résultats	94
III. 1. Caractéristiques physico-chimiques des sols	94
III. 2. Qualité de l'ADN obtenu selon la méthode d'extraction	95
III. 3. Analyse des données RISA de l'intergène 16S-23S	97
III. 3 1. Analyse des profils RISA selon la méthode d'extraction	97
III. 3 2. Analyse en Composante principale (ACP) de la structure des communautés bactériennes de l'intergène 16S-23S	100
III. 3 3. Analyse globale de l'intergène 16S-23S de tous les échantillons	101
III. 4. Analyse de la diversité totale des communautés bactériennes de la région 16S	102
III. 4 1. Alpha diversité	102
III. 4 1 1. Nombre de séquences obtenues	102
III. 4 1 2. Les UTOs et les indices de diversité	105
III. 4 2. Beta-diversité par la distance Bray-Curtis	106
III. 4 3. La taxonomie des communautés bactériennes des sols	108
III. 4 3 1. Diversité au niveau des Phyla	108
III. 4 3 2. Diversité au niveau des Classes	110
III. 4 3 3. Diversité au niveau des Ordres	112
IV. Discussion	114
V. Conclusion	118
<i>Discussion générale</i>	<i>119</i>
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	<i>125</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>127</i>
<i>Annexe 1</i>	<i>A</i>
<i>Annexe 2</i>	<i>C</i>
<i>Annexe 3</i>	<i>D</i>

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Les projections de FAO montrent que les besoins alimentaires mondiaux devraient augmenter de 70% d'ici 2050 (MC Hunter MC *et al.*, 2017) pour nourrir une population qui augmenterait de plus d'un tiers, soit 2,3 milliards de personnes. Cette rapide croissance touchera plus les pays en développement en particulier les pays de l'Afrique subsaharienne. En effet, la population de l'Afrique subsaharienne était de 936,3 millions d'habitants en 2013 et devrait atteindre près de 1,5 milliard d'ici 2050. Cette pression démographique entraînera forcément une augmentation des besoins alimentaires qui sont estimés aussi à 70% en 2050 (FAO, 2009). Alors que les systèmes de production rencontrent d'énormes contraintes. Par exemple, au Sénégal, l'une des contraintes majeures de la production agricole est la dégradation des sols, liée entre autres à la perte du couvert végétal, la diminution des taux de matière organique, l'érosion hydrique et/ou éolienne, et la salinisation. De nombreuses solutions non durables ont été tentées, tels que l'utilisation abusive des engrais chimiques, qui entraînent une diminution drastique de la santé des sols. De plus, du coût élevé de ces engrais minéraux lié à leur renouvellement, seule une petite quantité est absorbée par les cultures ; le reste se retrouve dans les écosystèmes contribuant ainsi aux phénomènes d'eutrophisation et d'anoxies, et des émissions de gaz à effet de serre.

Cependant, l'agriculture a des défis de taille à relever pour intensifier la lutte contre la pauvreté et la faim, utiliser plus efficacement les ressources naturelles qui s'amenuisent et s'adapter aux changements climatiques. C'est pourquoi, de nombreux efforts ont été déployés pour promouvoir l'agro-écologie. Il s'agit essentiellement d'approches qui consistent en l'application d'engrais organiques d'origine animale ou végétale, l'usage de plantes de service ou encore de microorganismes rhizosphériques sous forme de bio-fertilisants (Diédhiou, *et al.*, 2016), afin de remédier aux paysages dégradés, tout en maintenant élevés les rendements des cultures pour assurer une sécurité alimentaire. C'est ainsi que, l'agroforesterie consistant à intégrer les arbres et arbustes de façon permanente dans le système de production végétale a été proposée par la recherche. Elle fait partir des voies de recherche visant des moyens biologiques d'amélioration de la fertilité des sols. Comme pour l'exemple de *Faidherbia albida* qui a eu un impact positif sur le rendement des cultures tels que le maïs, le mil et le sorgho (Bayala *et al.*, 2012), il existe des preuves que l'arbuste *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst augmente les rendements aussi lorsqu'il est associé à *Arachis hypogaea* (arachide) et à *Pennisetum glaucum* (mil), tout en améliorant la qualité du sol (Dossa *et al.*, 2010).

Piliostigma reticulatum comme toutes les légumineuses, a de nombreuses propriétés allant de la production de ressources riches en protéines, en lipides, en éléments minéraux et en vitamines jusqu'à l'amélioration de la qualité des sols (teneurs en azote, en matière organique, structure du sol) permettant ainsi d'optimiser durablement la productivité de l'agrosystème (Lupwayi *et al.*, 2011; Mahieu *et al.*, 2011). En milieu aride et semi-aride, *Piliostigma reticulatum* constitue des « îlots de fertilité », sous et à proximité des touffes de végétation (Wezel *et al.*, 2000 ; Housman *et al.*, 2007 ; Félix *et al.*, 2018), favorisant ainsi une meilleure disponibilité en eau et une décomposition de la matière organique. Il apporte de l'engrais naturel au sol grâce à la dynamique de l'azote et des activités enzymatiques sous son houppier (DeLay *et al.*, 2017).

L'azote est l'un des nutriments les plus limitant de la croissance végétale. La presque totalité des réserves d'azote se trouve dans l'atmosphère sous une forme chimique inaccessible directement à la majorité des organismes supérieurs. Seules certaines familles peuvent utiliser cet azote gazeux. La fixation biologique d'azote est un mécanisme permettant l'introduction d'azote dans la biosphère. C'est un processus métabolique exclusivement réalisé par les organismes procaryotes : certaines bactéries (bactéries telluriques, épiphytes ou endophytes) et cyanobactéries libres, et les bactéries symbiotiques des légumineuses (LaBauer & Treseder, 2008). Les bactéries symbiotiques sont naturellement présentes dans le sol et convertissent l'azote (N₂), en ammonium NH₄⁺ assimilable par la plante. Cette symbiose naturelle permet à la plante d'utiliser directement l'azote de l'air environnant pour sa croissance. Cette fixation symbiotique de l'azote permet de diminuer les apports d'azote dans le sol via l'utilisation d'engrais chimiques tout en conservant un niveau de fertilité azoté adéquat pour assurer la productivité de l'agrosystème (Dwivedi *et al.*, 2015). En effet, l'importance agricole de la fixation de l'azote est de fournir de l'ammonium aux cultures en minimisant ainsi la pollution des nappes phréatiques.

Partant de ces études nous avons posé l'hypothèse que *Piliostigma reticulatum* favoriserait le développement des communautés bactériennes impliquées dans la fertilisation du sol et la croissance des cultures associées. Malgré son importance écologique avérée, très peu de connaissances sont actuellement disponibles en ce qui concerne la diversité bactérienne réelle et le mode de nutrition azotée de *Piliostigma reticulatum*, qui ne forme pas de nodules.

Cette étude vise à contribuer à une meilleure connaissance des relations entre *Piliostigma reticulatum* et les communautés bactériennes du sol, ainsi que leur impact sur la fertilité. Donc, grâce à une technologie à la fois sensible et applicable, nous allons identifier les

taxons responsables des modifications de la structure du sol afin d'élargir nos connaissances sur l'utilisation et le maintien de *Piliostigma reticulatum* dans les agrosystèmes.

Pour ce faire, notre travail a été divisé en quatre parties correspondant à quatre chapitres distincts dont les approches méthodologiques des 3 derniers chapitres ont été illustrées par la (Figure 1).

1. La première partie correspond au chapitre I ; elle a fait l'objet d'une recherche bibliographique sur les bactéries du sol, et l'état de connaissance sur *Piliostigma reticulatum* de même que d'autres légumineuses utilisées : *Erythrophleum guineense*, *Faidherbia albida*, *Acacia bivenosa* et *Vachellia seyal*. Des différentes approches méthodologiques utilisées ont été également abordées pour la caractérisation des bactéries du sol.
2. La deuxième partie correspond au chapitre II ; elle a porté sur la diversité génétique des *Rhizobia* et des PGPR des sols sous influence de *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst et leur impact sur la croissance de l'arbuste. Il s'agissait de piéger les bactéries des sols prélevées sous *Piliostigma reticulatum* dans deux zones contrastées du Sénégal en utilisant des plantes pièges (*Faidherbia albida*, *Acacia bivenosa* et *Vachellia seyal*). Les souches obtenues ont été ensuite caractérisées d'un point de vue moléculaire et utilisées comme inoculum pour étudier la croissance de *Piliostigma reticulatum* in vitro.
3. La troisième partie correspond au chapitre III qui a porté sur l'étude de la structure par DGGE des communautés bactériennes du sol. L'objectif était de vérifier si la diversité de la structure des communautés bactériennes serait modifiée, voire augmentée en présence de l'arbuste. Il s'agissait aussi d'analyser les sols sous influence de *Piliostigma reticulatum* et du sol nu pour comparer les niveaux de l'humidité, de NH_4^+ , de NO_3^- , du P, C, N et du pH du sol.
4. La quatrième partie correspond au chapitre IV a traité la diversité métagénomique associée à l'arbuste *Piliostigma reticulatum* comparée à celle de *Erythrophleum guineense*. Cette partie avait pour objectifs d'évaluer, l'effet de la méthode d'extraction sur la structure des communautés bactériennes du sol par la technique RISA et l'impact de *Piliostigma reticulatum* et *Erythrophleum guineense* sur les communautés bactériennes totales par le séquençage Illumina Miseq.

Ces différentes parties sont suivies d'une discussion générale, d'une conclusion générale et des perspectives.

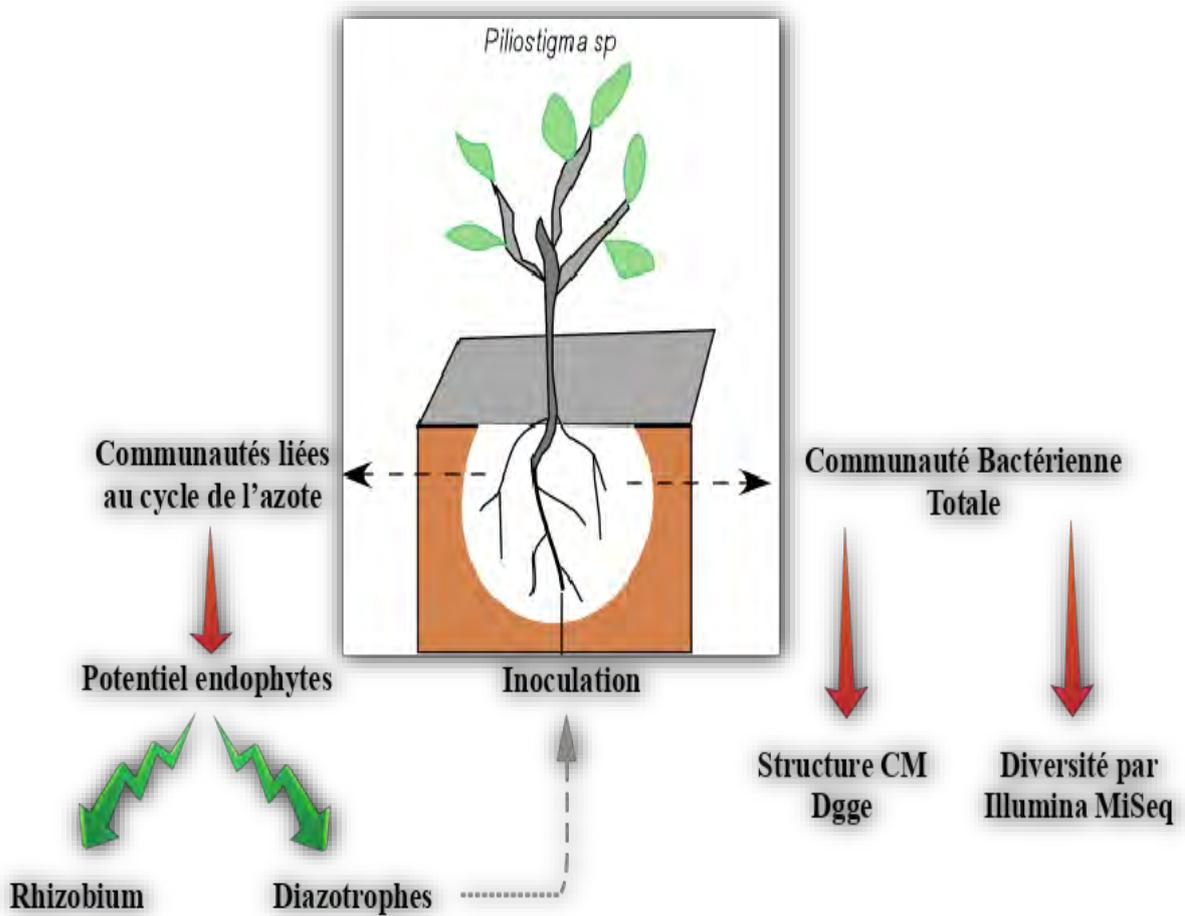


Figure 1. Approche globale pour étudier les bactéries de la rhizosphère de *Piliostigma reticulatum* et leur potentiel impact sur la croissance de l'arbuste

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I. Dégradation des milieux sahéliens : Causes et impacts

La dégradation des sols (Figure 2) affecte environ 1,5 milliard de personnes et un quart de la superficie de toutes les zones agro-écologiques du monde (Lal *et al.*, 2012 ; Gomiero, 2016). Chaque année, une superficie environ 5 à 8 million d'hectares de terres autrefois productives ne sont plus cultivées en raison de la dégradation (TerrAfrica, 2006). On parle de dégradation quand la terre ne parvient plus à assurer les fonctions et services liés à la production et au développement des communautés vivantes. Elle se produit lorsque la productivité potentielle associée à un système d'utilisation des terres devient non durable ou lorsque la terre n'est plus en mesure d'accepter, de stocker et de recycler l'eau, l'énergie et les déchets (Vlek *et al.*, 2010). La dégradation peut se présenter sous plusieurs formes :

- La dégradation physique, il s'agit de la diminution de l'épaisseur de la couche humifère, la déstabilisation des agrégats et de la structure du sol. Elle se manifeste aussi sous forme d'encroûtements à la surface du sol, de compactage, de l'aridification, etc.
- La dégradation chimique, c'est un déficit ou un excédent en éléments nutritifs qui se caractérise par l'acidification, la salinisation, l'alcalinisation etc.
- La dégradation biologique, qui est une réduction du contenu du sol en matière organique, de la quantité de la macrofaune du sol, et de la biodiversité de la macrofaune du sol.

De plus, il ya une autre forme considérée comme un type de dégradation : c'est l'érosion due par l'eau (érosion en nappe, érosion linéaire, en griffe, rigole, érosion marine littorale), et par le vent (déflation, ensablement, formation de dunes).

Cependant les effets globaux de la dégradation des sols constituent une menace majeure pour la sécurité alimentaire, en particulier dans les régions pauvres. Ainsi, pour estimer la dégradation des terres, il faudrait vérifier l'existence d'un lien de cause à effet entre les changements constatés et le déficit de productivité des terres. De plus, l'appauvrissement des sols en éléments nutritifs est souvent accentué par la faible fertilité initiale des sols dont 80% ont des limitations physiques ou chimiques pour la production agricole (Sanchez, 1976). Les faibles teneurs en carbone et en azote, qui sont des éléments essentiels de la fertilité du sol, sont causées entre autre par la faible production de biomasse et d'un taux très élevé de minéralisation (Mokwunye *et al.*, 1996). Cependant, l'exportation des résidus de cultures après récolte diminue le niveau des réserves du sol en éléments nutritifs entraînant des baisses du pH, des éléments (tels que K, Ca et Mg), et de la capacité d'échange des cations (CEC) par rapport à l'état de la

jachère (Bagayoko *et al.*, 1996 ; Koulibaly *et al.*, 2015). D'un autre côté, la pression démographique montante en Afrique, plus particulièrement au Sahel a conduit à la perturbation des systèmes de jachère, à des faibles rendements, et à une diminution progressive de la superficie et de la qualité des terres arables par habitant. Beaucoup de systèmes traditionnels de production n'ont pas pu évoluer assez rapidement pour faire face à cette croissance. Le nombre élevé d'habitants et d'animaux dans certaines zones a dépassé la capacité de charge des terres, entraînant la dégradation de l'environnement et la durabilité des systèmes de production. Tout ceci démontre que la zone Sahélienne est menacée par une diminution accélérée des ressources naturelles et une aggravation de la pauvreté dans les zones rurales (Ambouta *et al.*, 2004 ; Roose, 2004). Au Sénégal, l'érosion éolienne et hydrique qui sévit de manière très importante, la salinisation et l'acidification dues essentiellement à l'avancée de la mer et aux mauvaises pratiques agricoles participent fortement à la dégradation des sols. Toutefois, le sol en plus d'être un support pour la culture des végétaux, constitue un réservoir de micro-biodiversité car hébergeant plusieurs communautés microbiennes.

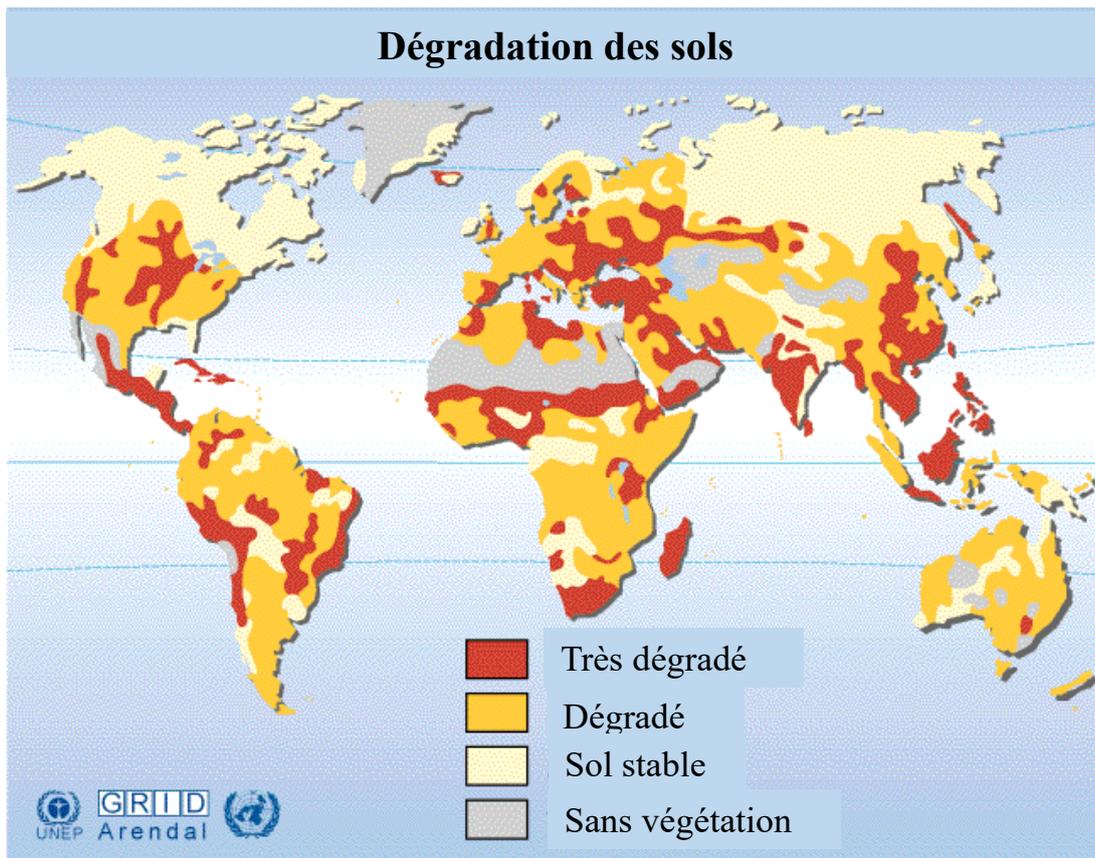


Figure 2. Estimation du niveau de dégradation des sols au niveau mondial (Source UNEP/GRID-Arendal)

II. Les communautés bactériennes du sol

II.1. Le sol comme habitat de la biodiversité

Le sol est une combinaison de trois fractions : une fraction solide, une fraction liquide et une fraction gazeuse. La fraction solide est composée de constituants minéraux (sables, argiles, limons) et de constituants organiques qui comprennent la phase organique inerte et la phase organique vivante (Theng, 1987). La fraction liquide (solution du sol) est composée d'eau dans laquelle sont dissoutes des substances solubles provenant à la fois de l'altération des roches, de la minéralisation des matières organiques et des apports par l'homme. Et enfin la fraction gazeuse qui est composée des gaz d'origine atmosphérique ou provenant de l'activité métabolique des organismes du sol. Le sol abrite en partie les processus de décomposition et de minéralisation de la matière organique. Il est également un milieu vivant qui héberge une très grande diversité d'organismes qui interagissent entre eux (Lavelle *et al.*, 1995 ; Swift *et al.*, 1998). Par ailleurs, les microorganismes qui y vivent, jouent un rôle clé dans la régulation des processus de décomposition de la matière organique et du cycle des nutriments (Recous *et al.*, 2017). Ce qui suppose qu'il constitue un maillon fort de la production agricole, et donc le support de la plante cultivée. Le sol est au centre des grands cycles biogéochimiques constituant des réserves d'éléments nutritifs, qui participent aux cycles de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention et de biodégradation des polluants) entre l'atmosphère et la terre. Il est considéré comme un milieu biologique dans/et sur lequel se développent des êtres vivants. Ce développement va dépendre de la qualité et de la quantité de carbone, d'azote, la capacité d'échange cationique, etc. ou de la fertilité du sol.

II. 2. La diversité des communautés bactériennes du sol

Le sol est un environnement complexe et très riche abritant une importante diversité de microorganismes. Parmi ces microorganismes, les bactéries sont de loin les plus abondantes à la fois en termes de biomasse et de diversité taxonomique (Buckley & Schmidt, 2002). Les microbiologistes utilisent, le terme « diversité » pour décrire les variations qualitatives entre les microorganismes (Øvreås, 2000). L'estimation de la diversité en espèces permet d'obtenir plus d'informations sur la nature de la composition d'un sol donné. Elle est exprimée par le nombre d'espèces différentes ainsi que par leur abondance relative dans la microflore du sol (Kennedy & Smith, 1995). Ainsi, la diversité des espèces dans un écosystème local est considérée comme la diversité alpha. La variation de cette dernière dans un même environnement est considérée comme la diversité bêta, et, lorsqu'elle est mesurable, la diversité gamma qui représente la

richesse en espèces à l'échelle régionale et mondiale. Par ailleurs, cette diversité a été appréhendée par diverses méthodes statistiques et marqueurs phylogénétiques.

II. 3. La rhizosphère et les bactéries rhizosphériques

Le terme «rhizosphère» a été défini pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner, et redéfini par plusieurs auteurs comme la zone soumise à l'influence directe des racines (Bakker *et al.*, 2013 ; Bouizgarne, 2013 ; Prescott & Grayston, 2013). Cette zone se distingue par trois parties (Figure 3) qui sont : L'endorhizosphère qui comprend le cortex racinaire et le tissu endodermique, le rhizoplane qui englobe l'épiderme et le mucilage et l'ectorhizosphère qui couvre le sol près de la racine (Lynch, 1983 ; Lynch & Whipps, 1990 ; Badri & Vivanco, 2009). Elle constitue un lieu d'interactions et d'échanges dynamiques complexes entre le sol, la solution du sol, les racines des plantes et les microorganismes rhizosphériques (Lynch & Whipps, 1990 ; Barea, 2005 ; Bais *et al.*, 2006). Dans cette zone, les interactions entre les racines des plantes, les sols et les microbes modifient de manière significative les propriétés physiques et chimiques du sol, qui modifient à leur tour la population microbienne de la rhizosphère (Nihorimbere *et al.*, 2011). Elle peut contenir jusqu'à 10^{11} cellules microbiennes par gramme de sol racinaire et plus de 30 000 espèces procaryotes (Egamberdieva, 2008 ; Mendes, 2011). Des travaux ont montré que les racines des plantes transfèrent 17% de leurs photosynthétats au niveau de la rhizosphère ce qui en fait une zone attractive et d'intense activité microbienne (Salt *et al.*, 1998 ; Nguyen, 2003), qui se caractérise par des conditions biotiques et abiotiques différentes de celles du sol non rhizosphérique (Ibekwe *et al.*, 2010). Les bactéries de cette zone appelées rhizobactéries sont d'une grande diversité et dont leur influence sur la plante peut être neutre, néfaste ou bénéfique (Raaijmakers *et al.*, 2009). Parmi les rhizobactéries bénéfiques, on peut distinguer principalement les bactéries diazotrophes (les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote et les bactéries fixatrices libres). Des études phylogénétiques montrent que des fixateurs sont présents dans de très nombreux groupes bactériens (Young, 1992 ; Young, 2000). Certains fixateurs d'azote s'associent à des plantes et d'autres vivent à l'état libre dans le sol et même parfois renforcent la nodulation des légumineuses ou influencent positivement la symbiose mycorhizienne en augmentant la solubilité des phosphates dans le sol (Lemanceau, 1992).

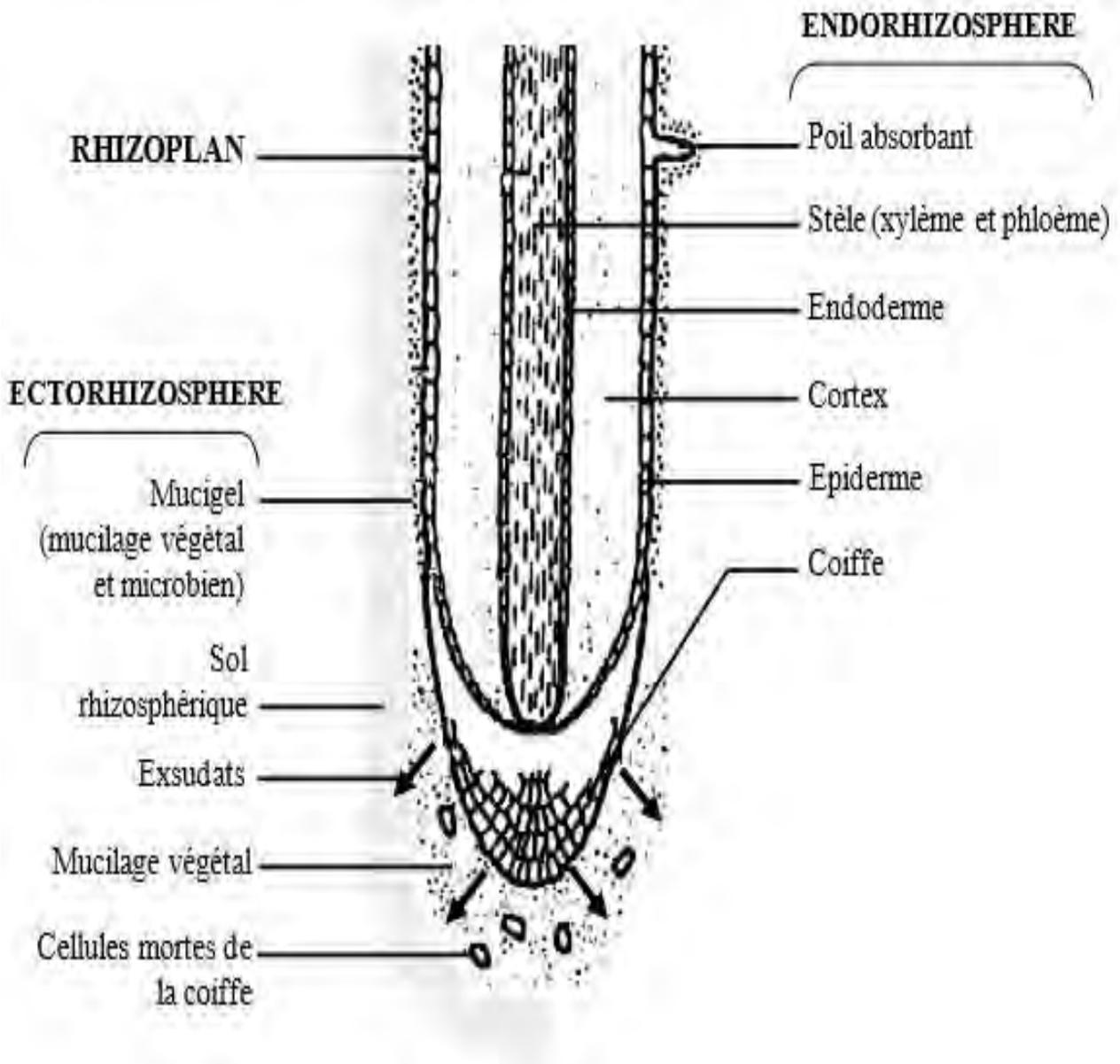


Figure 3. Schéma général des trois zones qui constituent la rhizosphère (Lynch, 1983)

II. 3 1. Les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote

L'azote constitue un composant essentiel des protéines et des acides nucléiques (Epstein & Bloom, 2005), un élément nutritif majeur utilisé par les plantes, favorisant la photosynthèse. Il stimule le développement et l'activité racinaire, contribue ainsi à l'absorption des autres éléments minéraux et à la croissance des plantes (Schneider & Huyghe, 2015). Ainsi la symbiose fixatrice d'azote est une association à bénéfice réciproque entre deux organismes vivants afin de permettre ou de faciliter la réduction du N₂ en azote assimilable. Dans le cas de la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique, on distingue classiquement : la symbiose rhizobienne (rhizobium-légumineuse) et la symbiose actinorhizienne (Frankia-Casuarinacées). Ces deux symbioses aboutissent à la formation d'un nodule, au sein duquel la bactérie fixe l'azote atmosphérique. Mais, l'association symbiotique la plus étudiée et la mieux connue, tant au niveau écologique et agronomique que moléculaire est celle établie entre les légumineuses et les rhizobiums (Schneider & Huyghe, 2015). Cette association symbiotique est assez courante dans la famille des légumineuses. Le groupe des *Rhizobia* est très diversifié en espèces bactériennes, qui sont définies par leur capacité à induire la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines ou les tiges des légumineuses et sur *Parasponia* (*Ulmaceae*), la seule non légumineuse symbiotique capable de former une symbiose fixatrice d'azote avec les *Rhizobia*. Il a été recensé plus de 80 espèces de bactéries capables d'établir une symbiose avec les légumineuses, réparties en 12 genres, génétiquement très différents. La plupart des espèces symbiotiques se trouvent dans la sous-classe des α *protéobactéria*, avec des genres : *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Devosia* et *Phyllobacterium* et dans la sous-classe β des *protéobactéria* : *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Gyaneshwar *et al.*, 2011; Remigi *et al.*, 2016). Ces genres sont capables de fixer l'azote à travers la formation de nodules. Toutefois, les classifications des procaryotes montrent que les microorganismes symbiotiques fixateurs d'azote occupent des positions phylogénétiques proches de celles des microorganismes non symbiotiques fixateurs (Figure 4) (Kneip *et al.*, 2007).

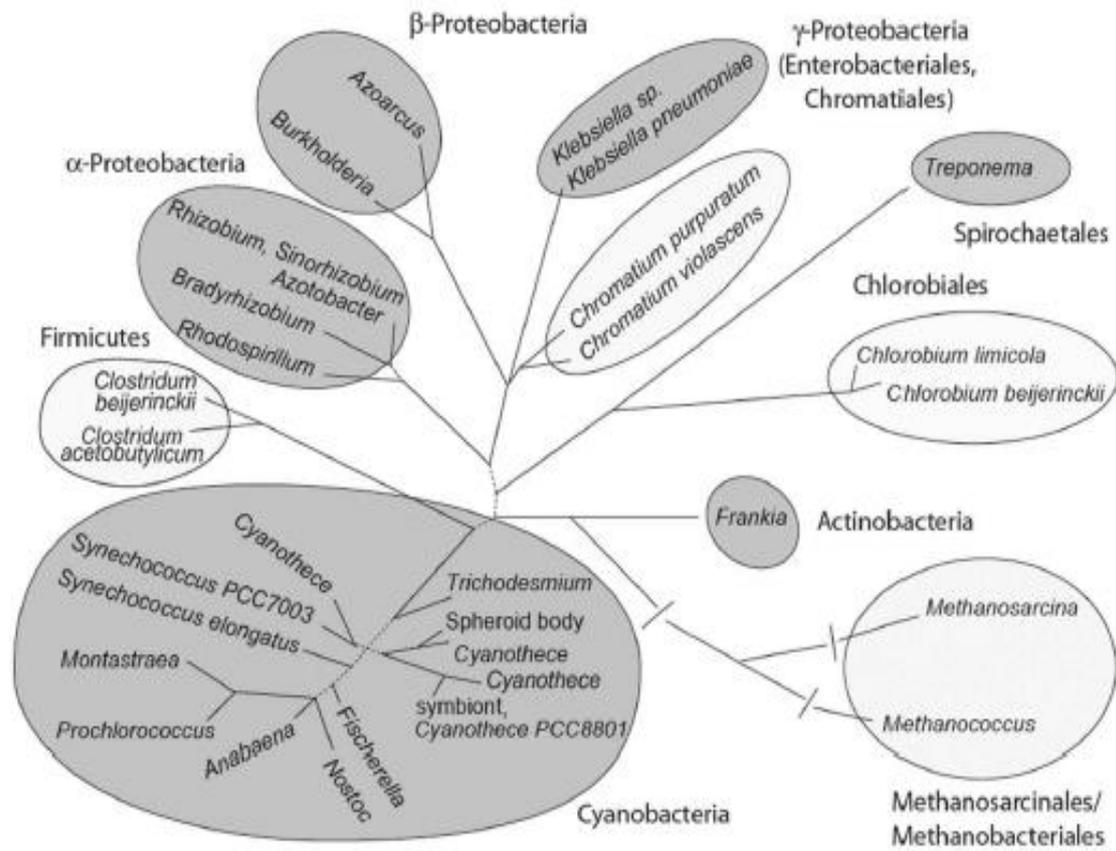


Figure 4. Arbre phylogénétique des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques et non symbiotiques (Kneip *et al.*, 2007)

II. 3 2. Les bactéries bénéfiques non symbiotiques

II. 3 2 1. Les bactéries libres fixatrices d'azote

Outre les symbiotes bactériens fixateurs d'azote, certaines fixatrices d'azote vivent à l'état libre dans le sol et les eaux, et participent à la bonne croissance des plantes. Ces bactéries contrairement aux bactéries symbiotiques, sont capables de fixer l'azote sans avoir recours à une association avec des espèces végétales. Ce sont des fixateurs libres et qui au même titre que les bactéries symbiotiques fixatrices jouent un important rôle dans la nutrition azotée des sols et des plantes. Ces fixatrices libres sont rencontrées dans différents genres bactériens que sont : *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter* pour les bactéries aérobies chimio-organotrophes, *Clostridium* pour les bactéries anaérobies strictes, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Rhodospirillum* pour les bactéries anaérobies facultatives et *Synechococcus* pour les cyanobactéries.

II. 3 2 2. Les bactéries endophytes promotrices de la croissance des plantes

La rhizosphère des plantes est aussi une zone tampon qui recrute des bactéries appartenant à différents genres qui protègent la plante contre les infections et améliorent sa croissance et son rendement par divers mécanismes. Cette croissance peut être favorisée par divers mécanismes qui augmentent l'accessibilité des nutriments, facilitent l'absorption des minéraux et des nutriments, libèrent des phytohormones etc. (Welbaum *et al.*, 2004 ; Podile & Kishore, 2006). Ces mécanismes connus pour la promotion de la croissance et la protection des plantes sont illustrés par (Kumar *et al.*, 2011) (Figure 5). Certains de ces genres (1 à 2% des bactéries) ont reçu le terme de PGPR pour «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» (Bashan & Holguin, 1998). Ces bactéries ont la capacité de coloniser la rhizosphère et de stimuler les interactions entre la microflore symbiotique et la plante-hôte (Subramanian *et al.*, 2015). Kishore *et al.*, (2005) ont montré que la plupart des bactéries endophytes habitent la rhizosphère végétale et / ou la rhizoplane et certaines peuvent se retrouver à un moment donné dans les tissus internes des plantes. Elles sont utilisées pour augmenter le rendement de diverses cultures (Bashan *et al.*, 2008). Elles appartiennent à plusieurs genres incluant *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Gluconacetobacter* (Pedraza, 2008). Certaines PGPB peuvent influencer directement le métabolisme de la plante en fournissant les substances qui sont habituellement en quantité limitée dans le sol. On y regroupe les bactéries capables de solubiliser les phosphates insolubles, d'augmenter la production des phytohormones et de fixer l'azote atmosphérique (Amarger, 2002 ; Bashan *et al.*, 2008). D'autres peuvent aussi augmenter la tolérance des plantes à divers stress tels les

pesticides et le stress hydrique y compris la sécheresse (Cohen *et al.*, 2009). Récemment des études ont montré que l'inoculation avec certaines bactéries (PGP), augmente la croissance et le rendement de grand nombre de plantes, y compris les légumineuses. Une souche de *Bacillus* isolée d'un nodule de soja a induit la nodulation et l'augmentation du rendement du soja lorsqu'elle est inoculée seule ou avec un *Bradyrhizobium japonicum* (Bai *et al.*, 2003). De même qu'une souche de *Bacillus* coinoculée avec une souche *Rhizobium sp* a augmenté la croissance et la nodulation du pois d'Angole (Renjendra *et al.*, 2007).

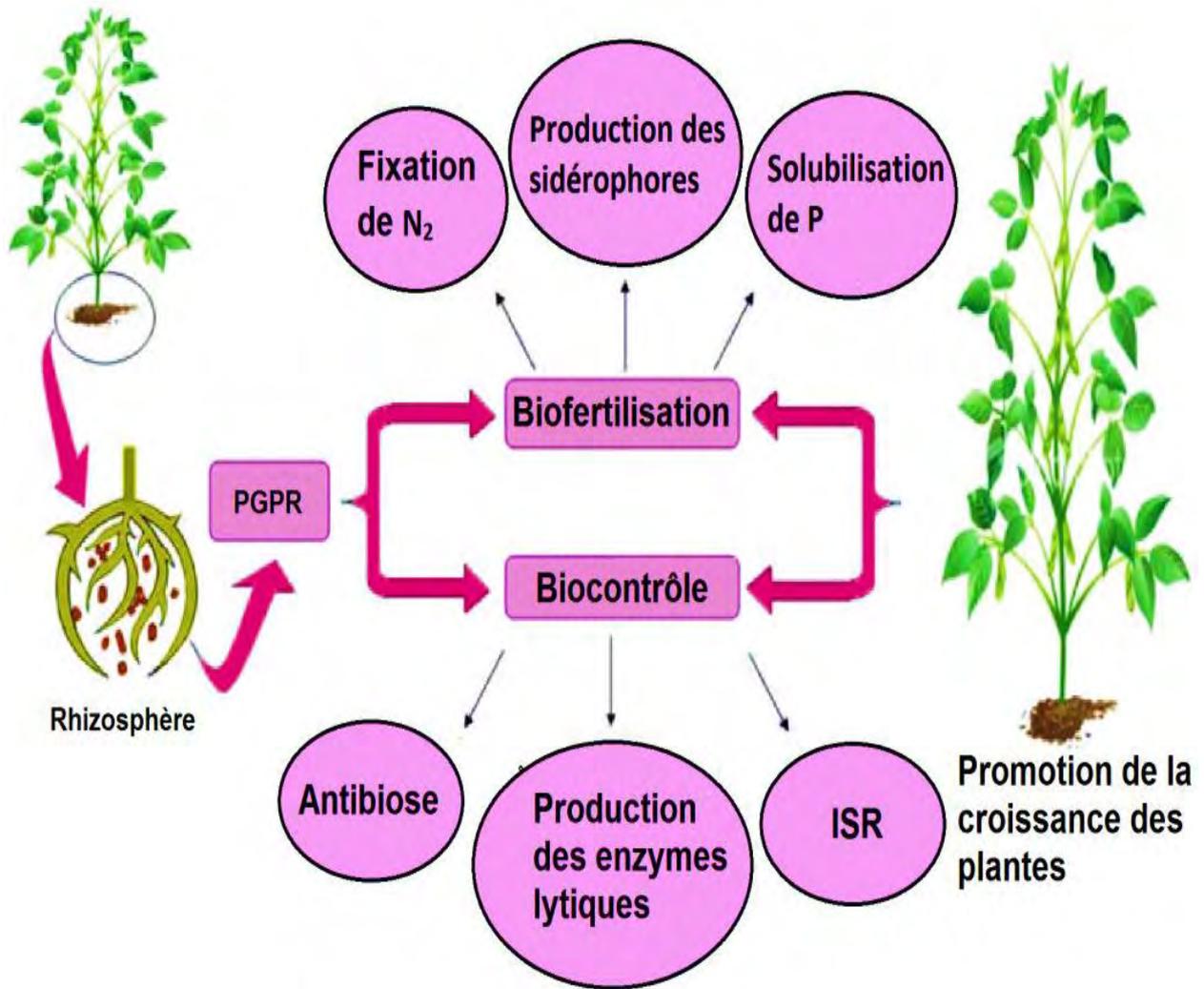


Figure 5. Mécanismes connus pour la promotion de la croissance et la protection des plantes (Kumar *et al.*, 2011)

III. Les légumineuses partenaires des bactéries

III. 1. Généralité sur les légumineuses

Les légumineuses présentent une importance capitale car leurs cultures fournissent majoritairement des glucides et des protéines pour l'alimentation des hommes et des animaux. Elles fournissent la plus grande source mondiale de protéines végétales et sont une bonne source de fibres alimentaires solubles. Ces plantes fournissent de l'huile végétale transformée pour la consommation humaine mais également pour la production durable de biodiesel. Économiquement, cette famille est considérée comme la deuxième plus importante culture vivrière et fourragère après les céréales dans le monde, basée sur la superficie récoltée et la production totale. Les légumineuses contiennent également de nombreux composés secondaires qui peuvent conférer une protection contre certaines maladies et fournir des sources potentielles de produits pharmaceutiques (Schneider & Huyghe, 2015). Sur le plan agronomique, les légumineuses participent à l'augmentation de la diversité fonctionnelle des agroécosystèmes, ce qui est favorable à la biodiversité des paysages et territoires agricoles. Elles contribuent ainsi à plusieurs titres à l'équilibre des systèmes agro-écologiques. Elles sont des espèces végétales très adaptées aux sols pauvres et soumis à des conditions d'extrême aridité. Par leurs caractères symbiotiques, elles contribuent activement à l'amélioration de la fertilité des sols, ce qui fait d'elles des candidates potentiellement intéressantes pour la réhabilitation et le maintien de la fertilité des écosystèmes sahéliens. Elles constituent la troisième plus grande famille d'angiospermes par ordre d'importance après les *Asteraceae* et les *Orchidaceae*. Selon la nouvelle classification, les légumineuses présentent plus de 19 500 espèces réparties dans 770 genres (Lewis *et al.*, 2005, 2013 ; LPWG, 2013), et 6 sous-familles (LPWG, 2017) : les *Caesalpinioideae*, les *Cercidoideae*, les *Detarioideae*, les *Dialioideae*, les *Duparquetioideae* et les *Papilionoideae*.

Les *Caesalpinioideae* forment un groupe très divers de 148 genres et d'environ 4 400 espèces d'arbres et d'arbustes des régions intertropicales, parmi lesquels on peut citer les genres *Acacias*, *Vachellia*, *Erythrophleum* et *Faidherbia*. Les *Detarioideae* comptent 84 genres pour 760 espèces. Les *Duparquetioideae* ne comptent qu'un seul genre et une seule espèce (*Duparquetia orchidacea* Baill.). Les *Dialioideae* se distinguent par 17 genres et 85 espèces. Les *Papilionoideae*, de loin les plus nombreuses avec 503 genres et 14 000 espèces réparties sur tout le globe. Cette sous famille constitue l'essentiel des plantes herbacées des régions tropicales et tempérées. Enfin, les *Cercidoideae* regroupent 335 espèces réparties dans 12

genres, dont le genre *Piliostigma*. Sur la totalité des légumineuses recensées, 25% seulement ont été étudiées du point de vue de leur nodulation.

III. 2. Sous famille des *Cercidoideae*

III. 2 1. *Piliostigma reticulatum*

III. 2 1 1. Description botanique de *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst

Piliostigma reticulatum (De Candolle.) Hochstetter est une *Cercidoideae* (LPWG, 2017) de la tribu des *Cercideae* et du genre *Piliostigma*. L'espèce doit son nom spécifique au réseau très détaillé de nervilles réticulées visible sous le limbe (Baumer, 1995). Elle a été décrite sous plusieurs noms : *Bauhinia reticulata* DC., *Bauhinia glabra* A. Chev., *Bauhinia glauca* A. Chev., *Bauhinia benzoin* Kotsch., *Elayuna biloba* Raf etc. La plante est généralement un arbuste (4 à 7 m) mais peut être également un arbre de 8 à 9 m (Arbonnier, 2009). Le fût rarement droit, est souvent buissonnant par rejets de souche (Planche 1). L'écorce est profondément fissurée à crevasse grise parfois brune. Les rameaux sont gris et glabres. Les feuilles alternes, persistantes, distiques, glabres et coriaces fortement bilobées, sont longues de 6 à 12 cm et larges de 4 à 8 cm. Le limbe à base cordée glauque de couleur vert grisâtre (Arbonnier, 2009). Les inflorescences sont des panicules axillaires ou terminales, courtement pubescentes. C'est une espèce dioïque (Arbonnier, 2009). Le fruit est une gousse ligneuse, plate, glabre, parfois tordue et fendillée, brun foncé, indéhiscence et persistante de 15 à 25 cm de long sur 5 cm de large (Arbonnier, 2009). La floraison a lieu après la feuillaison. Les feuilles sont souvent persistantes lorsque l'arbre est situé dans des lieux humides.



Planche 1. Touffe de *Piliostigma reticulatum*

III.2 1 2. *Piliostigma reticulatum* et les propriétés du sol

Outre son importance socio-économique que nous nous sommes gardés de relater dans ce chapitre, *P. reticulatum* joue un rôle important dans les propriétés biologiques et physico-chimiques du sol.

L'arbuste rejette comme une culture de repousse après la saison des pluies en produisant beaucoup de biomasse (Diack *et al.*, 2000). La litière qui tombe chaque année, combinée à la biomasse, constitue une source de reconstitution de la matière organique dans le sol et contribue ainsi à l'amélioration de la qualité du sol. Ce qui fait dire à l'auteur que l'arbuste présente de réelles potentialités de reconstitution du stock de matière organique dans le sol. D'ailleurs, cette matière organique est utilisée comme mulch dans les exploitations agricoles (Lufafa *et al.*, 2008). Ainsi, *P. reticulatum* contribue à améliorer le carbone organique total, la teneur totale en azote et le phosphore du sol (Yelemou *et al.*, 2013 ; Félix *et al.*, 2018). Lufafa *et al.*, (2008) soutiennent que *P. reticulatum* améliore le sol mieux que le fumier. L'Arbuste, dans les milieux arides et semi-arides, crée une hétérogénéité spatiale des propriétés chimiques du sol, par une forte activité enzymatique au niveau de sa rhizosphère (Diedhiou *et al.*, 2009). La zone est ainsi caractérisée par une meilleure disponibilité en eau et une activité biologique plus intense (Kizito *et al.*, 2006). Ce qui suppose que les microorganismes du sol telles que les bactéries jouent un rôle important dans la disponibilité des nutriments (Zak *et al.*, 1990). De plus, une redistribution hydraulique, qui est un phénomène passif dû à la différence de potentiel hydrique entre les couches profondes et superficielles du sol (Richards & Caldwell, 1987 ; Caldwell *et al.*, 1998), au niveau de la rhizosphère de *P. reticulatum* a été montré par Kizito *et al.*, (2012). Ce phénomène se produit la nuit quand les stomates sont fermés et la transpiration, quasi nulle. La redistribution hydraulique assure un approvisionnement continu en eau qui maintient la diversité et l'activité microbienne sous le houppier de l'arbuste (Diédhiou *et al.*, 2009, 2013) et conduit les processus biogéochimiques (Dossa *et al.*, 2009). Diédhiou & Diédhiou, (2010) ont montré cet effet bénéfique de la redistribution hydraulique de *P. reticulatum* sur la croissance de plants de manguiers. Ici, de jeunes plants de manguiers ont été plantés à l'intérieur des touffes de *P. reticulatum* (Planche 2) et dix mètres en dehors des touffes sur des zones dénudées. Les manguiers plantés en dehors des touffes ont bénéficié d'une irrigation abondante durant le premier mois après leur plantation. Au bout de 7 mois, tous les plants situés à l'intérieur des touffes ont survécu et présentent une bonne croissance tandis que ceux plantés en dehors des touffes sont tous morts. Grâce à ces phénomènes positifs observés sous son houppier, *P. reticulatum* est caractérisé comme «îlots de fertilité» pour les cultures comme l'arachide

(*Arachis hypogaea*), le mil (*Pennisetum glaucum*) etc. Cet effet est maintenant appelé «îlots de ressources» (Kizito *et al.*, 2012). Cela favorise la croissance des cultures et l'amélioration de la qualité du sol (Dossa *et al.*, 2009, 2013). Et aussi une diversification des communautés microbiennes du sol qui sont plus actives quand l'arbuste est associé au mil (Diakhaté *et al.*, 2016a) (Planche 3) entraînant un plus grand potentiel de décomposition et de minéralisation des nutriments. En effet, l'utilisation des feuilles, des rameaux ont permis de montrer que l'arbuste pourrait être assimilé comme engrais verts pour relever le statut organique des sols. Iyamuremye *et al.*, (2000) ont montré que les feuilles de *P. reticulatum* contiennent de plus fortes quantités d'azote et d'hémicellulose que de lignine. Des amendements à base de *P. reticulatum* sont susceptibles d'améliorer les propriétés physiques du sol. Par exemple des rameaux de bois fragmentés ont été utilisés (Diack, 1998 ; Yélémou *et al.*, 2013) pour, restaurer les terres dégradées et améliorer les rendements des cultures du mil et du niébé (Ba *et al.*, 2014 ; Ouedrago *et al.*, 2014), protéger le sol contre l'érosion (Zerbo, 2011), et améliorer la capacité des sols à répondre aux stress salins (Sall *et al.*, 2015).



Planche 2. *P. reticulatum* en association avec du manguier (Crédit photo : Diédhiou et Diédhiou)



Planche 3. *P. reticulatum* en association avec du mil (Crédit photo : S. Diakhaté)

III. 3. La sous famille des *Caesalpinioideae*

III. 3 1. *Erythrophleum guineense* (ou *Erythrophleum suaveolens*) (J. Berhaut)

Erythrophleum est un genre pantropical boisé qui comprend environ 10 espèces, dont 4 rencontrés en Afrique continentale (*E. ivorense*, *E. guineense*, *E. africanum*, *E. lasianthum*) 1 à Madagascar (*E. couminga*), 3 en Asie (*E. fordii*, *E. succirubrum*, *E. densiflorum*), et 1 en Australie (*E. chlorostachys*).

III. 3 1 1. Description botanique du genre *Erythrophleum*

Erythrophleum est un arbre (Planche 4) assez grand, haut de 15 à 35 m et plus même parfois. Le tronc pouvant atteindre 90 cm de diamètre. Les feuilles sont bipennées alternes à foliolules alternes et pétiolulées. Un rachis long portant 2 à 4 paires de pinnules longues. Pinnules portant 5 à 7 paires de folioles alternes. Une glande est située à la base de chaque paire de pinnules sur le rachis principal. Les foliolules sont sub-arrondies et asymétriques à la base largement arrondie du côté supérieur, sommet en coin ou en courte pointe obtuse et émarginée. Le limbe à nervure médiane généralement pubescente sur la face externe est verdâtre et mat à l'état sec. Les pétiolules sont pubescents ainsi que tout le rachis, mais pouvant devenir glabres. Les stipules sont petites et rapidement caduques. Les bractées sont très petites et caduques avant ou pendant l'ouverture de la fleur. Les fleurs ont un calice campanulé à 5 lobes soudés à la base ou presque libres. Les fleurs sont de couleur blanche, en épis longs de 5 à 12 cm et les épis sont disposés en grande panicule ramifiée. Les pétales au nombre de (5) sont pubescents extérieurement et parfois seulement sur les bords et sur la nervure médiane de leur face externe. Les étamines au nombre de (10) sont alternativement longues et courtes et ont des filets glabres ou poilus. Le fruit est une gousse ligneuse plate, d'un rouge noirâtre, souvent légèrement falquée, contenant 6 à 10 graines oblongues, aplaties, brun rougeâtre, reliées à la gousse par un funicule long. Les graines présentent un endosperme disposé transversalement dans la gousse. Les gousses sont oblongues ou oblongues-elliptiques, ligneuses ou coriaces et déhiscentes.



Planche 4. *Erythrophleum guineense* (Crédit photo N. Bourland)

III. 3 1 2. Répartition géographique et intérêt de l'espèce *E. guineense*

L'espèce *E. guineense* ou Tali (en français) est très répandu en Afrique, étant trouvée du Sénégal au Soudan et au Kenya et le sud de Mozambique et du Zimbabwe. Par conséquent, *E. guineense* est présent dans les trois sous-centres d'endémisme de la région phytogéographique guinéo-congolaise et se produit également dans les zones péri-forestières adjacentes. Il occupe une large gamme de climat se trouvant dans les forêts semi-persistantes. En Cameroun, *E. guineense* est présent en périphérie des zones de forêts claires qui sont souvent caractérisées par des sols argileux et riches en nutriments (Chidumayo *et al.*, 2010).

Sur le plan économique, il est exploité à large échelle pour son bois d'œuvre. Par exemple, au Cameroun *E. guineense* est la deuxième essence d'exportation en grume (125 000 m³ par an) et la 5^e essence d'exportation en sciage (18 000 m³ par an), (OIBT, 2012). Sur le plan médicinal, *E. guineense* est connu pour ses propriétés thérapeutiques. Des extraits de l'écorce, du bois et des feuilles sont souvent utilisés dans la pharmacopée traditionnelle par les populations locales. L'écorce est indiquée dans le traitement des convulsions, des douleurs, des problèmes cardiaques ainsi que des œdèmes causés par les nématodes. Des décoctions et des infusions sont également employées pour leurs propriétés émétiques, laxatives et antirhumatismales (Burkill, 1995). Cependant, les extraits contiennent un agent toxique, l'érythropléine qui peut s'avérer très dangereux par défaut de dosage adéquat (Burkill, 1995). C'est pourquoi, l'écorce sous forme de poudre est utilisée pour protéger les céréales contre les ravageurs et les feuilles séchées pour repousser ou tuer les insectes des greniers (Louppe *et al.*, 2012) et le bétail errant (Palmer *et al.*, 1972 ; Burkill, 1995 ; Hawthorne, 1995 ; Arbonnier, 2009). Aussi le broyat d'écorce est souvent utilisé comme poison d'ordalie (Aubréville, 1959 ; Palmer *et al.*, 1972 ; Hawthorne, 1995).

Par ailleurs, *E. guineense* se régénère de façon naturelle dans les champs, néanmoins, une croissance en pépinière est possible malgré la rigidité de la membrane des graines. Au laboratoire, après la levée de la dormance et la germination, l'inoculation par des *Bradyrhizobia* a un effet positif sur la croissance des plantules (Diabate *et al.*, 2005). Au Cameroun par exemple, il a été observé des taux de reprises de plants de *E. guineense* à 100%, deux mois après leur plantation dans des trouées d'abattage (Kouadio, 2009). *E. guineense* est utilisé comme arbre d'ornement et d'alignement, son utilisation en agroforesterie a été encouragée par la fixation d'azote. Toutefois, sa rentabilité doit encore être démontrée (Doucet, 2003).

III. 3 2. *Acacia bivenosa*

Les espèces d'*Acacia*, comme les autres légumineuses ligneuses jouent un rôle socioéconomique important. Elles sont largement utilisées dans les programmes de reboisement dans les régions soumises à un stress environnemental (Diouf *et al.*, 2007). L'espèce *Acacia bivenosa* est un arbuste ou buisson utilisé pour la stabilisation des dunes et pour contribuer efficacement à circonscrire l'érosion éolienne. *Acacia bivenosa* est une espèce symbiotique qui s'associe avec des rhizobiums à croissance rapide et lente. Il ne présente pas une spécificité concernant la nodulation. Toutefois, il a été noté une spécificité concernant l'effectivité symbiotique. Néanmoins, il a un potentiel fixateur d'azote moléculaire (N₂) élevé et nettement supérieur à celui des autres *Acacias* (Dreyfus & Domergues, 1981).

III. 3 3. *Vachellia seyal*

C'est un arbuste ou buisson typique des savanes africaines, adapté à des températures élevées. Il supporte mieux l'engorgement du sol que les autres *Acacias*. Anciennement appelé *Acacia seyal* (LPWG, 2017), *vachellia seyal* peut s'installer sur divers types de sols, notamment des sols pierreux. C'est une espèce qui nodule et fixe N₂ à la fois avec des rhizobiums à croissance rapide et des rhizobiums à croissance lente (*Bradyrhizobium*) ; mais l'effectivité varie grandement suivant les souches (Dreyfus & Domergues, 1981). Des travaux ont montré que l'espèce s'associe préférentiellement avec les genres *Mésorhizobium* et *Ensifer* (Diouf *et al.*, 2007 ; Cordero *et al.*, 2016; Sankhla *et al.*, 2017).

III. 3 4. *Faidherbia albida*

C'est un arbre qui peut atteindre jusqu'à 35 m de haut, il est plastique vis-à-vis des sols. *Faidherbia albida* accepte aussi bien des sols squelettiques que des dunes sableuses parfaitement drainées ou des alluvions inondables. Cette plasticité est due à l'existence d'au moins deux écotypes différents : l'écotype A qui est phréatophyte et l'écotype B ripicole. *F albida* appartient au groupe des arbres qui n'ont pas de spécificité concernant la nodulation, il nodule à la fois avec des *Bradyrhizobium* et des *rhizobium* à croissance rapide (Odee *et al.*, 2002 ; Perrineau *et al.*, 2012 ; Sprent *et al.*, 2017). Toutefois, il présente une certaine préférence pour les *Bradyrhizobiums*. A noter que des expériences ont montré que le potentiel fixateur de N₂ est faible (Ndoye *et al.*, 1995).

III. 3 5. Justification de l'utilisation de quelques espèces de *Caesalpinioideae*

L'absence de nodules chez la plupart des *Cercidoideae* nous a conduits à penser qu'une association différente de celle symbiotique connue pourrait exister entre les bactéries du sol et les espèces de *Cercidoideae* notamment *P. reticulatum*. Ceci, d'autant plus que de nombreux travaux ont mis l'accent sur les aptitudes de *P. reticulatum* à améliorer les propriétés biologiques, physiques et chimiques des sols. Donc l'utilisation de certains genres appartenant à la grande sous famille des *Caesalpinioideae* (*V. seyal*, *A. bivenosa*, *F. albida*, et *E. guineense*) a été encouragée par le fait que ces genres sont très proches de l'espèce *P. reticulatum*. De plus dans la classification traditionnelle, *P. reticulatum* et *E. guineense* partageaient la même sous famille qui était celle des *Caesalpinioideae*. Par ailleurs, cette proximité phylogénétique et structurale et leur aptitude à s'associer avec des bactéries majoritairement des rhizobiums à croissance rapide et lente ont motivé l'utilisation de ces espèces comme plantes pièges dans le deuxième chapitre et comme témoin positif dans le dernier chapitre.

IV. Approches utilisées dans l'étude de la diversité des communautés bactériennes

Différentes approches ont été utilisées pour étudier la diversité des communautés bactériennes des environnements complexes tels que le sol, ainsi que le rôle de ces communautés dans les écosystèmes. Les résultats de ces approches, qui se basent pour la plupart sur l'étude de l'ADN bactérien et leurs impacts, vont être liés aux techniques utilisées. Pour les besoins de notre étude une approche culturale et des approches moléculaires (RFLP, DGGE, RISA) ont été réalisées et complétées par une analyse plus exhaustive des communautés bactériennes par le séquençage Illumina Miseq.

IV. 1. Isolement par piégeage des bactéries

Il est possible d'isoler des communautés bactériennes présentes dans un milieu complexe en passant par les méthodes de culture telles que le piégeage. Le piégeage est une approche microbiologique qui consiste à isoler les bactéries rhizosphériques à partir d'échantillons de sol en utilisant des plantes pièges. Il a pour principal avantage d'obtenir des souches à partir des nodules et de les étudier en culture pure en se basant sur des critères morphologiques, biochimiques, physiologiques et symbiotiques (Graham *et al.*, 1991). Les critères morphologiques se basent principalement sur les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration Gram etc.), de la colonie (couleur, dimension, forme). Les critères biochimiques évaluent la présence et/ ou l'activité de différentes

enzymes impliquées dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés. Les critères physiologiques s'intéressent plutôt au taux de croissance de la bactérie sur milieu YEM (Vincent, 1970), la résistance aux antibiotiques, etc. Les critères symbiotiques se déterminent par la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée.

Étant donné que 99% des bactéries de l'environnement ne sont pas cultivables dans les conditions du laboratoire, donc seule une faible proportion des bactéries peuvent être obtenues par des approches utilisant des étapes de piégeage et d'isolement (Akondi *et al.*, 2013). En dépit de leurs limites quant à l'étude exhaustive de la diversité d'un environnement donné, ces méthodes de cultures sont jusqu'à ce jour des techniques incontournables pour l'obtention de souches pures.

IV. 2. Techniques d'empreintes moléculaires

ADN ribosomique 16S (ADNr 16S) a été choisi pour la plupart des études de diversité comme un marqueur phylogénétique du fait de son universalité liée à sa structure mosaïque contenant des régions conservées, variables et hypervariables, et de son abondance dans les cellules (Woese, 1987). L'amplification des zones conservées cible toutes les bactéries et l'amplification des zones variables cible un niveau taxonomique précis. Différentes techniques telles que : «Restriction Fragment Length Polymorphism» (RFLP), «Denaturing Gradient Gel Electrophoresis» (DGGE) et «Ribosomal Intergenic Spacer Analysis» (RISA), ont été utilisées pour étudier les structures des communautés bactériennes du sol par l'analyse des gènes codant l'ADN 16S ribosomique ou l'intergène entre 16S et 23S de l'ADN ribosomique.

IV. 2 1. «Restriction Fragment Length Polymorphism» (RFLP)

La RFLP ou «Restriction Fragment Length Polymorphism» est une approche qui permet de comparer le polymorphisme des fragments de restriction d'une région choisie du génome préalablement amplifiée par PCR. Elle repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction afin de révéler la variabilité de longueur de fragments d'ADN à partir d'amplifiats de même taille. En effet, les enzymes de restrictions sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement un site de restriction des séquences de 4, 6, 8 paires de bases et coupent la chaîne d'ADN à chaque fois qu'elles identifient cette séquence spécifique. L'ADN se trouve ainsi fragmenter en plusieurs morceaux de différentes longueurs séparées en fonction de leurs tailles par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide non dénaturant. La spécificité d'une enzyme de restriction est telle qu'une variation d'un nucléotide dans la séquence de restriction empêche

le clivage du site par l'enzyme. Il s'observera donc un polymorphisme de longueur de fragment en fonction de la présence ou de l'absence d'un site de restriction. L'analyse des profils de restriction des ADN digérés par des enzymes endonucléasiques permet de déterminer les relations génétiques des différents isolats. Cependant, la technique RFLP nécessite une grande quantité de matériel biologique.

IV. 2 2. «Denaturing Gradient Gel Electrophoresis» (DGGE)

La DGGE est une technique d'empreinte moléculaire souvent utilisée pour observer le comportement des communautés microbiennes face aux variations environnementales (Heuer *et al.*, 2001). Elle permet d'évaluer et de comparer la structure des communautés microbiennes sur la base du génotype. Elle nécessite l'amplification préalable de gènes spécifiques par PCR. Utilisée en première fois dans le domaine médical pour la recherche de mutations génétiques (Borresen *et al.*, 1988), la technique de DGGE s'utilise maintenant dans divers domaines scientifiques tels que l'écologie microbienne pour caractériser et comparer la structure des communautés microbiennes d'un environnement donné. Elle consiste à séparer des fragments d'ADN de taille identique et les fragments sont soumis à une électrophorèse contenant un gradient d'agent dénaturant (urée, formamide). Ce gradient va entraîner la dénaturation progressive de l'ADN lors de la migration en fonction de leur richesse en Guanine et Cytosine (GC). Pour une même teneur en agent dénaturant, un fragment riche en GC se dénaturera moins vite qu'un fragment riche en liaisons Adénosine et Tyrosine (AT) et migrera donc plus loin sur le gel. La dénaturation complète des deux brins de l'amplifiât est empêchée par la présence du «GC-clamp», qui est une séquence constituée d'une trentaine de bases G et C ajoutée à l'extrémité d'une des deux amorces. D'un point de vue théorique, chaque bande visualisée sur le gel correspond à une espèce bactérienne. La DGGE permet en effet de séparer les fragments d'ADN ne se différenciant que par une seule paire de bases (Casamayor *et al.*, 2000).

IV. 2 3. «Ribosomal Intergenic Spacer Analysis» (RISA)

La RISA est une technique d'empreinte moléculaire simple et efficace pour l'analyse comparative des structures des communautés microbiennes (Ramette, 2009). La technique est basée sur l'amplification par PCR de la région IGS «intergenic spacer» située entre les sous unités ribosomales 16S et 23S de l'ADNr. Cette région très variable de l'ADN peut ressortir des différences entre des espèces très proches. Les produits générés, de différentes tailles sont alors séparés sur gel de polyacrylamide sous conditions dénaturantes (Fisher & Triplett, 1999).

La RISA est indépendante de la culture *in vitro*, hautement reproductible, robuste et permet d'étudier rapidement la structure des communautés bactériennes. Mais elle comporte également des biais comme toutes les méthodes basées sur une étape d'amplification (von Wintzingerode *et al.*, 1997), elle sous-estime la diversité, car seules les espèces numériquement dominantes sont détectées.

En somme, les techniques d'empreintes moléculaires permettent, par migration électrophorétique, d'obtenir une image synthétique de la structure génétique des communautés microbiennes afin d'étudier leur variation. Cependant, il faut noter leur faible niveau de sensibilité favorisant la mise en exergue des bactéries les plus représentées. De plus, elles ne renseignent pas généralement sur la richesse ou l'abondance relative des OTUs (unité taxonomique opérationnelle) et sont parfois inefficaces pour fournir l'identité taxonomique des bactéries impliquées (DeSantis *et al.*, 2007). Ce qui rend difficile de grandes études comparatives telles que le suivi environnemental (Dunbar *et al.*, 2002).

IV. 3. Les nouvelles techniques de séquençage ou NGS (next-generation sequencing)

Les technologies NGS, apparues depuis 2005 constituent un ensemble de méthodes permettant le séquençage de centaines de milliers de fragments simultanément, à faible coût et en quelques heures. Elles permettent de s'affranchir des étapes de clonage et de constitution de banques génomiques. Les outils de séquençage de nouvelle génération NGS ont impacté positivement les méthodes d'analyse basées sur l'ADN et l'ARN, et ont ainsi révolutionné le domaine de la microbiologie moléculaire. Ces dernières décennies ont vu le développement d'approches systématiques dont la métagénomique, la métatranscriptomique, la métaprotéomique et la métabolomique pour analyser le contenu en ADN, ARN, protéines et métabolites de microorganismes présents dans un écosystème donné. Ces analyses sont surtout basées sur l'utilisation de marqueurs taxonomiques conservés. A l'heure actuelle il existe différents types de technologies NGS qui se démarquent les unes des autres par les chimies qui les constituent : le pyroséquençage (454/Roche), le séquençage avec des terminateurs réversibles (Illumina/Solexa), le séquençage par ligation (SOLiD), le séquençage par ions semi-conducteurs (Ion Torrent) et enfin le séquençage en temps réel de molécules uniques (PacBio) (Metzker, 2010 ; Champomier-Vergès & Zagorec, 2015). Le choix de la technologie et de la méthode dépend de l'objectif de l'étude et de la complexité de la matrice à étudier. Ces différentes technologies se décomposent toutes en 4 grandes étapes : la préparation d'une banque d'ADN simple brin associé à des adaptateurs, amplification des ADNs et séquençage,

prise d'image pour déterminer les nucléotides correspondant, puis l'analyse des données. Cette dernière est faite en utilisant des logiciels de bioinformatique (Mothur, Qiime, MEGAN, CLC genomics...) qui permettent le traitement, l'alignement, l'assemblage et la comparaison statistique des séquences ADN/ARN. Des bases de données sont ensuite utilisées pour l'attribution des taxons.

IV. 3 1. La métagénomique

La métagénomique est une discipline qui se situe à l'interface de la microbiologie, la génomique et l'écologie (Ederer, 2011). Elle utilise le contenu génétique des échantillons issus des environnements complexes prélevés dans la nature. La métagénomique est une approche basée sur l'isolation directe de l'intégralité des acides nucléiques, et ceci sans aucun isolement ou culture de microorganismes au préalable (Simon & Daniel, 2011). Cette approche, via le séquençage permet une description génomique du contenu de l'échantillon, mais aussi un aperçu du potentiel fonctionnel d'un environnement. Le préfixe «méta» qui veut dire littéralement en grec «au-delà», induit une distinction majeure entre les termes «métagénomique» et «génomique» qui est l'étude de l'ADN génomique issu d'un seul microorganisme ou d'une cellule unique (Gilbert & Dupont, 2011).

IV. 3 1 1. Contexte et origine de la métagénomique

Les microbiologistes ont longtemps cru que les organismes microbiens pouvaient être classifiés, si et seulement si, ils étaient cultivés auparavant (Society of American Bacteriologists, 1923). Cependant, dans les années 1980, les scientifiques se sont rendus compte que les microbes étaient beaucoup plus ubiquitaires, diversifiés, et nombreux que ce qu'ils pensaient (Ederer, 2011). Les techniques classiques de culture utilisées en microbiologie ont permis jusqu'à maintenant de caractériser seulement environ 1% de la diversité microbienne planétaire (Rappe & Giovannoni, 2003). Des estimations calculées par Whitman *et al.*, (1998) indiquent que la terre est l'habitat d'environ 5×10^{30} procaryotes (bactéries et archées) avec plus de 10^7 espèces de bactéries différentes. Ces micro-organismes sont présentes dans tous les environnements planétaires et sont capables de coloniser les habitats même les plus extrêmes allant des sources hydrothermales des profondeurs océaniques aux tapis microbiens polaires (Whitman *et al.*, 1998).

IV. 3 1 2. Métagénomique bactérienne

La métagénomique apporte une meilleure compréhension de la biodiversité bactérienne. Une grande partie de cette diversité n'est encore ni identifiée ni caractérisée car elle est récalcitrante à la culture *in vitro* sur des milieux de culture qui ont pu leur être proposés (Rappe & Giovannoni, 2003). L'avènement de la métagénomique dans les années 2000 a restreint l'étude des bactéries à leur ADN directement extrait de l'environnement (McHardy & Rigoutsos, 2007). Ainsi, afin d'étudier une communauté bactérienne dans son ensemble, il est aujourd'hui possible de séquencer l'ADN de toutes les bactéries présentes dans un milieu donné (sol, eau, tube digestif de l'homme et des animaux, échantillons cliniques...).

IV. 3 1 3. La technologie Illumina/Solexa

Cette technologie a été créée à l'origine par Solexa (Bentley, 2006), une compagnie qui fut rachetée par Illumina en 2007. C'est une technique basée sur le séquençage par synthèse et sa spécificité repose sur une amplification en pont «bridge PCR» des fragments séquencés. Les différentes étapes (a, b, c, d, et e) de cette technique sont illustrées par la Figure (6). Les extrémités des fragments d'ADN génomique adénylés ont des adaptateurs spécifiques (a). Afin de subir une amplification «par pont» (b), pour faciliter la synthèse du brin complémentaire de chaque fragment à l'aide d'une polymérase. Après dénaturation au formamide, le nouveau brin va s'hybrider à une amorce anti-sens également rattachée à la surface de la plaque pour former un pont et servir à son tour de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire (c). Des colonies d'environ 1000 amplicons ont été créées après un certain nombre de cycles successifs d'extension et de dénaturation pour chaque fragment de la librairie de départ. Le brin anti-sens de chaque fragment amplifié est clivé puis éliminé. Le brin restant va s'hybrider à une amorce de séquençage (d). Après excitation au laser, la fluorescence émise par un nucléotide incorporé est captée et analysée pour toutes les colonies de fragments amplifiés sur la plaque, puis, après clivage des terminateurs de chaîne, un nouveau cycle d'ajout des nucléotides peut commencer (e). Ces cycles de séquençage se répètent permettant ainsi de déduire la séquence de chacun de ces fragments une base à la fois (e).

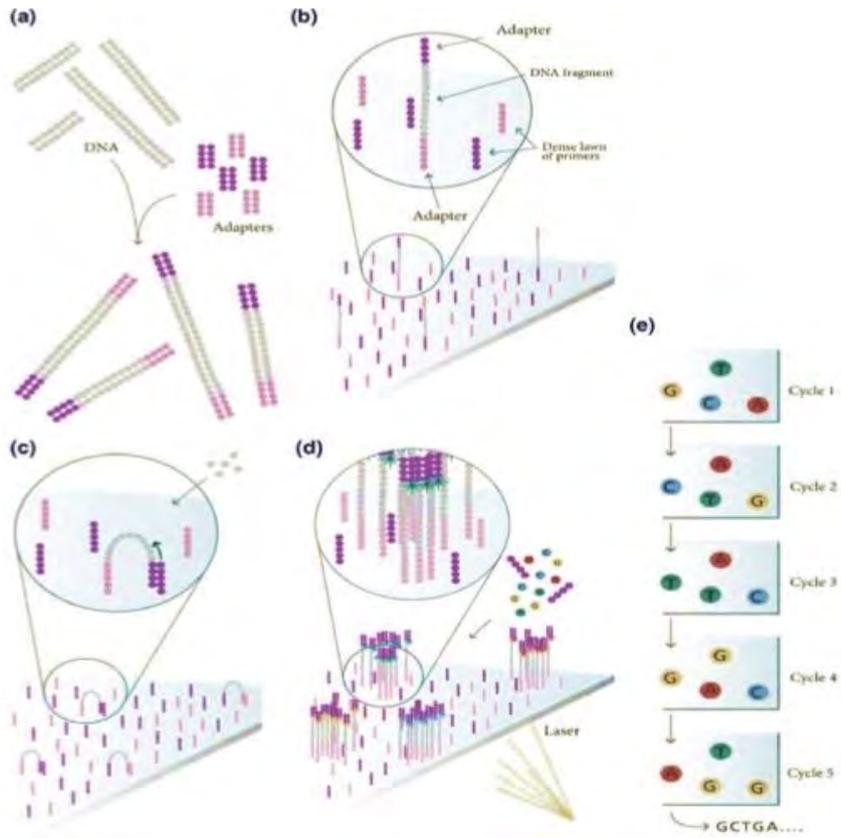


Figure 6. Différentes étapes de la technologie Illumina MiSeq

**CHAPITRE II. DIVERSITÉ DES *RHIZOBIA* ET PGPR DES
SOLS SOUS INFLUENCE DE *PILIOSTIGMA RETICULATUM*
(DC.) HOCHST ET LEUR IMPACT SUR LA CROISSANCE DE
L'ARBUSTE**

Chapitre II. Diversité des *Rhizobia* et PGPR des sols sous influence de *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst et leur impact sur la croissance de l'arbuste

I. Introduction

Le déficit des sols en azote minéral entraîne une diminution considérable des rendements de la production agricole. Cette situation est le plus souvent corrigée par l'apport d'engrais azotés chimiques dont la production, le transport et l'épandage constituent un investissement coûteux, limitant ainsi leur utilisation dans les pays en voie de développement où les revenus des paysans sont très faibles. De plus, l'application massive de ces engrais azotés chimiques provoque par lessivage la pollution des nappes phréatiques qui se retrouvent avec des concentrations très élevées en nitrates, souvent nocifs pour la santé humaine. Donc, l'utilisation des légumineuses serait l'une des solutions durables et les plus prometteuses pour remplacer l'application d'engrais azotés chimiques et lutter contre la dégradation continue des écosystèmes agricoles et forestiers.

Les légumineuses regroupent des espèces végétales très adaptées aux sols pauvres et soumis à des conditions d'extrême aridité. Par leur caractère symbiotique, les légumineuses contribuent activement à la fertilité des sols d'où leur rôle dans la réhabilitation et le maintien de la fertilité des écosystèmes sahéliens. C'est l'une des familles les plus diversifiées du groupe des plantes supérieures. Elle se caractérise généralement par leur aptitude à établir une symbiose avec les bactéries du sol. Cette spécificité confère aux légumineuses une autonomie vis-à-vis de la disponibilité en azote du sol et de l'apport d'engrais azotés, et un rôle clé dans les flux azotés des systèmes de production végétale. Ainsi, la rhizosphère des légumineuses constitue un environnement écologique dynamique où les bactéries et les plantes interagissent pour l'exploitation des nutriments du sol présent en quantité limitée (Gholami *et al.*, 2012). C'est également un environnement caractérisé par un volume très élevé de substances racinaires favorisant une grande population bactérienne (Miransari, 2011). Cette population est habituellement distribuée à une distance de 50 μm des racines de la plante, dont une concentration de plus de 10^9 à 10^{12} microorganismes par gramme de sol niche dans les 10 premiers μm (Miransari, 2011). La microflore du sol est composée de différents types de bactéries tels plusieurs genres bactériens fixateurs d'azote qui sont soit symbiotiques ou libres. Ceux-ci peuvent jouer un rôle de stimulation de croissance par l'apport d'éléments nutritifs et de protection des pathogènes environnants (Amarger, 2002).

P. reticulatum (DC.) Hochst est un arbuste indigène appartenant à la grande famille des légumineuses, comme toutes les espèces de la sous famille des *Cercidoideae*, il ne forme pas de nodules (LPWG, 2017) mais décrit comme un arbuste avec des intérêts particuliers en agronomie car utilisé par les paysans comme indicateur de la fertilité des sols (Yelemou, 2012). Donc, une exploitation efficace des bactéries de la zone d'influence de *P. reticulatum* constitue une étape très importante pour la sélection de souches bactériennes. La sélection et la caractérisation aussi bien phénotypique que génotypique des symbiotes s'avèrent nécessaire pour étudier la diversité des communautés bactériennes capables d'induire des effets positifs sur la croissance et la nutrition azotée de l'arbuste et indirectement sur le sol. Par conséquent, le piégeage comme décrit dans le chapitre I consistant à isoler les bactéries à partir d'échantillons de sol est une méthode incontournable pour l'obtention de souches pures. Etant donné que *P. reticulatum* ne forme pas de nodule, des légumineuses de larges spectres d'hôtes bactériens ont été utilisées. En effet, les genres (*Acacia*, *Faidherbia*, *Vachellia*), les espèces (*Macroptilium atropurpureum*, *Vigna unguiculata*) etc. sont très répandus par leur aptitude à s'associer avec plusieurs genres bactériens et sont souvent utilisés pour le piégeage des bactéries du sol tels les *Rhizobia* (deLajudie *et al.*, 1994 ; 1998 ; Nick *et al.*, 1999).

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle «les bactéries associées à la zone d'influence de *P. reticulatum* pourraient jouer un rôle très important sur la fertilité du sol et sur la croissance et le statut azoté de la plante ». Pour vérifier cette hypothèse les objectifs fixés ont été (Figure 7) :

- i. Isoler des bactéries (Rhizobia ou Endophytes) de la zone d'influence de *P. reticulatum* avec trois espèces (*Faidherbia albida*, *Acacia bivenosa* et *Vachellia. Seyal*) ;
- ii. évaluer l'impact de ces bactéries isolées sur la croissance des jeunes plants de *P. reticulatum*.

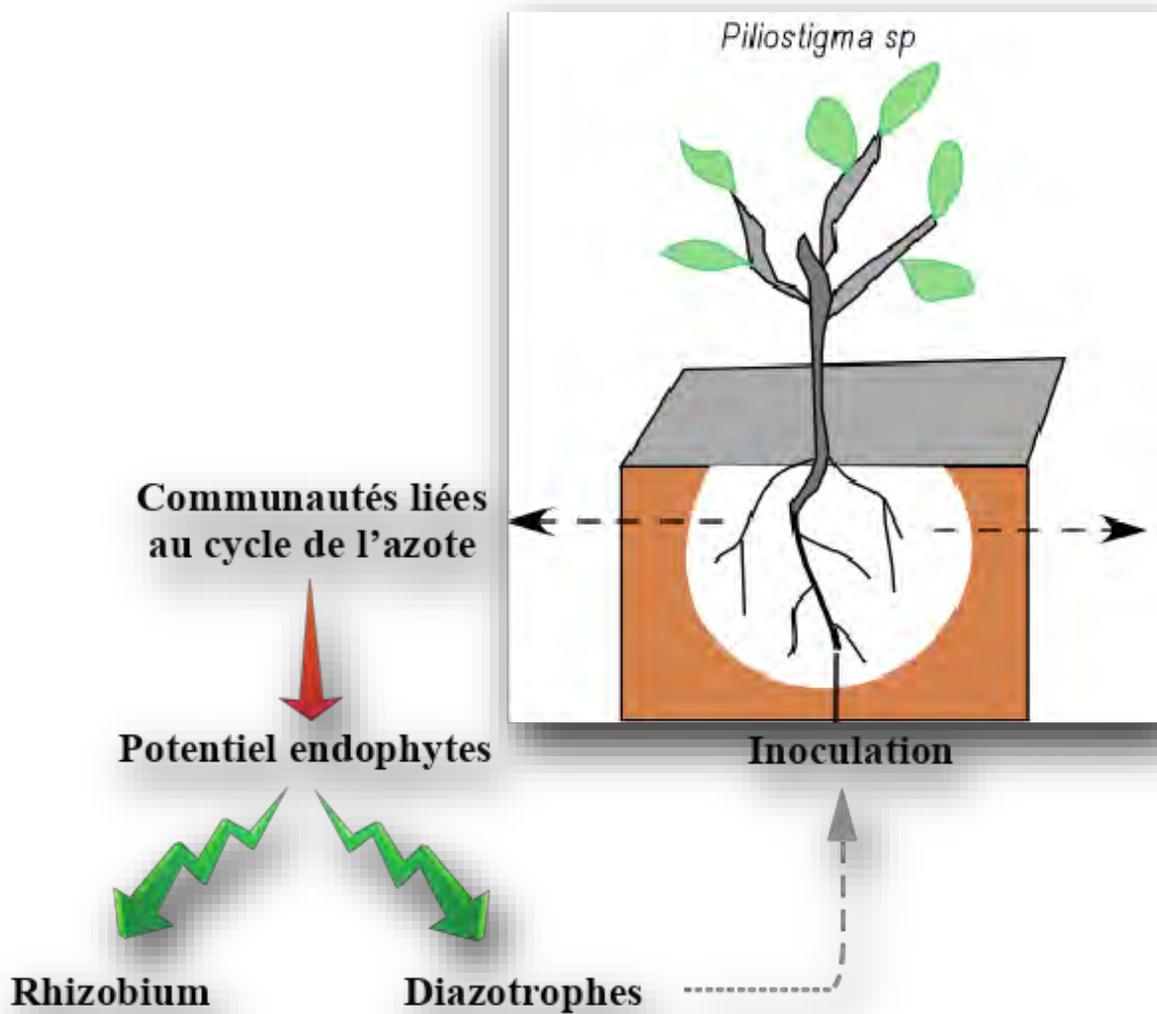


Figure 7. Approche pour étudier les *Rhizobia* et PGPR des sols sous influence de *P. reticulatum* et leur impact sur la croissance de l'arbuste

II. Matériel et méthodes

II. 1. Sites et échantillonnage du sol

L'étude a été menée sur deux sites (Figure 8) caractérisés par des conditions climatiques et environnementales contrastées. Le premier site, zone soudano sahélienne (ZSS) se trouve à l'ouest du Sénégal dans le village de Ndiassane situé dans le département de Tivaouane ($14^{\circ}55'N-16^{\circ}49'O$). La zone est caractérisée par des précipitations annuelles moyennes allant de 400 à 600 mm (ANSD / SRSD Thiès, 2013). Le deuxième site, zone soudano-guinéenne (ZSG), se situe au sud dans le terroir de Saré Yorobana à une vingtaine de kilomètres du département de Kolda dans l'arrondissement de Dioulacolon ($12^{\circ}50'N - 14^{\circ}50'O$). Cette zone est caractérisée par des précipitations annuelles plus abondantes et une moyenne atteignant entre 800 et 1200 mm (ANSD / SRSD Kolda, 2013). Dans chaque site, 3 pieds ont été échantillonnés et quatre (4) points de prélèvements sous le houppier de chaque arbre de *P. reticulatum* ont constitué un échantillon composite et.

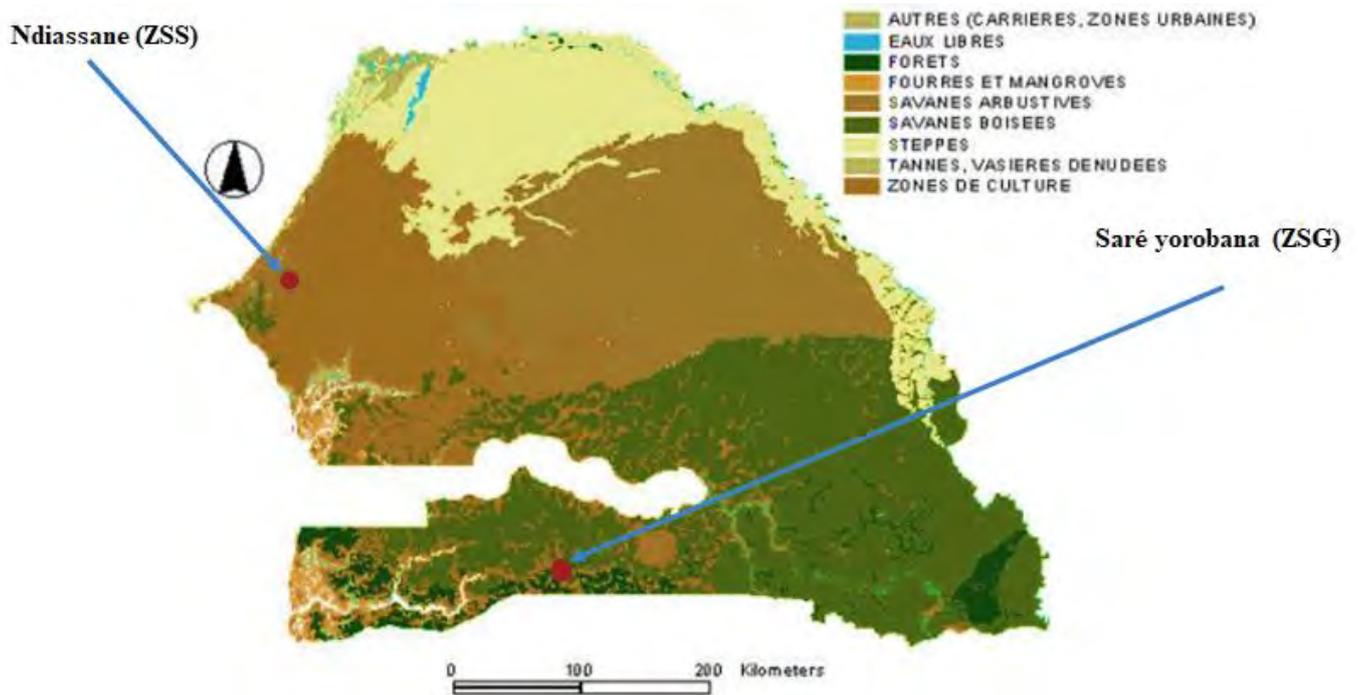


Figure 8. Localisation des deux sites de prélèvement des sols

II. 2. Caractérisation physico-chimique des sols

La caractérisation physico-chimique des échantillons de sols a été effectuée par des méthodes conventionnelles au Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) de l'IRD et au Laboratoire Mixte International Intensification Ecologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest (LMI IESOL, Campus IRD-ISRA de Bel-Air, Dakar).

II. 3. Piégeage des bactéries associées au sol de *P. reticulatum*

Le piégeage des bactéries des échantillons de sols prélevés dans les zones d'influence de *P. reticulatum* a été fait en utilisant trois espèces pièges (*Faidherbia (syn Acacia) albida*, *A. bivenosa* et *Vachellia (syn Acacia) seyal*). D'abord les graines ont été scarifiées dans de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré 95% (v/v) avec des temps d'immersion variables selon les espèces : *F. albida* (30 min), *A. bivenosa* (35 min), *V. seyal* (30 min). Ensuite, les graines ont été rincées abondamment et trempées respectivement pendant 5 h, 7 h et 2 h dans de l'eau stérile puis incubées dans l'étuve 28 °C dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (2% d'agar). Au bout de 48 h les graines pré-germées ont été repiquées stérilement dans des tubes Gibson (Gibson, 1963) contenant du milieu nutritif Jensen stérile sans azote (Vincent, 1970). Les plants dans les tubes ont été maintenus dans une chambre de croissance dans les conditions suivantes (photopériode 16 h jour /8 h nuit ; température de l'air 28 ± 1°C). Après une semaine, les jeunes plants ont été inoculés avec 5 ml de suspension de sol provenant des sites d'échantillonnage de *P. reticulatum* (10 g de sol dans 90 ml d'eau physiologique) (Figure 9). Pour chaque espèce quatre répétitions ont été effectuées et quatre plants non inoculés pour chaque espèce ont servi de témoin. Les plants ont été gardés en chambre de culture pendant 90 jrs.



Suspension sol prélevé sous *P. reticulatum*



Plantes pièges : *F. albida* ; *A. bivenova* ; *V. seyal*

Figure 9. Piégeage des bactéries du sol prélevé sous *P. reticulatum*

II. 4. Isolement et conservation des bactéries

Des nodules présents dans les racines des plantes ont été récoltés et le nombre a été répertorié pour chaque échantillon de sol de chaque espèce piège. Un isolement (Figure 10) des souches contenues dans les nodules récoltés a été fait dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Les nodules ont été désinfectés superficiellement dans une solution d'hypochlorite de sodium (5 min) puis d'alcool 96% v/v (5 min). Après une série de rinçages à l'eau distillée stérile, chaque nodule a été broyé stérilement dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant au moins 100 µl d'eau distillée stérile. Chaque broyat de nodule a été ensemencé, avec une anse en platine sur une boîte de Pétri contenant du milieu YMA (Vincent, 1970). La boîte ensemencée a été incubée à l'étuve à 28°C. Après 48 h à 72 h d'incubation, les colonies présentant un phénotype particulier ont été repiquées et purifiées plusieurs fois pour obtenir des isolats purs et qui ont été conservés à -80°C dans du glycérol ajusté à 60% (v/v) pour les besoins de caractérisations moléculaires.

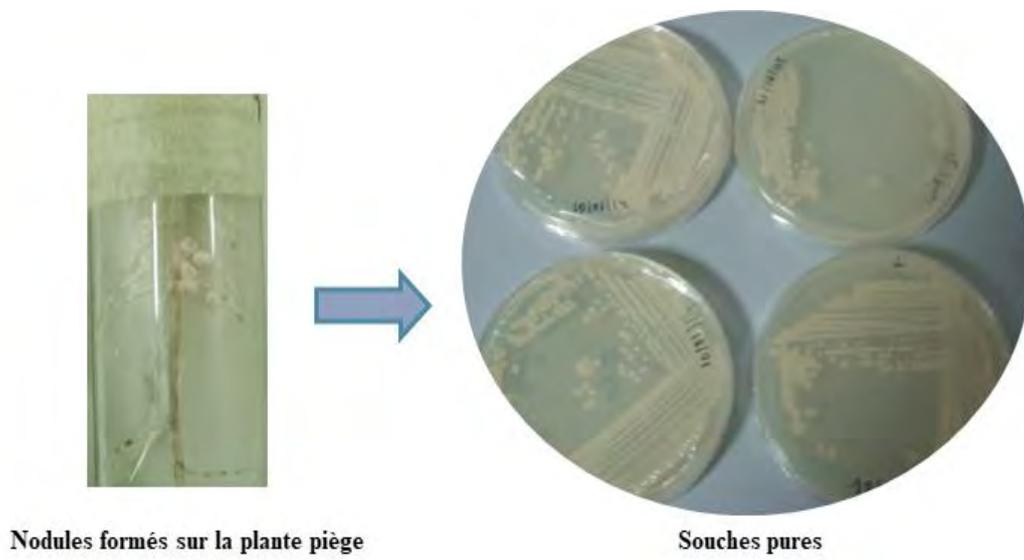


Figure 10. Isolement des souches piégées

II. 5. Étude phylogénétique des souches isolées

II. 5 1. Extraction d'ADN et amplification de la région 16S et du gène *nifH*

La méthode sous vide de NucleoSpin 96 Tissue (Macherey Nagel) a été utilisée selon le protocole édité par le fabricant pour extraire l'ADN des isolats. La lyse a été réalisée par incubation des échantillons dans une solution contenant du SDS et de la protéinase K. Les conditions appropriées pour la liaison de l'ADN à la membrane de silice dans la plaque de fixation NucleoSpin[®] Tissue ont été créées et les contaminants ont été éliminés par lavage avec deux tampons différents. L'ADN génomique obtenu après élution dans des conditions de faible force ionique a été utilisé pour amplifier :

La région 16S de l'ARNr à l'aide du kit illustra Hot Start Mix RTG (GE Health care, Bucking Hampshire, Royaume-Uni). Le gène d'ARNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces pA (AGAGTTTGATCCTGGCTGAG) et pH (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) (Edwards *et al.*, 1989). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : une phase de préchauffage à 94°C pendant 5 min et une phase terminale 72°C pendant 3 min ; les étapes de dénaturation (94°C pendant 15 s), d'hybridation (55°C pendant 30 s) et d'élongation (72°C pendant 1 min 30 s) ont été répétées 35 fois.

Et le gène *nifH* par les amorces polR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) et polF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) (Poly *et al.*, 2001) en utilisant le programme suivant : une phase de préchauffage à 95°C pendant 15 min et une phase terminale (72°C pendant 10 min) ; les étapes de dénaturation (94°C pendant 60s), d'hybridation (60°C pendant 60s) et d'élongation (72°C pendant 1 min) ont été répétées 30 fois.

Les produits PCR ont été vérifiés en déposant 3 µl des amplifiats mélangés à 3 µl de bleu de charge (bleu de bromophénol) sur un gel d'agarose à 1%. La migration a été faite à 100 V pendant 30 min. Le gel a été ensuite coloré dans une solution de bromure d'éthidium (BET ; 0,5 mg l⁻¹) pendant 10 min, puis lavé à l'eau déminéralisée pendant 15 min et ensuite photographié sous table UV à l'aide du logiciel BIO-Capt[™] (VilbertLourmat, Marne-laVallée, France).

II. 5 2. Evaluation de la diversité par RFLP du gène de l'ARNr 16S

Les produits de PCR du gène d'ARNr 16S ont été digérés avec deux types d'enzyme de restriction *HaeIII* (enzyme Fast Digest) et *MspI* (Thermo Fisher Scientific). Pour chaque produit PCR, une digestion a été effectuée dans un volume de 20 µl contenant 0,5 µl d'enzyme, 2 µl de tampon, 5 µl de produits PCR et 12,5 µl d'eau. Le tout a été incubé à 37°C pendant 30 min.

Le contrôle de la réaction enzymatique a été réalisé sur gel d'agarose à 2% pendant 60 min à 100V et colorée au bromure d'éthidium. Une analyse comparative en fonction de la taille et de la position des bandes sur les gels a été faite pour regrouper les profils en groupe électrophorétique.

II. 5 3. Identification taxonomique des souches isolées

Les produits PCR du gène de l'ARNr 16S des isolats ont été séquencés chez «GATC Biotech, Constance, Germany). Les séquences nucléotidiques ont été vérifiées et corrigées par SeqMan Pro en ligne (DNASTAR - Software for Molecular Biology - Sequence Analysis », puis alignées avec «Clustal W Multiple alignment» (Thompson *et al.*, 1994). Un blast a été effectué pour comparer les séquences obtenues avec des séquences de référence présentes dans la base de données de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les séquences ont été déposées dans la base de données GenBank et affectées à des numéros d'accèsion. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987). avec le logiciel Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) . La robustesse des arbres a été testée par la méthode de bootstrap. Les valeurs de bootstrap ont été exprimées comme un pourcentage de 1000 réplifications.

II. 6. Impact des souches isolées sur la croissance de *P. reticulatum*

Les graines de *P. reticulatum* préalablement scarifiées dans de l'acide sulfurique (1 h), rincées à plusieurs reprises et imbibées durant 24 h dans de l'eau déminéralisées stériles ont été placées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose à 2% et incubées dans l'étuve pendant 48 h avant d'être repiquées dans des tubes Gibson. Un volume de 1 ml de cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance (approximativement 10⁹ cfu ml⁻¹) a été inoculé aux jeunes plants de *P. reticulatum* maintenus en chambre de culture. Cinq (5) répétitions ont été faites pour chaque traitement, et des plants non inoculés ont servi de témoins. Des mesures de la hauteur ont été prises tous les 15 jours en partant du collet jusqu'à la pointe de la dernière

feuille. Après 3 mois de croissance, la fixation d'azote a été estimée en mesurant la fluorescence des feuilles à l'aide du SPAD-502 chlorophyll meter (SPAD-502, Minolta Corp. ; Ramsey, NJ, USA). Et enfin les biomasses aériennes et racinaires après séchage à 70°C ont été évaluées.

II. 7. Analyse statistique

Les données obtenues ont été soumises à une analyse sur R par le test de Dunnett du «package» multi-comp (Hothorn *et al.*, 2008) pour identifier la présence ou non de différences significatives entre les moyennes des traitements, en fonction des variables étudiées.

III. Résultats

III. 1. Analyse physico-chimiques des sols

Les sols de la zone de Ndiassane (ZSS) et du terroir de Saré yorobana du Sénégal sont sableux avec des pourcentages d'argile et de limon variables en fonction du site de prélèvement (Tableau 1). Globalement les pourcentages d'argile, de limon, du sable, du N total et du C total n'ont pas montré de différence significative entre les sols prélevés dans les zones d'études. Par contre le phosphore total a significativement été ($P < 0,05$) plus élevé dans le sol prélevé dans la zone ZSS (1486,25^a) comparé à la zone ZSG (57,75^b).

Tableau 1. Analyse physico-chimique des sols des deux zones d'étude

Caractéristiques du sol	Sol de ZSS	Sol de ZSG
Argile (%)	11.93 ^a	9.02 ^a
Limon (%)	11.8 ^a	18.28 ^a
Sable (%)	73.14 ^a	71.92 ^a
N total (%)	0,084 ^a	0,040 ^a
C total (%)	0,940 ^a	0,622 ^a
P total (mg·kg ⁻¹)	1486,25 ^a	57,75 ^b
Rapport C/N	11,52 ^b	15,69 ^a

III. 2. Piégeage des bactéries associées aux sols sous *P. reticulatum*

Les sols prélevés sous l'influence de *P. reticulatum* dans les deux sites d'échantillonnage ont montré un nombre de nodules variable (Tableau 2) en fonction des trois plantes pièges (*F. albida*, *A. bivenosa* et *V. seyal*). Au total, 140 nodules ont été obtenus dans les sols de la zone (ZSS) dont 83 nodules formés sur les racines de *F. albida*, 43 sur *V. seyal* et 14 sur *A. bivenosa*. Le piégeage avec les sols en provenance de la zone (ZSG) a révélé un nombre de nodules plus important (412 nodules) dont 337 nodules répertoriés sur les racines de *F. albida*, 74 sur *V. seyal* et 1 seul nodule récolté sur les racines de *A. bivenova*. Pour chaque espèce 10 nodules ont été pris pour les besoins de l'isolement excepté *A. bivenova* de la zone (ZSG). Tout en sachant qu'une ou plusieurs souches peuvent être isolées avec un nodule donné. Le screening morphologique sous une loupe binoculaire a permis de retenir 59 isolats différents dont 26 issus des nodosités du site ZSS et 33 des nodosités du site ZSG.

Tableau 2. Nodules récoltés en fonction des plantes pièges et de la zone de prélèvement

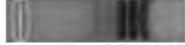
Zones de prélèvement	Plantes pièges utilisées (nombre de nodules/ plantes)		
	<i>F. albida</i>	<i>V. seyal</i>	<i>A. bivenosa</i>
ZSS	83	43	14
ZSG	337	74	1

III. 3. Diversité génétique des souches isolées

III. 3 1. Evaluation de la diversité par PCR-RFLP de l'ARNr 16S

La caractérisation moléculaire par PCR-RFLP des 59 souches isolées a permis d'obtenir 14 profils différents nommé GI à GXIV sur la base du nombre de bandes et leur position (Tableau 3). Une analyse des profils obtenus a montré que le génotype du groupe I (GI) a été plus abondant (34%) parmi les profils répertoriés et a été observé sur les trois plantes pièges. Par contre, le groupe II (GII) a été le plus présent sur les isolats obtenus à partir de *F. albida* dans les sols prélevés en ZSS. Le groupe IV (GIV) a été plus fréquent sur les isolats obtenu à partir de *V. seyal* dans les sols prélevés en ZSG. Les autres groupes ont été peu abondants et peu représentés quelques soit la plante hôte ou la provenance du sol.

Tableau 3. Distribution des profils RFLP 16S en fonction des plantes pièges et de la zone de prélèvement

Groupes	Distribution des profils (nombre de profils/ plante piège)						Type de profils RFLP	
	ZSS			ZSG			<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>
	<i>F.alb</i>	<i>A.biv</i>	<i>V.sey</i>	<i>F.alb</i>	<i>A.biv</i>	<i>V.sey</i>		
I	2	1	5	5	1	6		
II	7			3		1		
III			1	1		2		
IV	1		2			7		
V		1				1		
VI	1		1			1		
VII			1			1		
VIII		1						
IX				1				
X				1				
XI				1				
XII	1							
XIII		1						
XIV						1		

III. 3 1 1. Amplification du gène *nifH*

La PCR du gène de structure de la nitrogénase *nifH* a également été réalisée sur les 59 souches isolées. Seules 21 souches (35,6%) ont montré une bande unique de 360 pb environ, dont 9 souches isolées du site ZSS et 12 du site ZSG. Selon les trois espèces pièges utilisées, les 21 bandes (amplification positive) ont été réparties comme suit : 15 réponses positives à l'amplification au gène *nifH* soit (71,4%) ont été obtenues avec les souches isolées sur *V. seyal* ; 4 réponses positives (19%) sur *F. albida* et seulement 2 réponses positives (9,5%) sur *A. bivenosa*.

III. 3 2. Analyse phylogénétique des séquences de l'ARNr 16S

Pour déterminer l'identité taxonomique des souches isolées, le gène de l'ARNr 16S de 47 souches a été séquencé. Les résultats (Tableau 4) ont révélé 25 espèces bactériennes différentes appartenant à neuf (9) familles : *Paenibacillaceae*, *Bacillaceae*, *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae* et *Micrococcaceae*.

L'arbre phylogénétique construit sur la base des séquences obtenues et celles de références proches aux différents genres (Figure 11) a montré une répartition des espèces en 4 clusters :

Cluster I a regroupé 25 souches et a été divisé en deux sous-cluster (SC1 et SC2). Le sous-cluster SC1 a renfermé 22 souches très proches de la famille des *Paenibacillaceae*. Parmi elles, Treize (13) souches ont été étroitement apparentées au genre *Cohnella*, dont (11) ont été regroupées dans un sous-groupe (Figure 12) très proche à *Cohnella plantaginis* isolé de plantain en Chine (Wang & Dai, 2011). Une souche a été très proche de *C. rhizosphaerae* isolée de la rhizosphère de *Zea mays* (Kämpfer *et al.*, 2015) et une autre souche très proche aussi de *C. xylanilytica* (Khiangam *et al.*, 2010). Ensuite, les neuf (9) souches restantes du sous cluster SC1 ont été très proches de *Paenibacillus glycanilyticus* (Kajiyama *et al.*, 2002), de *P. humicus* (Vaz-Moreira *et al.*, 2007) et de *P. rigui* isolé dans une zone humide des eaux douces (Baik *et al.*, 2011). Et enfin, le sous-cluster SC2 a regroupé trois (3) souches, dont 2 très proches de la souche de *Bacillus aryabhatai* isolée de la rhizosphère de *Lemna sp* dans les zones humides de Kolkata en Inde (Ray *et al.*, 2012) et de *Bacillus sp* (HM212416.1), et une autre souche proche de *Rummeliibacillus suwonensis* isolée en Corée (Her & Kim 2013).

Cluster II a été formé par une seule souche très proche de *Kocuria marina*, une espèce *Actinobacterium* isolée des sédiments marins (Kim *et al.*, 2004).

Cluster III a regroupé 12 souches et a été scindé en deux sous-cluster (SC3 et SC4). Cinq (5) souches ont formé le sous cluster SC3 avec une similarité de 100% au *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) et au *Bradyrhizobium liaoningense* isolé des nodules du soja (AB698736). Le sous-cluster SC4 a regroupé sept (7) souches à croissance rapide, très proches de *Mesorhizobium plurifarum* (de Lajudie *et al.*, 1998), de *Rhizobium giardinii sp* isolé à partir des nodules de *Phaseolus vulgaris* (Amarger *et al.*, 1997) et de *Ensifer adhaerens* (Casida Jr, 1982).

Cluster IV a été formé par six (6) souches très proches de *Pseudomonas azotoformans* (Iizuka & Komagata, 1963), de *Acinetobacter calcoaceticus* (AJ888983), de *Ralstonia pickettii* (Ralston *et al.*, 1973), de *Caballeronia zhejiangensis* (HE983367) et de *Paraburkholderia insulsa* (KF733462).

Cependant l'analyse de l'arbre n'a pas montré un regroupement des bactéries obtenues ni en fonction de la provenance des sols (site d'échantillonnage) (figure 13a), ni par plantes pièges utilisées (figure 13b).

Tableau 4. Séquençage avec numéros d'accèsion des souches isolées et signaux *nifH* : (+)
nifH positif ; (-) *nifH* négatif, A : *F. albida* ; B : *A. bivenosa* ; S : *V. seyal*

Souches isolées	PCR <i>nifH</i>	N°d'accèsion	Espèces plus proches après Blast	N°d'accèsion des références	% de Similarité
PZS_B04	-	KY992880	<i>Acinetobacter pittii</i>	CP017938	100%
PZG_S16	+	KY992881	<i>Bacillus aryabhatai</i>	EF114313	100%
PZS_B03	+	KY992882	<i>Bacillus sp. GIMN1.006</i>	HM212416	100%
PZS_S08	+	KY992883	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	JQ911631	100%
PZG_S14	+	KY992884	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	JQ911632	100%
PZG_S20	+	KY992885	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	JQ911633	100%
PZS_A08	+	KY992886	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	JQ911633	100%
PZG_S09	+	KY992887	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	AB698736	99%
PZG_A19	-	KY992888	<i>Paraburkholderia insulsa</i>	KF733462	100%
PZS_S06	-	KY992889	<i>Caballeronia zhejiangensis</i>	HE983367	100%
PZS_A03	-	KY992890	<i>Caballeronia zhejiangensis</i>	HE983367	100%
PZS_B01	-	KY992891	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZS_S02	-	KY992892	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZS_S07	-	KY992893	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	97%
PZS_A06	-	KY992894	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZG_B05	-	KY992895	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZG_S10	-	KY992896	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	97%
PZG_S15	-	KY992897	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	97%
PZG_S18	-	KY992898	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZG_A12	-	KY992899	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZG_A13	-	KY992900	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	99%
PZG_A18	-	KY992901	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZG_A20	-	KY992902	<i>Cohnella plantaginis</i>	JN982125	98%
PZS_S04	+	KY992903	<i>Cohnella xylanilytica</i>	HE866503	97%
PZS_S05	+	KY992904	<i>Ensifer adhaerens</i>	AJ420774	100%
PZG_S11	+	KY992905	<i>Ensifer adhaerens</i>	AJ420774	100%
PZG_S19	+	KY992906	<i>Ensifer adhaerens</i>	AJ420774	100%
PZG_A15	+	KY992907	<i>Ensifer sp. JNVU CB6</i>	JN832576	100%
PZS_A07	-	KY992908	<i>Kocuria marina</i>	KP345974	100%

CHAPITRE II. DIVERSITÉ DES RHIZOBIA ET PGPR DES SOLS SOUS INFLUENCE DE *P. RETICULATUM*
ET LEUR IMPACT SUR LA CROISSANCE DE L'ARBUSTE

PZS_B02	+	KY992909	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	JQ039741	100%
PZS_A02	-	KY992910	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	NR_024759	99%
PZS_A09	-	KY992911	<i>Paenibacillus humicus</i>	AM411529	100%
PZS_A10	-	KY992912	<i>Paenibacillus humicus</i>	AM411529	100%
PZG_A14	-	KY992913	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	NR_024759	99%
PZG_A17	-	KY992914	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	NR_024759	99%
PZS_A01	-	KY992915	<i>Paenibacillus humicus</i>	AM411529	99%
PZG_A11	-	KY992916	<i>Paenibacillus rigui strain</i>	NR116517	97%
PZS_A05	+	KY992917	<i>Paenibacillus sp. JG-TB13</i>	FR849925	99%
PZG_S12	+	KY992918	<i>Paenibacillus sp. JG-TB13</i>	FR849925	99%
PZG_A16	-	KY992919	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	KT375344	100%
PZG_S17	-	KY992920	<i>Ralstonia pickettii</i>	CP001069	99%
PZG_S21	-	KY992921	<i>Rhizobium sp. Lv6.1Se</i>	DQ422964	98%
PZS_S01	-	KY992922	<i>Rhizobium sp. ORS 3441</i>	EU584258	100%
PZG_A21	-	KY992923	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	NR041521	99%

PZG : *P. reticulatum* échantillonné dans la zone soudano guinéenne, PZS : *P. reticulatum* échantillonné dans la zone soudano-sahélienne, les signaux *nifH* des 12 autres souches non séquencées: **PZG_A22 (-), PZG_S22 (-), PZG_S23 (-), PZG_S24 (-), PZG_S25 (-), PZG_S26 (+), PZG_S27 (+), PZG_S28 (+), PZS_A23 (-), PZS_A24 (-), PZS_S29 (-), PZS_S30 (-)**

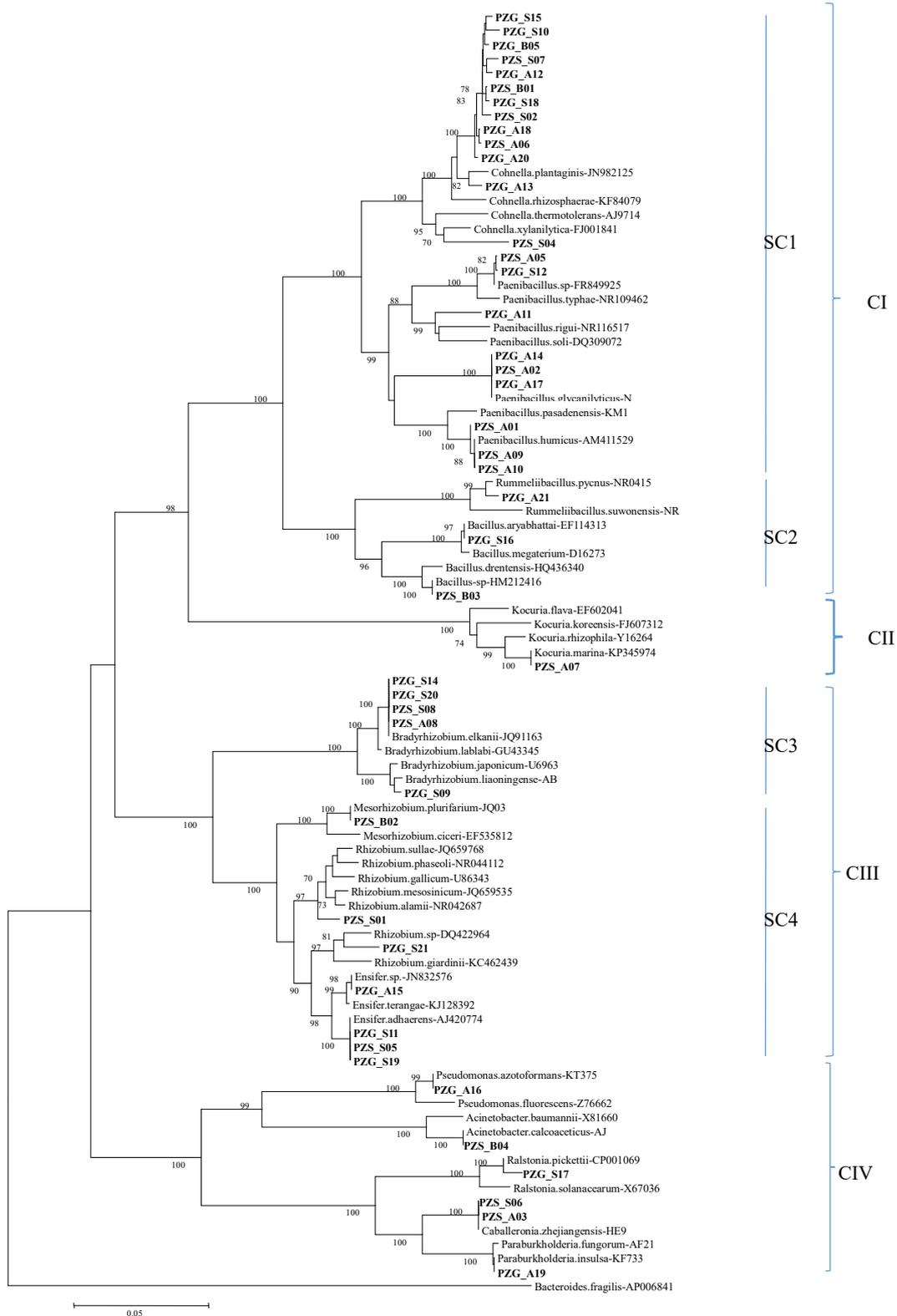


Figure 11. Arbre phylogénétique basé sur des séquences du gène de l'ARNr 16S des souches isolées (en gras) et des séquences de référence de la base de données NCBI en utilisant la méthode de neighbor-joining. Les valeurs de bootstraps sont exprimées en pourcentage de 1000 répliquions et présentées au niveau des nœuds si elles sont supérieures ou égales à 70% ; C cluster ; SC : sous cluster

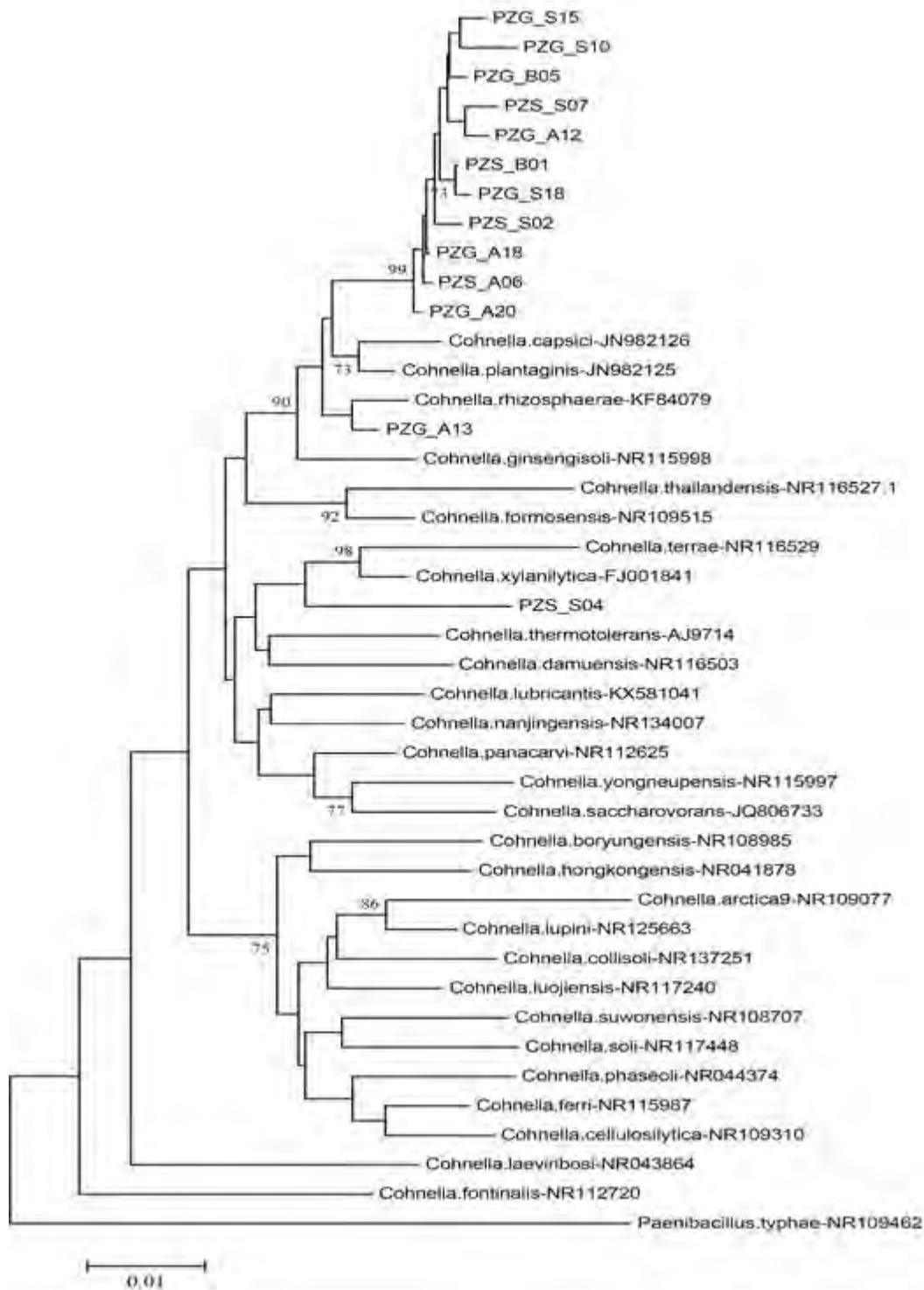


Figure 12. Arbre phylogénétique basé sur des séquences 16S des souches de *Cohnella* et des séquences de références NCBI. Les valeurs de bootstraps sont exprimées en pourcentage de 1000 répliquions et présentées au niveau des nœuds si elles sont supérieures ou égales à 70%.

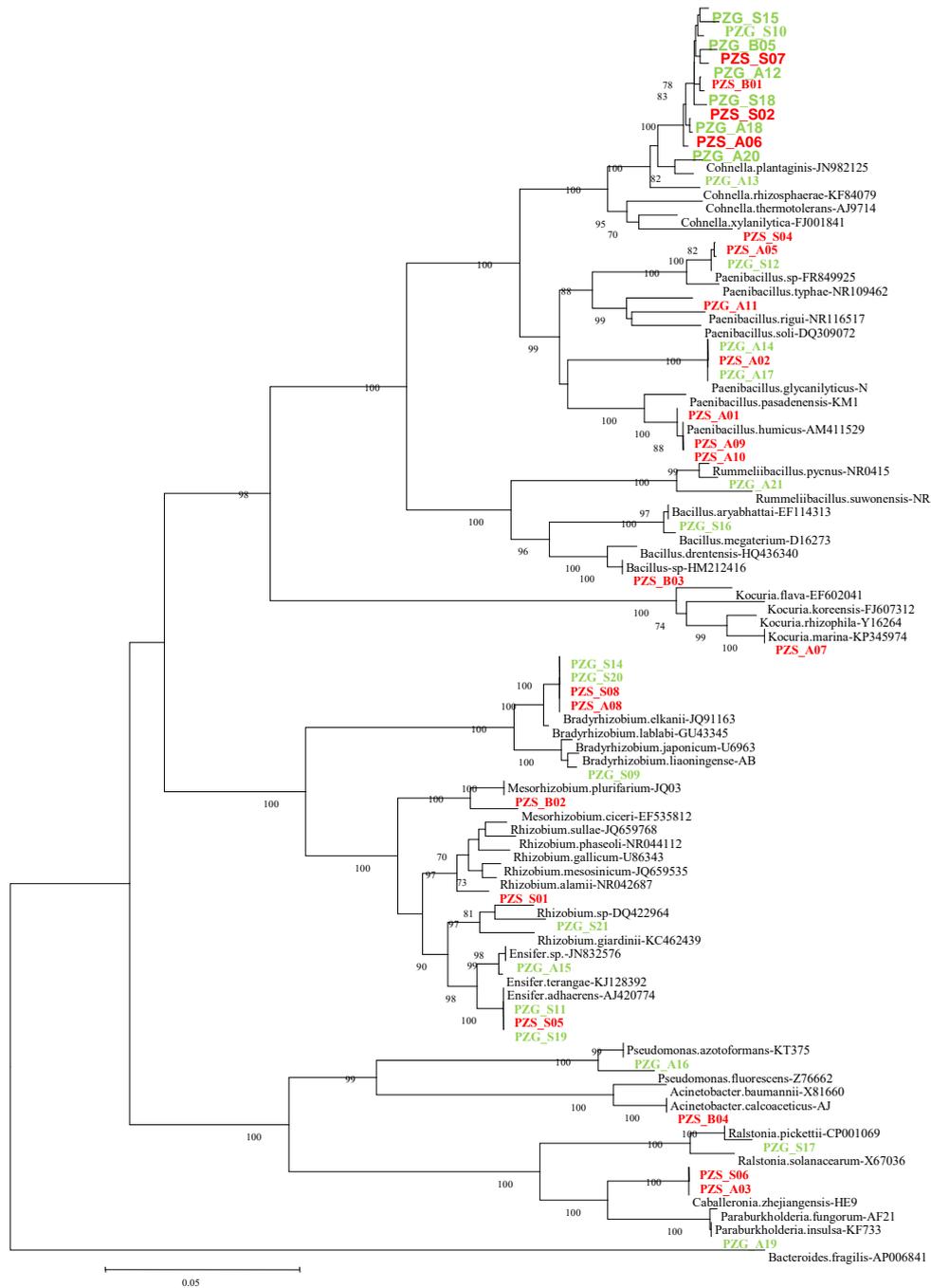


Figure 13a. Relation phylogénétique entre les bactéries isolées et la provenance de sols (site d'échantillonnage), code couleur : rouge bactéries isolées dans la zone soudano-sahélienne et verte bactéries isolées dans la zone soudano guinéenne et noire les séquences de référence de la base de données NCBI. La méthode de neighbor-joining est utilisée et les valeurs de bootstraps sont exprimées en pourcentage de 1000 répliquions et présentées au niveau des nœuds si elles sont supérieures ou égales à 70%

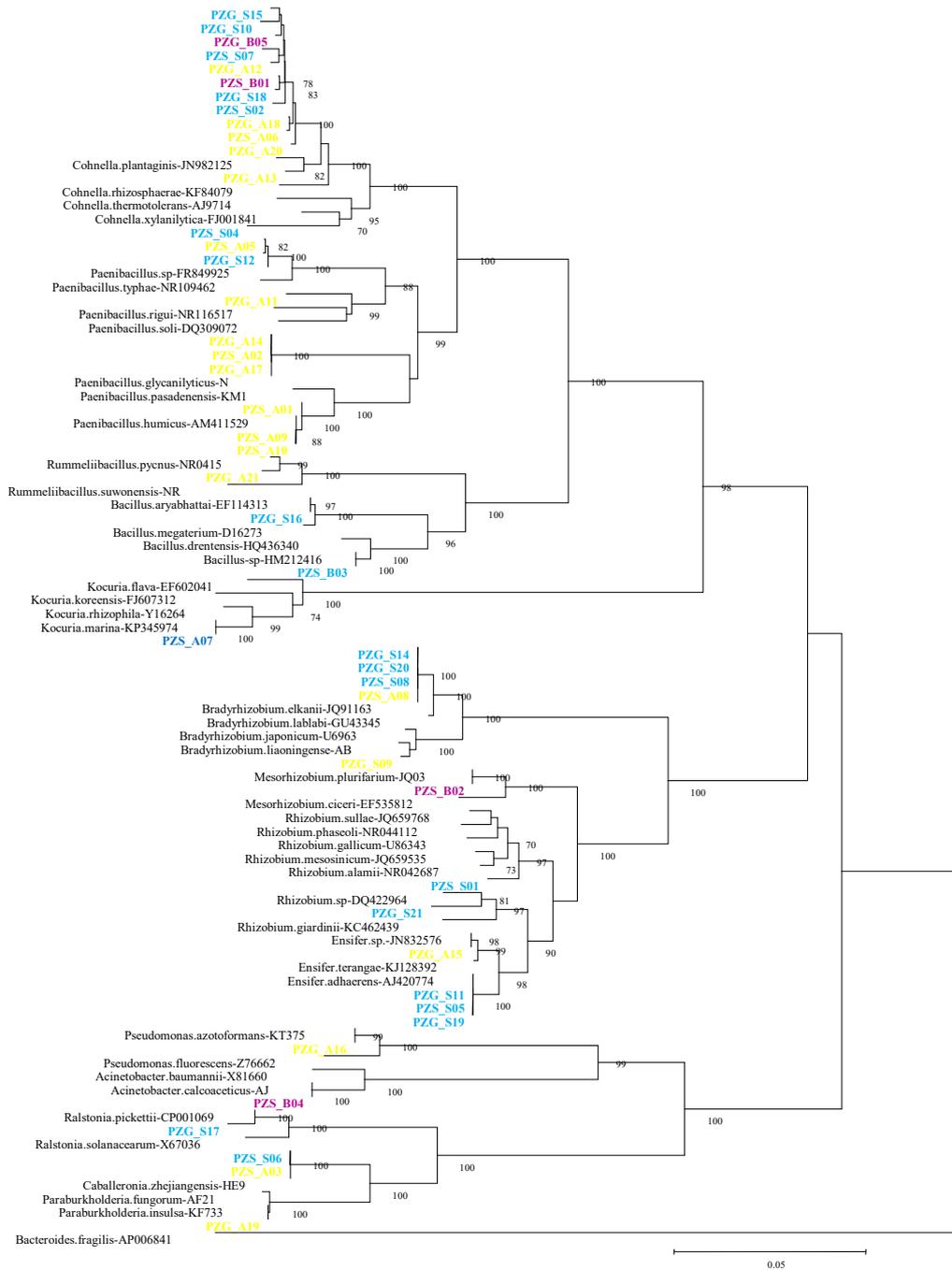


Figure 13b. Relation phylogénétique entre les bactéries isolées et les plantes pièges utilisées, code couleur : jaune, bactéries isolées sur les racines de *F. albida* ; bleu, bactéries isolées sur les racines de *V. seyal*; mauve, bactéries isolées sur les racines de *A. bivenosa* et noire les séquences de référence de la base de données NCBI. La méthode de neighbor-joining est utilisée et les valeurs de bootstraps sont exprimées en pourcentage de 1000 répliques et présentées au niveau des nœuds si elles sont supérieures ou égales à 70%

III. 4. Impact des souches isolées sur la croissance de *P. reticulatum*

Afin d'évaluer l'impact des souches isolées des sols sous influence de *P. reticulatum*, les plants de *P. reticulatum* ont été inoculés avec sept souches (PZG_A17, PZG_A18, PZG_S09, PZG_S14, PZS_B02, PZG_S04 et PZS_S05) principalement choisies sur la base de la présence du gène *nifH*. Après trois mois en chambre de culture, les plants inoculés avec les souches PZG_A18 proches de (*Cohnella*), PZG_S14 proches de (*Bradyrhizobium elkanii*) et PZS_S05 proche de (*Ensifer*) ont significativement (respectivement $p < 0,001$, $p < 0,01$ et $p < 0,05$) augmenté la teneur en chlorophylle des feuilles (Figure 14) comparée aux plants non inoculés. L'analyse de la hauteur (Figure 14) des plants a montré que les souches PZS_S05 et PZG_A18 ont induit une amélioration significative (respectivement $p < 0,001$ et $p < 0,01$) de la croissance des plants inoculés par rapport aux témoins non inoculés.

En termes de biomasse aérienne (Figure 15), seuls les plants inoculés avec la souche PZG_A18 ont montré un poids sec des parties aériennes significativement ($p < 0,001$) plus élevé par rapport aux plants non inoculés. La biomasse racinaire n'a révélé aucune différence significative entre les plants inoculés et les témoins non inoculés, à l'exception de PZS_S05, qui a induit une augmentation du poids des racines séchées. En termes de biomasse totale, aucune différence significative n'a été observée entre les plants inoculés et les témoins non inoculés.

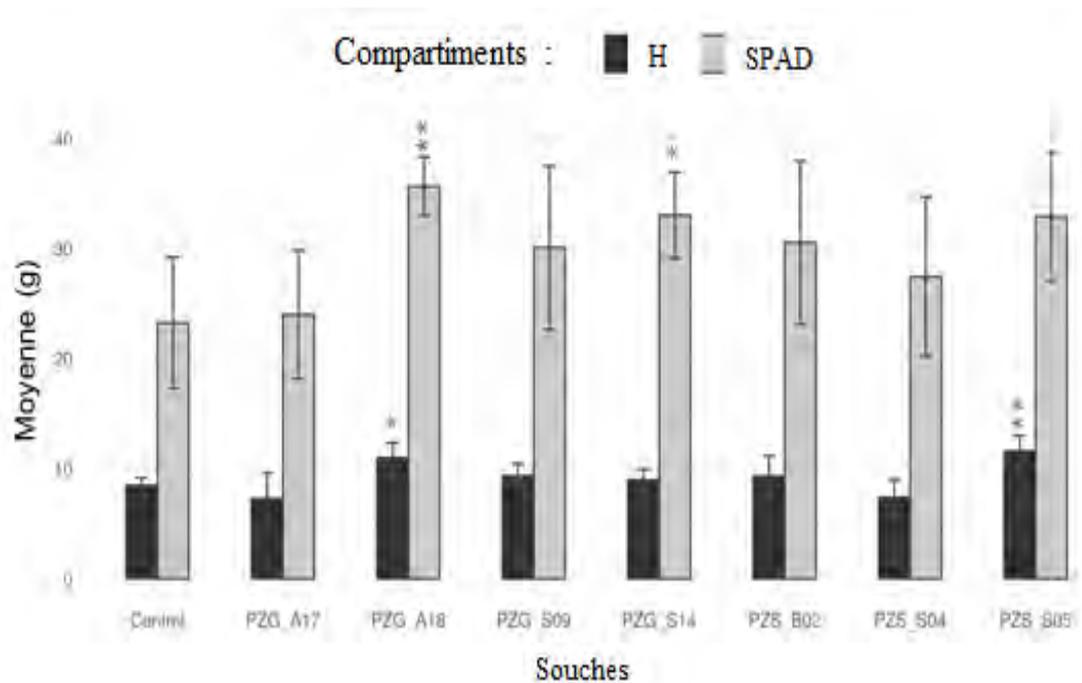


Figure 14. Réponse à l'inoculation de *P. reticulatum* à différentes souches. H (hauteur) et SPAD (Chlorophylle)

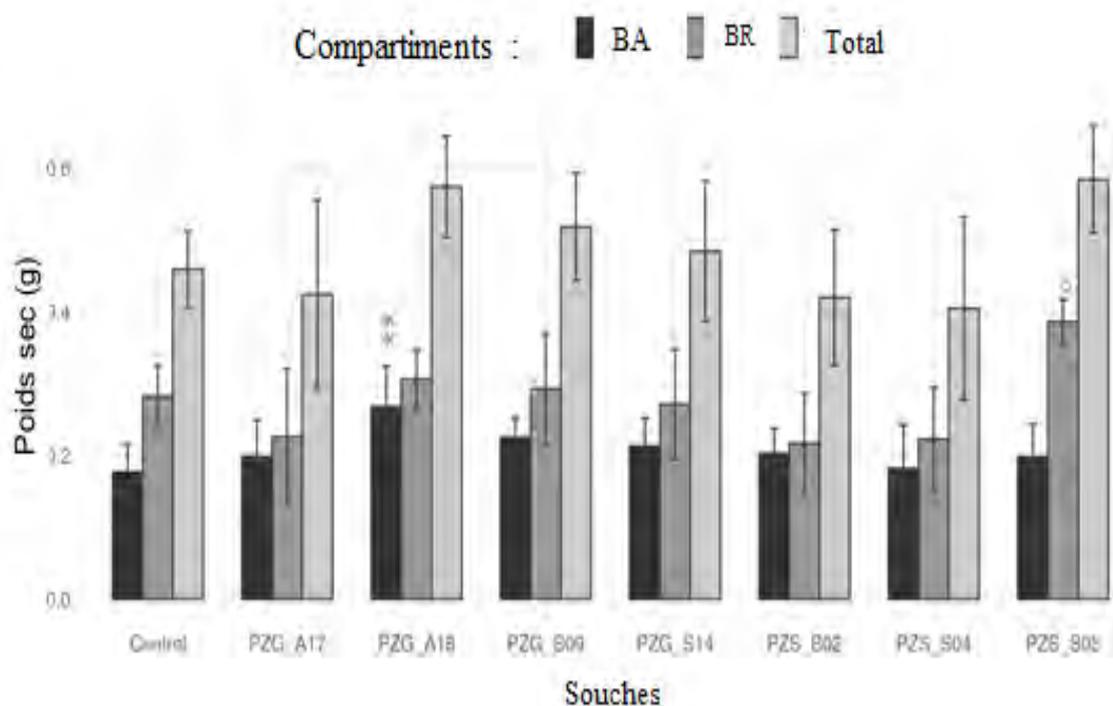


Figure 13. Réponse à l'inoculation de *P. reticulatum* à différentes souches. BA (biomasse aérienne) et BR (biomasse racinaire)

IV. Discussion

L'utilisation de trois espèces pièges (*F. albida*, *V. seyal* et *A. bivenosa*) a révélé une diversité bactérienne importante sous *P. reticulatum* des sols provenant des deux zones de prélèvement (ZSS et ZSG). Le nombre de nodules formés sur les racines des plantes pièges a montré que le sol du site ZSG contient plus de bactéries infectives capables d'induire des relations symbiotiques avec les plantes pièges utilisées que le sol prélevé dans le site ZSS. Ces différences pourraient être dues principalement aux propriétés physico-chimiques contrastées des deux sites d'étude, mais également aux facteurs environnementaux et climatiques contrastés. En effet, le ZSG est caractérisé par de grandes étendues de "formations boisées avec une strate arborée et un recru arbustif bien développé" (deWolf, 1998). Ce qui est probablement très propice au développement des bactéries du sol. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'espèce *Senegalia senegal* (Bakhoun *et al.*, 2014) et *A. saligna* (Amrani *et al.*, 2010). Les résultats obtenus ont été confirmés par la diversité des profils RFLP qui ont été plus importants avec le sol du site ZSG que le sol du site ZSS.

En outre, les résultats ont révélé que le nombre de nodules formés sur les racines *F. albida* a été plus important comparé au nombre récolté sur *A. bivenosa* et *V. seyal*, quelle que soit la provenance des sols. Toutefois le plus grand nombre de groupes taxonomiques a été obtenu sur *V. seyal* malgré le fait que le même nombre de nodules a été sous-échantillonné pour toutes les plantes pièges. Ceci est en accord avec le fait que *V. seyal* appartient au groupe pouvant être nodulé par plusieurs genres bactériens tels que le genre *Ensifer* (Odee *et al.*, 2002 ; Ben Romdhane *et al.*, 2006 ; Cordero *et al.*, 2016 ; Sankhla *et al.*, 2017), le genre *Mesorhizobium* (Diouf *et al.*, 2007) etc. Tandis que, *A. bivenosa* et *F. albida* sont fréquemment nodulées par seulement le genre *Bradyrhizobium* (Odee *et al.*, 2002 ; Perrineau *et al.*, 2012 ; Sprent *et al.*, 2017).

L'analyse des résultats a montré aussi que les bactéries isolées appartenaient à neuf familles : *Paenibacillaceae*, *Bacillaceae*, *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae* et *Micrococcaceae*, et que plus de 60% de ces espèces bactériennes isolées ont été affiliées aux bactéries non symbiotiques. Ceci est en phase avec les travaux de Diedhiou-Sall *et al.*, (2013) qui par l'analyse des acides gras phospholipides (PLFA) des communautés bactériennes du sol ont montré que les bactéries Gram-positif (non symbiotiques) étaient majoritaires dans le sol sous l'influence de *P. reticulatum*. Donc cette présence dominante de ces bactéries suggère que la plante, grâce à ces signaux spécifiques exerce une influence ou une pression sélective sur sa

diversité rhizosphérique. Cette influence tend généralement à augmenter ou à réduire la diversité bactérienne et à favoriser des espèces particulières (Bertrand *et al.*, 2000 ; Ann *et al.*, 2003). Toutefois des souches affiliées à des espèces bactériennes symbiotiques et fixatrices d'azote (*Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Rhizobium*) ont été aussi piégés dans le sol sous l'influence de *P. reticulatum*. Et toutes les souches identifiées ont été retestées sur les plantes d'isolement et ont été capables de former des nodules sur les racines de leurs plantes d'isolement respectives (données non présentées). Cela confirme que *P. reticulatum* est incapable de former des nodules, influence la diversité bactérienne du sol.

Les résultats ont montré aussi que des souches très proches de *Cohnella* ont été les plus abondantes dans les sols. La majorité des souches isolées ont été regroupées avec une valeur bootstrap très élevée à l'espèce *C. plantaginis* et pourrait même représenter une nouvelle espèce de *Cohnella* (Figure 12). Toutes les souches de ce groupe ont présenté des signaux négatifs pour l'amplification du gène *nifH*. Alors que, Wang *et al.*, (2012) ont rapporté par le test de la réduction de l'acétylène (ARA) que *Cohnella plantaginis* était une espèce fixatrice d'azote. Contrairement à nos résultats la souche PZS_S04, très proche de *Cohnella xylanitytica* a présenté un signal positif du gène *nifH*. *Cohnella xylanitytica* est une bactérie dégradant le xylane et a été proposée comme une nouvelle espèce de *Cohnella* (Khianngam *et al.*, 2010). De plus il est connu, que de nombreux membres des genres *Bacillus* et *Peanibacillus* sont des bactéries diazotrophes. C'est certainement le cas des souches PZS_B03 et PZG_S16 (très proches de *Bacillus*), PZS_A04 et PZG_S12 (très proches de *Peanibacillus*) qui ont amplifié le gène *nifH* dans notre étude.

En outre, la présence d'espèces non symbiotiques fixatrices d'azote suggère que les bactéries des zones d'influence de *P. reticulatum* pourraient être impliquées dans la nutrition azotée de l'arbuste, tout en enrichissant le sol en azote. Ces bactéries sont fréquemment rencontrées dans les nodules des légumineuses (Zakhia *et al.*, 2006). Leur rôle dans les nodules reste obscur, mais elles participent probablement dans le processus de la fixation biologique d'azote des nodules et / ou à la production d'hormones qui favorisent la croissance des plantes. Ainsi sept (7) souches (*nif H+*) ont été sélectionnées et inoculées aux jeunes plants de *P. reticulatum*. Par rapport aux plants témoins non inoculés, les souches PZS_S05 (*Ensifer sp*) et PZG_A18 (*Cohnella sp*) ont induit une augmentation significative de la hauteur des plants in vitro. Ces deux souches (PZS_S05 et PZG_A18), plus la souche PZG_S14 ont également augmenté significativement les teneurs en chlorophylle des feuilles. Les souches PZG_A18 et PZS_S05 ont augmenté aussi de manière significative les biomasses aériennes et racinaires.

Cependant, les mécanismes impliqués dans ces augmentations significatives de la croissance des plantes pourront faire l'objet d'une étude dans un future proche, bien que de nombreuses études ont montré que les bactéries endophytes non symbiotiques peuvent être utilisées comme inoculum pour favoriser la croissance, la nodulation et l'augmentation des rendements (Bai *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2010 ; Stajkovic *et al.*, 2011). Stajkovic *et al.*, (2011) ont également montré que la biomasse aérienne et la teneur en azote des plants de haricot ont été améliorées après co-inoculation avec une souche de *Rhizobium phaseoli* et une souche de *Bacillus sp.*

V. Conclusion

P. reticulatum est un arbuste important pour la fertilisation du sol. La connaissance de la diversité bactérienne et de leurs impacts sur la croissance et le statut azoté de l'arbuste pourrait donc aider à mieux utiliser *P. reticulatum* dans les zones arides et semi-arides du Sahel. Les résultats de l'étude ont montré que le sol sous l'influence de *P. reticulatum* est associé à une grande diversité bactérienne, dont l'abondance varie en fonction de la zone de prélèvement du sol (ZSS et ZSG du Sénégal). Les méthodes utilisées, telles que le piégeage des bactéries, la PCR-RFLP et le séquençage du gène ARNr 16S ont montré que *P. reticulatum* exerce une influence sur les communautés bactériennes du sol. Les souches PZS_S05 (*Ensifer*) et PZG_A18 (*Cohnella*) ont induit une amélioration de la croissance des plants in vitro, une augmentation de la teneur en chlorophylle des feuilles. Donc ces résultats ouvrent des perspectives à l'utilisation de l'association bactéries endophytes / *P. reticulatum* pour améliorer la croissance de l'arbuste, mais ne permet pas une bonne estimation de diversité de la structure des communautés bactériennes du sol.

**CHAPITRE III. ÉTUDE DE LA STRUCTURE PAR DGGE DES
COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES DU SOL ASSOCIÉES À
L'ARBUSTE *PILIOSTIGMA RETICULATUM***

Chapitre III. Étude de la structure par DGGE des communautés bactériennes du sol associées à l'arbuste *Piliostigma reticulatum*

I. Introduction

Au Sénégal, l'utilisation et le maintien de l'espèce *P. reticulatum* dans les champs est intensifiée durant les dernières années. En effet, plusieurs études récentes montrent que cet arbuste présente un intérêt majeur dans les domaines alimentaire, pharmacopée, agronomique, etc. (Yelemou *et al.*, 2007 ; Hernandez *et al.*, 2015 ; Diakhaté *et al.*, 2016a ; Bright *et al.*, 2017). Cette espèce à usages multiples est très appréciée par les populations rurales comme, source d'aliment humain ou animal, notamment en période de soudure (Dao, 2012), et comme source de produits de la pharmacopée traditionnelle pour soigner plusieurs pathologies (Yelemou *et al.*, 2007 ; Babajide *et al.*, 2008 ; Arbonnier, 2009). Dans les champs, la présence de *P. reticulatum* est souvent appréciée et bien adoptée même si cette espèce se régénère de façon quasi naturelle, donc peu assistée. L'association avec des cultures comme le mil, le sorgho, l'arachide etc. fournit de bons résultats. En effet, l'association culturale peut non seulement offrir un avantage substantiel au niveau du rendement total, mais aussi une plus grande stabilité des rendements au cours de plusieurs saisons (Willey, 1979). L'espèce est surtout encouragée en milieu sahélien car entraînant des modifications des paramètres abiotiques du sol, et particulièrement du cycle de l'eau, propice au maintien de l'activité microbienne y compris en saison sèche (Kizito *et al.*, 2006 ; Lufafa *et al.*, 2008 ; Dossa *et al.*, 2009, 2010 ; Diakhaté *et al.*, 2013 ; Hernandez *et al.*, 2015). *P. reticulatum* constitue une barrière physique contre le vent et le rayonnement, ce qui contribue à limiter l'érosion éolienne et à améliorer l'humidité du sol et le statut minéral des zones à proximité (Kizito *et al.*, 2006 ; Dossa *et al.*, 2008). L'arbuste constitue également une source d'apport de matière organique par une production de litière, d'exsudats racinaires favorisant la richesse et la diversité des communautés microbiennes du sol.

Afin de lutter contre la pauvreté et la dégradation des terres arables, le maintien dans les systèmes traditionnels de parcs agroforestiers des arbustes qui favorisent la présence naturelle des microorganismes bénéfiques sont à encourager.

Les microorganismes du sol sont sensibles à l'utilisation et à la gestion des terres (Sparling, 1997 ; Li *et al.*, 2004 ; Zhang & Xu, 2008) et facilitent la dégradation de la matière organique et le recyclage des éléments nutritifs (Groffman & Bohlen, 1999). Ils représentent donc un facteur clé qui influe sur le fonctionnement des écosystèmes et la durabilité des ressources du sol (Sparling, 1997). Ils sont des indicateurs sensibles de stress environnementaux

qui sont à l'origine de la dégradation de la qualité des sols. Les microorganismes en particulier les bactéries présentent une grande diversité génétique et fonctionnelle leur permettant de coloniser tous les écosystèmes de notre planète y compris les plus extrêmes. Certaines bactéries du sol comme souligné dans le chapitre II permettent en effet de limiter les apports d'engrais azotés, coûteux et polluants, dans les écosystèmes cultivés et assurent le maintien de la fertilité des sols dans les milieux naturels. Elles sont de ce fait d'une grande utilité pour la restauration des milieux dégradés à travers leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique seules ou en association.

La technique de la PCR-DGGE a été utilisée dans notre expérimentation afin d'étudier la structure génétique de la communauté bactérienne totale du sol. La DGGE est une technique moléculaire largement utilisée en écologie microbienne et à partir de laquelle des fragments d'ADN de même longueur peuvent être séparés sur la base de leur différence de séquences (Myers *et al.*, 1987). Miller *et al.*, (1999) soutiennent qu'elle est même capable de séparer les séquences d'ADN ayant une différence dans une seule paire de bases. La technique PCR-DGGE est un moyen relativement rapide pour étudier et comparer la structure des communautés bactériennes de différents écosystèmes sans recourir à des approches fondées sur la culture (Torsvik & Øvreås, 2002). Donc indépendante de la culture, des travaux ont montré qu'elle a révélé une diversité plus grande que celle obtenue en utilisant des méthodes de cultures traditionnelles (Wise *et al.*, 1999 ; El Fantroussi, 2000, Nakatsu *et al.*, 2005). La séparation des bandes est basée sur la différence de mobilité des molécules d'ADN dans un gel d'acrylamide contenant un gradient linéaire dénaturants (urée et formamide). Elle fait partie aujourd'hui des techniques les plus utilisées parmi celles des empreintes moléculaires indépendantes de la culture, pour identifier et suivre l'évolution des communautés bactériennes du sol (Theelen *et al.*, 2001).

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est d'étudier l'impact de l'arbuste *P. reticulatum* sur le sol et nous avons émis l'hypothèse que la diversité de structure des communautés bactériennes serait modifiée, voire augmentée en présence de l'arbuste. Afin de vérifier l'hypothèse, des sols ont été prélevés sous et hors influence des racines de *P. reticulatum* pour comparer :

- i. les niveaux de l'humidité, de NH_4^+ , de NO_3^- , du P, C, N et du pH du sol,
- ii. et la structure génétique des communautés bactériennes totales (Figure 16).

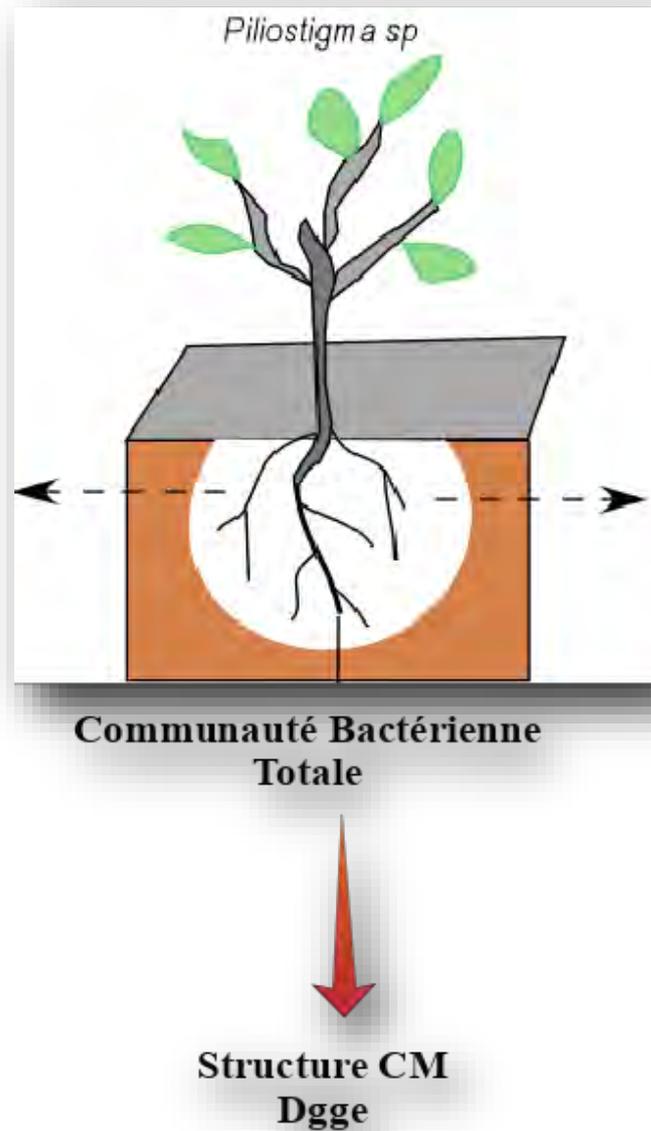


Figure 16. Approche pour étudier la structure des communautés bactériennes associées à *P. reticulatum*

II. Matériel et Méthodes

II. 1. Site d'étude et échantillonnage

Les échantillons de sols utilisés dans cette étude ont été prélevés dans le site de Saré Yorobana (Figure 17) situé dans la communauté rurale de Dioulacolon, au Sud-Est de la région de Kolda dans le Département de Kolda (12°50'N - 14°50'O). Cette zone est caractérisée par un climat de type soudano-guinéen. Les précipitations moyennes annuelles sont comprises entre 800 à 1200 mm (ANACIM, 2013). L'échantillonnage a été constitué de sol prélevé sous six (6) plantes de *P. reticulatum* et six (6) sols prélevés hors couvert constituant les sols témoins. Pour chacun des arbres un échantillon composite a été fait, constitué de 4 prélèvements de sol aux alentours des racines dans une profondeur de 0–25 cm.

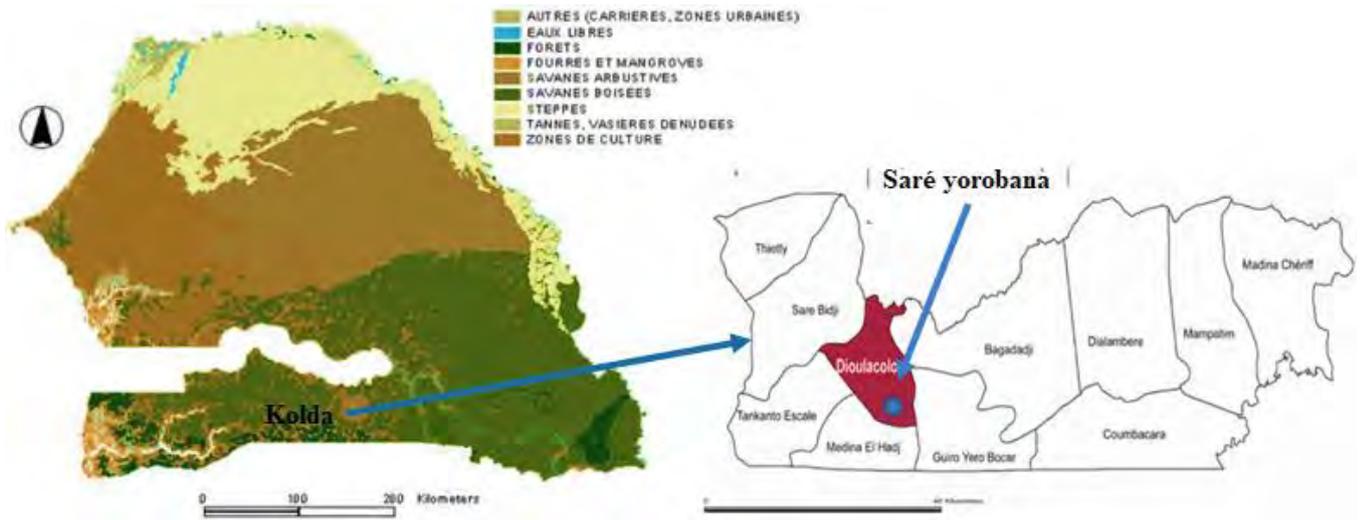


Figure 17. Carte du Sénégal montrant la position de la région de Kolda ; la commune de Dioulacolon qui héberge le site de prélèvement (Saré Yorobana)

II. 2. Caractérisation physico-chimique des sols

La caractérisation physico-chimique des échantillons de sols a été effectuée par des méthodes conventionnelles au Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) de l'IRD et au Laboratoire Mixte International Intensification Ecologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest (LMI IESOL, Campus IRD-ISRA de Bel-Air, Dakar). Il s'agissait de la texture, du pH, du carbone (C) et de l'azote (N).

D'abord, la texture par l'analyse de la répartition des particules minérales en fonction de leur taille, a été déterminée par tamisage, sédimentation et prélèvement à la pipette de Robinson (Aubert *et al.*, 1954). Dix grammes de sol tamisés à 2 mm sont soumis à une attaque par l'eau oxygénée (H_2O_2 ; 50 ml diluée à 30%) afin d'éliminer la matière organique. Les particules minérales sont ensuite dispersées par ajout de 25 ml d'une solution diluée de pyrophosphate de sodium 65 g L^{-1} . La solution obtenue est tamisée sous flux d'eau à 200 et à $50\text{ }\mu\text{m}$ pour obtenir les fractions les plus grossières (sables et limons grossiers) et les particules les plus fines (limons fins et argiles) sont prélevées après sédimentation dans une allonge. Les fractions obtenues sont pesées après séchage à l'étuve et la proportion relative de chaque fraction granulométrique est calculée afin de déterminer la texture des échantillons de sol. Ensuite, le pH des échantillons de sol a été mesuré dans l'eau selon le ratio 1/2.5 (p/v) à l'aide du pH-mètre (Delta 320, Mettler Toledo, Suisse).

Puis l'ammonium et le nitrate ont été déterminés par colorimétrie avec (KCl, 1 M). Après filtration à travers un filtre en fibre de verre, l'ammonium-N et le nitrate-N ont été déterminés respectivement par les méthodes salicylate-nitroprussiate et hydrazine-sulfanilamide, (Mulvaney, 1996).

Et enfin les dosages du carbone et de l'azote total ont été effectués par combustion sèche à l'aide d'un analyseur élémentaire CHN (EA1112 Séries, Thermo Finnigan, Italie) à une température de 1800°C . Les composés obtenus après combustion passent successivement dans le catalyseur d'oxydation (900°C) et dans la colonne de réduction (750°C). Le carbone est alors transformé en gaz carbonique et l'azote en monoxyde d'azote. Ils sont ensuite séparés dans une colonne de chromatographie en phase gazeuse utilisant l'hélium et équipé de deux détecteurs.

II. 3. Extraction de l'ADN total des sols

L'ADN des sols prélevés sous la zone d'influence des racines de *P. reticulatum* et en dehors de cette zone d'influence a été extrait en utilisant le Kit «FastDNA SPIN kit for soil, Qbiogene, Carlsbad, USA» suivant les recommandations du fournisseur.

Cette méthode d'extraction combine deux différents types de lyses cellulaires : une lyse mécanique par broyage et une lyse enzymatique. Un «lysing matrix tube», contenant des billes de céramique et de silice, a été ajouté successivement une prise d'essai de 0,5 g de sol, 978 µl de tampon Phosphate de Sodium et 122 µl de tampon MT (MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Les tubes ont ensuite été placés dans un vibro-broyeur (Fast Prep de MP Biomedicals, USA) afin de fragiliser la paroi bactérienne et d'accéder à l'ADN des cellules. Après la phase de broyage, l'ADN ainsi que les débris cellulaires, les acides humiques, les protéines etc. ont été récupérés. La précipitation des protéines avec le PPS (Protein Precipitation Solution) a été faite. L'ADN récupéré avec le Binding Matrice, a été lavé avec de l'éthanol et élué dans 100 µl d'eau stérile exempte de désoxyribonucléase «DNase free». L'ADN extrait de chaque échantillon a été dosé par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ND- 1000 UV-Vis Spectrophotometer, Labtech).

II. 4. Amplification par PCR de l'ARNr 16S

L'amplification de la région V3 de l'ADNr 16S a été effectuée en utilisant un couple d'amorces universelles 338f (Ovreas *et al.*, 1997) / 518r (Muyzer *et al.*, 1993). Une GC-clamp, séquence de 40 pb riche en GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G), a été ajoutée à l'amorce 338f (GC-338f) afin d'éviter la dénaturation complète de l'amplifiat lors de la migration électrophorétique. L'amplification a été réalisée selon le protocole décrit par Ovreas *et al.*, (1997) à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Le mélange réactionnel (25 µl) est composé de 2 µl (5 ng) d'ADN, 2,5 µl (10 µM) de chacune des amorces, de l'eau stérile qsp et de l'enzyme polymérase (Taq Ready-To-Go ; Amersham-Biosciences, USA). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : une phase de préchauffage à 94°C pendant 5 min. Cette phase est suivie d'un ensemble de phases : dénaturation (94°C pendant 30s), hybridation des amorces (65°C pendant 30s) et élongation (72°C pendant 1 min), répété 20 fois, auquel succède un autre ensemble de phases, de dénaturation (94°C pendant 30s), d'hybridation des amorces (55°C pendant 30s) et d'élongation (72°C pendant 1 min), répété 10 fois et enfin une phase terminale à 72°C pendant 15 min.

Les produits PCR ont été vérifiés en déposant 3 μ l des amplifiats mélangés à 3 μ l de bleu de charge (bleu de bromophénol) sur un gel d'agarose à 1.5% (p/v). La migration a été faite à 100 V pendant 30 min. Le gel a été ensuite coloré dans une solution de bromure d'éthidium (BET ; 0,5 mg L⁻¹) pendant 20 min, puis lavé à l'eau déminéralisée pendant 10 min et ensuite photographié sous table UV à l'aide du logiciel BIO-Capt™ (VilbertLourmat, Marne-laVallée, France).

II. 5. Electrophorèse sur gel en gradient de dénaturation (DGGE)

Après l'amplification de la région 16S (selon l'intensité des bandes) des produits issus de la PCR ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 8% avec un gradient linéaire de dénaturant chimique de 45 à 70%. Le gel est constitué d'urée (7 M) et de formamide (40% ; v/v). La migration a été réalisée avec l'appareil d'électrophorèse (Planche 5) Ingény PhorU2 (Ingény, Leiden, NL) dans un tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) pendant 18 h à 60°C et 100 V. A la fin de la migration, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (BET ; 0,5 mg L⁻¹) pendant 30 min sous une légère agitation puis lavé à l'eau déminéralisée pendant 10 min.

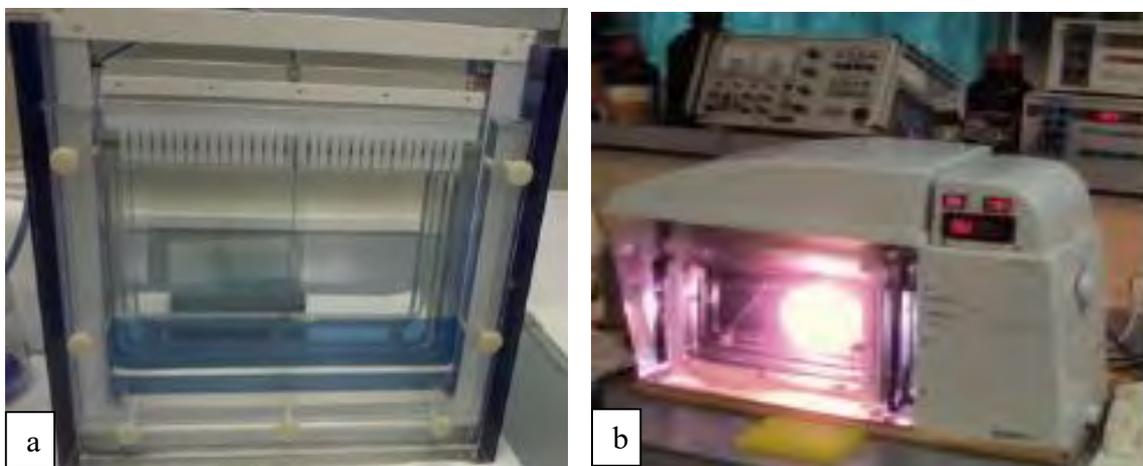


Planche 5. Photo d'appareil Gel DGGE a) Cuve de dépôt et b) appareil d'électrophorèse

II. 6. Analyse du gel et de la structure des communautés bactériennes du sol

La structure des communautés bactériennes a été mise en évidence à travers l'analyse du gel DGGE à l'aide du logiciel d'analyse de gel Phoretix 1D (version 10 ; Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

L'indice de Shannon H' a été calculé à partir des équations suivantes : $H' = -\sum (P_i \log P_i)$; $P_i = IR = IA/\text{somme des intensités}$. La diversité structurale des communautés bactériennes a été estimée en calculant l'indice de diversité de Shannon H pour chaque profil du gel. L'indice de Shannon décrit la diversité en prenant en compte à la fois le nombre d'espèces, mais également la distribution (importance) des individus au sein de chaque espèce. L'indice de diversité de Shannon-Weaver est fonction de la présence relative de chaque bande ($H' = -\sum P_i \ln(P_i)$; Shannon, 1949) et l'indice de dominance de Simpson de l'intensité relative des bandes ($D = \sum P_i^2$; Simpson, 1949).

II. 7. Analyse statistique

Une ANOVA a été réalisée pour comparer les variables chimiques des sols. Le test de Fisher à 95% a ensuite été réalisé pour classer les moyennes. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel XLSTAT (2010). Les analyses en composante principale (ACP) obtenues à partir des données de comparaison ont été utilisées pour comparer les différences de structure des communautés bactériennes entre les traitements. L'ACP et le dendrogramme ont été réalisés à l'aide du logiciel R avec les packages *ade4* et *ade4TkGUI* (Thioulouse1997).

III. Résultats

III. 1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Pour étudier l'impact de l'arbuste sur les structures des communautés bactériennes des sols, nous avons dans un premier temps comparé la composition chimique (Tableau 5) des sols sous et hors influence des racines de *P. reticulatum*. L'analyse des échantillons de sols a révélé que les paramètres NH_4^+ et NO_3^- étaient significativement ($P < 0,05$) plus élevés dans les sols prélevés sous la zone d'influence des racines de *P. reticulatum* respectivement ($0,46^a$, $2,24^a$) comparés aux sols témoins ($0,34^b$, $1,7^b$) prélevés en dehors de la zone d'influence de l'arbuste. Le pourcentage d'humidité du sol était aussi hautement significatif ($P < 0,05$) sous *P. reticulatum* ($1,32^a$) comparé à celui des sols témoins ($0,59^b$). De même, la valeur du phosphore assimilable était significativement ($P < 0,05$) plus élevée dans les sols prélevés sous la zone d'influence des racines du *P. reticulatum* ($4,55^a$) comparée à celle des sols hors couverts ($3,38^b$). Par contre, le pH eau qui correspond à l'acidité active (ou l'acidité réelle) était significativement ($P < 0,05$) plus élevé dans les sols témoins ($6,3^a$) comparé aux sols sous couverts *P. reticulatum* ($5,91^b$) qui avait au contraire un pH KCl significativement ($P < 0,05$) plus élevé que les témoins. Toutefois, l'écart entre ces deux paramètres (pH eau et pH KCl) était inférieur à 1 dans les sols de la zone d'influence de *P. reticulatum* c'est à l'acidité de réserve est moyenne et l'écart est supérieur à 1 dans les sols de la zone hors couverte des racines de l'arbuste. Les autres paramètres biochimiques du sol mesurés c'est-à-dire les pourcentages du carbone (C) et de l'azote (N) n'avaient pas montré de différences significatives entre les sols étudiés. Il faut noter aussi que l'analyse physique a montré que les sols prélevés à Saré yorobana sont sableux ($75,33\%$) avec un pourcentage de limon élevé ($16,37\%$).

Tableau 5. Caractéristiques chimiques des sols prélevés dans les zones sous et hors influence de *P. reticulatum*. Les données en ligne portant des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

Paramètres mesurés	Sols étudiés	
	<i>P. reticulatum</i>	Témoin
Humidité sol (%)	1,32 ^a	0,59 ^b
NH ₄ ⁺ (µg N-NH ₄ ⁺ / g sol)	0,46 ^a	0,34 ^b
NO ₃ ⁻ (µg N-NO ₃ ⁻ / g sol)	2,24 ^a	1,7 ^b
P. assimilable (ppm)	4,55 ^a	3,38 ^b
pH eau	5,91 ^b	6,3 ^a
pH KCl	5,01 ^a	4,79 ^b
C (%)	0,23 ^a	0,28 ^a
N (%)	0,02 ^a	0,03 ^a

III. 2. Structure et diversité des communautés bactériennes du sol sous *P. reticulatum*

III. 2 1. Analyse de la structure des communautés bactériennes par comparaison de profils DGGE

L'étude de la structure des communautés bactériennes des sols sous influence de *P. reticulatum* et sols nus était faite par amplification (PCR) de la région 16S suivie d'une dénaturation par la technique DGGE. L'analyse (Figure 18), montrait visuellement des profils DGGE relativement similaires par le nombre de bandes. Cependant, des différences ont été notées sur la base de l'intensité des bandes DGGE. Ces différences ont été plus marquées au milieu et dans la partie inférieure des profils DGGE. La DGGE est reconnue comme une méthode semi-quantitative, de ce point de vue, les flèches «A et B» ont indiqué des bandes avec des intensités plus élevées dans les sols sous influence de *P. reticulatum* par rapport aux sols témoins. Mais, la flèche «C» a indiqué en bas du gel, une communauté en composition en «GC» très riche qui semble être fortement réprimée par la présence de l'arbuste *P. reticulatum*.

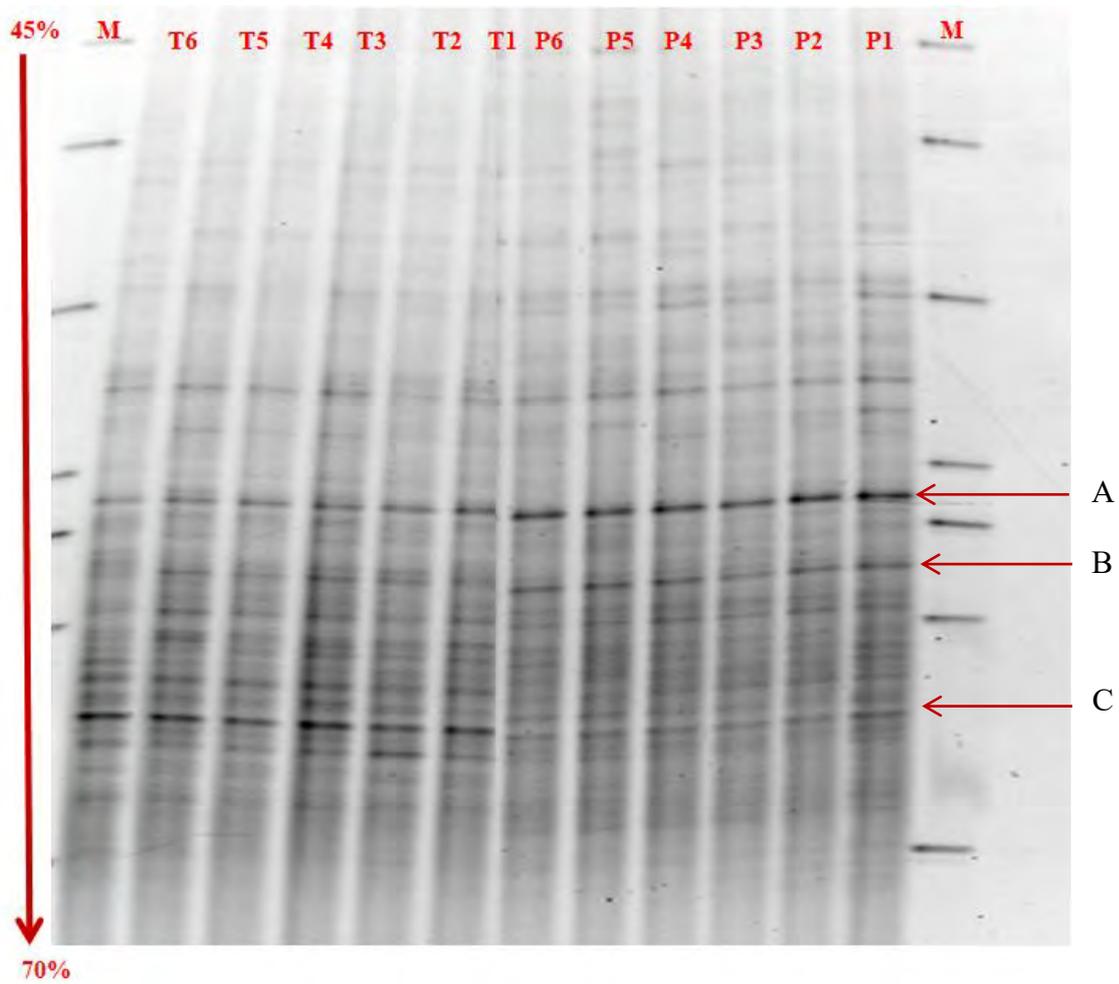


Figure 18. Empreintes DGGE montrant la structure des communautés bactériennes totales des échantillons de sols prélevés sous *P. reticulatum* et des témoins

III. 2 2. Analyse des indices de diversité

Par ailleurs, selon le principe «une bande égale une espèce», il est possible d'exprimer la richesse spécifique des échantillons de sol. Les indices Shannon (H) et de Simpson (D) permettant de calculer le niveau de diversité des espèces dans le milieu ont été estimés (Tableau 6). L'indice de diversité (H) n'a pas montré de différence significative entre les sols étudiés. Par ailleurs, les chances d'obtenir des individus différents ont été plus élevées avec les sols sous *P. reticulatum* car l'indice de diversité (D) se rapproche plus de 0, et devient même significatif comparé aux échantillons de sol témoin selon Fisher.

Tableau 6. Indices de diversité Shannon (H) et Simpson (D). Les données en ligne portant des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

Sols étudiés	H	D
<i>P. reticulatum</i>	3,700 ^a	0,026 ^b
Témoin	3,649 ^a	0,028 ^a

III. 2 3. Analyse globale de la structure des communautés sur R avec le package ade4TkGUI

La Figure 19 a montré l'analyse en composante principale des profils DGGE avec le package ade4TkGUI. L'analyse en composante principale a permis de montrer une nette séparation entre la structure des communautés bactériennes du sol qui sont très hétérogènes et abondantes sous la zone d'influence de l'arbuste *P. reticulatum* et celles des sols témoins qui sont plutôt compactes, homogènes et peu distribuées par rapport aux deux axes (P1: 33,36% et P2 : 19,85%).

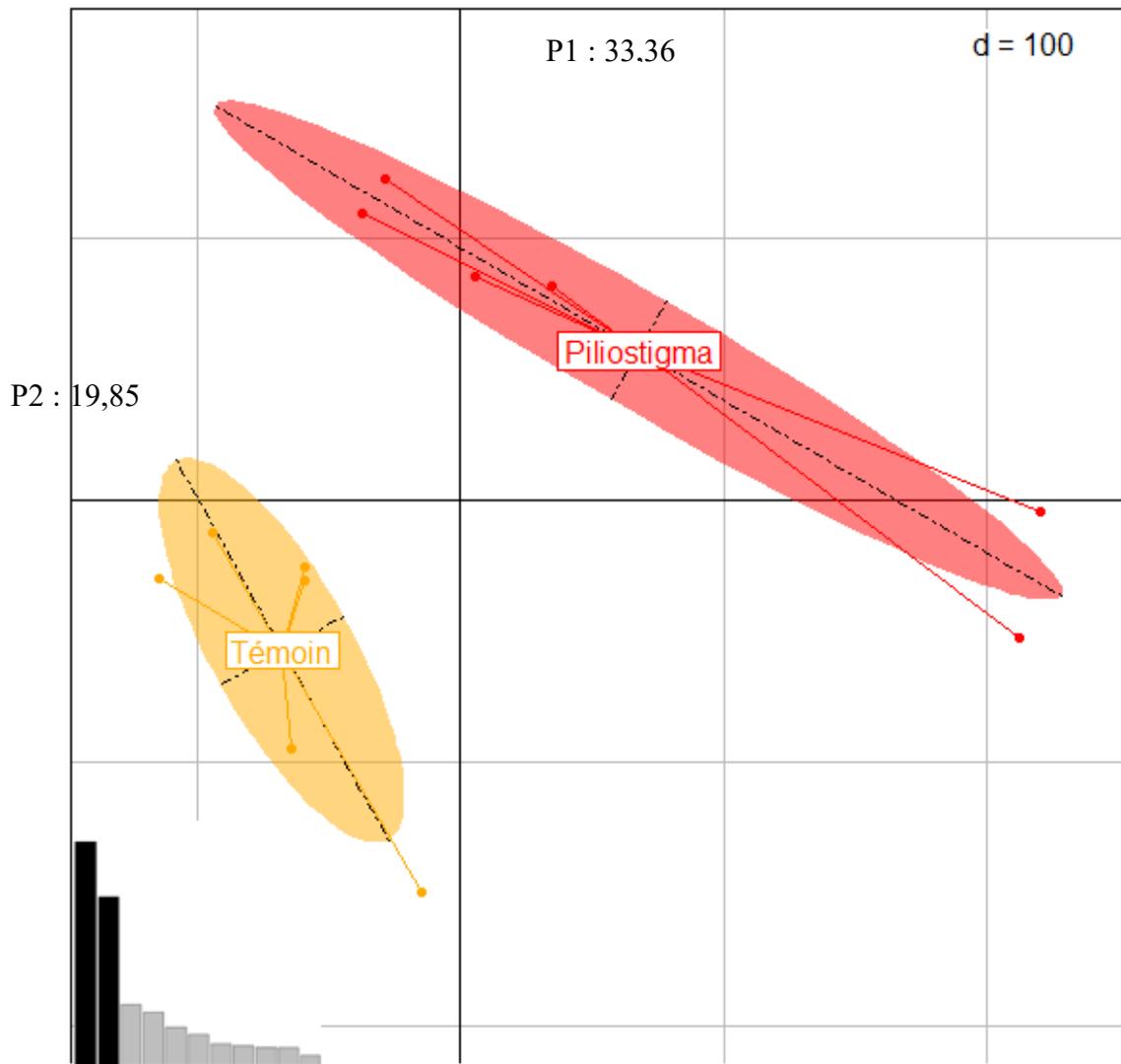


Figure 19. Analyse en composante principale (ACP) des données de «comparaison» de la DGGE

Le dendrogramme (Figure 20) de similarité obtenu avec le package ade4TkGUI à partir des données de comparaison de la DGGE a confirmé globalement l'analyse (ACP). En effet, elle a révélé 3 clusters : le premier cluster (CI) a regroupé 1 échantillon des sols témoins (T3) et 2 échantillons des sols prélevés sous *P. reticulatum* (P4 et P1). Ces échantillons se distinguaient nettement du reste des échantillons. Ensuite le deuxième cluster (CII) qui a rassemblé 4 échantillons des sols sous *P. reticulatum* (P2, P3, P5 et P6). Enfin le cluster III (CIII) qui a regroupé uniquement les échantillons des sols témoins (T1, T2, T4, T5 et T6). Toutefois le dendrogramme qui mettait en évidence le degré de similarité entre les échantillons des sols étudiés a montré une similarité très faible entre les 3 différents clusters.

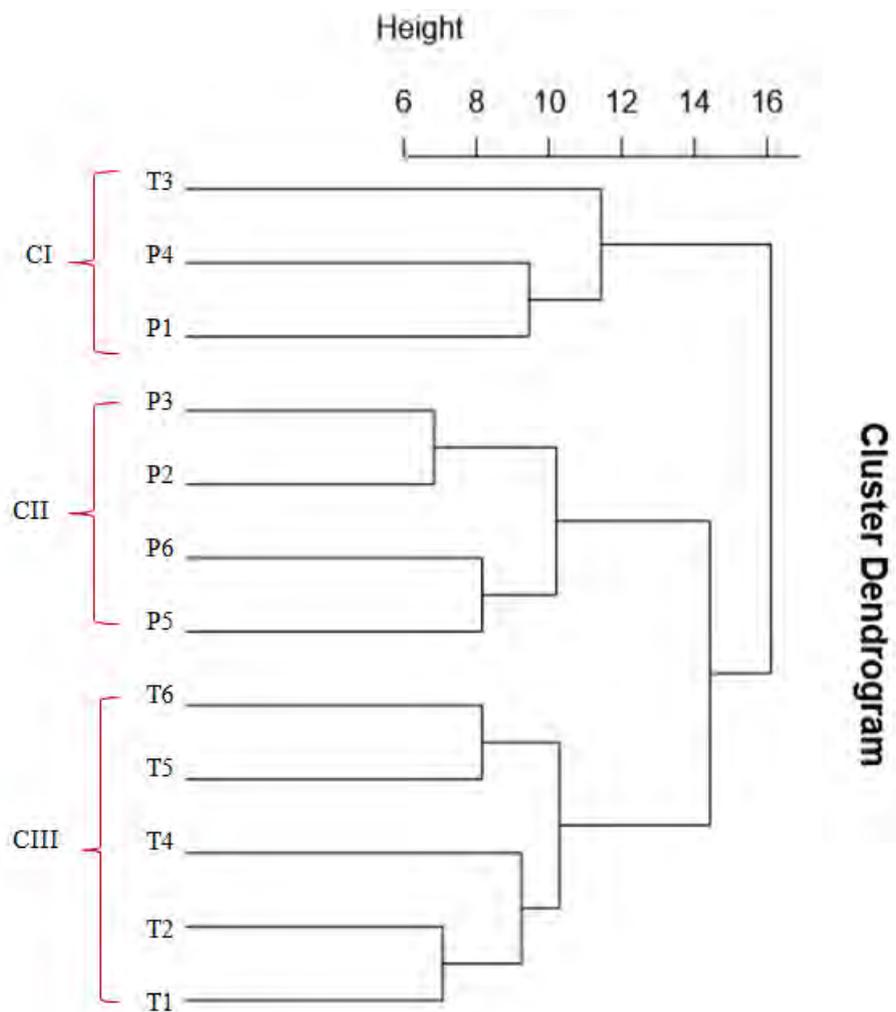


Figure 20. Dendrogramme similarité montrant les relations des profils DGGE entre les échantillons sous et hors influence de l'arbuste *P. reticulatum*

IV. Discussion

L'objectif de cette partie a été d'étudier l'impact de *P. reticulatum* sur le sol et pour cela les caractéristiques physico-chimiques des sols prélevés sous l'influence de *P. reticulatum* et des sols témoins (sols nus) ont été déterminées. L'analyse comparative des paramètres chimiques a montré que l'humidité du sol, le Phosphore assimilable, le nitrate et l'ammonium ont été significativement plus élevés dans les sols prélevés sous *P. reticulatum*. Toutefois le carbone total et l'azote total n'avaient pas montré de différences significatives entre les sols étudiés. Alors que les études antérieures dans les zones d'influence de *P. reticulatum* ont montré une augmentation significative des quantités (N, C et P) et également de l'azote minéral sous la canopée de l'arbuste (Diakhaté *et al.*, 2016a) en comparant les sols en présence et absence d'arbuste dans un champ de mil dans le bassin arachidier au Sénégal. Aussi (Dossa *et al.*, 2010 ; Delay *et al.*, 2017, Félix *et al.*, 2018) ont montré que les sols sous la canopée de *P. reticulatum* ont présenté des niveaux significativement plus élevés de N, C et P comparés aux sols témoins. Cependant, il est important de souligner aussi que les taux importants de (NH_4^+ et NO_3^-) dans notre site de prélèvement suggéraient une communauté nitrifiante très importante sous la rhizosphère de *P. reticulatum* comparés aux sols témoins. Diakhaté *et al.*, (2016b) en faisant une analyse comparative en présence et absence de *P. reticulatum*, ils ont montré à travers un test de permutation en régression multiple que l'azote inorganique (NH_4^+ et NO_3^-) a été fortement corrélé avec les communautés bactériennes du sol rhizosphérique de l'arbuste *P. reticulatum*. Ce qui est en accord avec les travaux de (Hernandez *et al.*, 2015 ; Félix *et al.*, 2018). Les auteurs ont souligné que cette communauté nitrifiante a été très abondante sous la rhizosphère de *P. reticulatum* comparée aux sols non rhizosphériques. En effet, les bactéries nitrifiantes sont souvent des bactéries qui possèdent la capacité d'utiliser l'ammonium ou le nitrite comme seule source d'énergie et d'effectuer la fixation autotrophe du CO_2 via le cycle de Calvin. Ces bactéries étaient anciennement regroupées au sein de la famille des Nitrobacteriaceae (Watson *et al.*, 1989) et séparées en deux groupes fonctionnels (nitrosantes et nitratantes).

L'analyse visuelle des profils des communautés bactériennes totales obtenues sur le gel PCR-DGGE a révélé une grande diversité relativement similaire par le nombre de bandes entre les sols étudiés. Alors que l'ACP a révélé une nette séparation entre les échantillons de sols de la zone sous influence de *P. reticulatum* et ceux des sols témoins. Ce qui suppose que l'arbuste *P. reticulatum* modifiait la structure et l'abondance de certaines communautés bactériennes. Ce résultat est en phase avec les résultats des travaux antérieurs faits sur l'arbuste. (Diedhiou *et al.*,

2007 ; Diakhaté *et al.*, 2013) ont obtenu des résultats similaires avec des profils DGGE. Ils ont montré que la structure des communautés bactériennes a été significativement très élevée dans les sols rhizosphériques de *P. reticulatum* comparée aux sols non rhizosphériques. D'ailleurs l'impact positif des arbustes sur les sols à travers la modification de la structure des communautés microbiennes a été démontré dans beaucoup de travaux (Delay *et al.*, 2017 ; Bachar *et al.*, 2012), respectivement sur l'arbuste *Guiera senegalensis* et sur des arbustes dans le désert de Negev au sud de l'Israël. Cette différence de structure pourrait toutefois être liée à la présence d'espèces bactériennes spécifiques à l'arbuste qui ont été favorisées par les conditions propices existantes (Tableau 5) dans la zone sous influence des racines de l'espèce. En effet, (Diakhaté *et al.*, 2016a) ont montré que non seulement l'arbuste améliore la microbiologie de la rhizosphère en augmentant la diversité et la composition des espèces bactériennes, mais aussi la biomasse microbienne, les champignons mycorhiziens, et des nématodes bénéfiques etc.

L'analyse a montré aussi que les profils des communautés bactériennes associés à l'arbuste *P. reticulatum* étaient plus abondants et plus diversifiés au centre du gel, plus ou moins en haut du gel et deviennent rares au bas du gel. En effet, le haut et le centre du gel DGGE regroupent généralement des espèces moins riches en «GC». De ce point de vue, l'arbuste favoriserait une sélection sur certaines communautés en augmentant sensiblement leur abondance. Dans cette étude les prélèvements ont été faits dans le même site et dans une même parcelle, ce qui suppose que les paramètres géographiques et environnementaux ne seraient pas responsables des différences constatées. Ainsi, il est bien établi que beaucoup de paramètres biotiques et abiotiques peuvent agir sur la structure des communautés bactériennes des sols tant en termes de diversité que d'effectifs/ abondance (Borneman *et al.*, 1996 ; Borneman & Triplett, 1997). Peiffer *et al.*, (2013) ont montré que les caractéristiques physico-chimiques du sol constituent des facteurs clés dans la structuration des communautés microbiennes des sols rhizosphériques. La présence végétale à travers l'exsudation racinaire (Carvalhais *et al.*, 2015 ; Micallef *et al.*, 2009) peut aussi induire des changements significatifs des structures des communautés bactériennes (Tiedje, 1999 ; Singh *et al.*, 2007). Bodelier *et al.*, (1997) estiment que les microorganismes présents dans le sol rhizosphérique sont de loin plus nombreux que dans le sol hors d'influence de la plante. Par ailleurs, le nombre et la nature de ces microorganismes dépendent en particulier de la composition et la concentration des exsudats racinaires (Grego *et al.*, 2003).

L'analyse des indices de diversité n'ont pas montré de différences significatives entre les sols étudiés. Ce résultat est très fréquent dans les études de diversité par l'approche DGGE, car des fragments d'ADN de différentes séquences peuvent avoir des caractéristiques de mobilité similaires dans le gel de polyacrylamide. Par conséquent, le principe «une bande égale une espèce» pourrait ne pas être justifié, c'est à dire une bande peut ne pas représenter forcément une espèce (Gelsomino *et al.*, 1999 ; Sekiguchi *et al.*, 2001) et une espèce bactérienne peut donner aussi des bandes multiples de séquences ARNr 16S légèrement différentes (Maarit Niemi *et al.*, 2001).

V. Conclusion

L'étude de la structure des communautés bactériennes par l'approche DGGE a permis de montrer une diversité de la structure des communautés bactériennes du sol sous *P. reticulatum*. L'humidité du sol, le Phosphore assimilable, le nitrate et l'ammonium ont été significativement élevés dans les sols prélevés sous influence de *P. reticulatum* comparés aux sols prélevés hors influence (sol nu) de l'arbuste. L'analyse du gel DGGE a permis de montrer que l'arbuste exerce une influence positive sur la composition de la population du sol en favorisant essentiellement une augmentation de l'abondance de certaines communautés bactériennes notamment celles moins riches en «GC». Toutefois, une communauté en composition très riche en «GC» semble être fortement réprimée par la présence de l'arbuste *P. reticulatum*. L'ACP a révélé aussi que les communautés bactériennes sont très hétérogènes et abondantes sous la zone d'influence de *P. reticulatum* par rapport à celles des sols témoins qui sont plutôt compactes et homogènes. Toutefois, l'approche utilisée s'avère efficace pour l'analyse comparative de la structure des communautés bactériennes du sol mais ne répond pas directement aux questions concernant la richesse ou l'abondance relative des OTU et l'identification taxonomique des groupes détectés.

**CHAPITRE IV. DIVERSITÉ MÉTAGÉNOMIQUE ET
INFLUENCE DES MÉTHODES D'EXTRACTION SUR LES
COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES ASSOCIÉES À *P.*
RETICULATUM COMPARÉES À CELLES DE *E. GUINEENSE***

Chapitre IV. Diversité métagénomique et influence des méthodes d'extraction sur les communautés bactériennes associées à *P. reticulatum* comparées à celles de *E. guineense*

I. Introduction

Il est bien établi que par les exsudats racinaires, des plantes exercent une sélection sur les communautés microbiennes du sol (Paterson *et al.*, 2007 ; Lloyd *et al.*, 2016). En retour, les microorganismes du sol, surtout ceux associés aux racines, jouent aussi un rôle fondamental dans la nutrition et la stimulation de la croissance des plantes et de la fertilité du sol. Ainsi, ils maintiennent la structure du sol et facilitent la dégradation de la matière organique, le recyclage des éléments nutritifs et la séquestration du carbone (Groffman & Bohlen, 1999). Dans les régions semi-arides, la fertilité des sols rhizosphériques des arbres et arbustes est souvent supérieure à celle dans les zones hors influence rhizosphérique (Xu *et al.*, 2012). Ainsi, la fertilité pourrait être non seulement corrélée à la présence des plantes mais aussi aux communautés microbiennes qui sont associées.

Cependant, il est souvent très difficile d'accéder à la diversité totale des communautés bactériennes du sol avec les moyens conventionnels du fait des biais liés à la mise en culture *in vitro* de certaines bactéries. Toutefois, le séquençage de l'ADN grâce aux nouvelles approches à haut débit a permis de franchir un palier important pour accéder et décrire la diversité bactérienne tant taxonomique que fonctionnelle en dépit des biais connus. Donc, l'approche métagénomique est extrêmement prometteuse en vue de l'analyse et de l'exploitation de la diversité génétique bactérienne du sol qui est un milieu complexe. Elle permet aussi une analyse d'un très grand nombre d'échantillons pour récupérer même les espèces à effectifs minoritaires (Hart *et al.*, 2015).

Dans ce chapitre, nous avons utilisé l'approche métagénomique, plus fine que l'approche «finger printing» utilisé dans le chapitre II, pour explorer la diversité bactérienne potentiellement associée aux deux espèces décrites dans les chapitres précédents : *P. reticulatum* et *E. guineense*. L'intérêt de ces espèces sur le plan économique et pharmaceutique n'est plus à démontrer. Elles sont toutes les deux d'une grande importance pour les populations locales et pour la fertilisation des sols pauvres.

Pour l'arbuste *P. reticulatum* son rôle dans la fertilité des sols et la réhabilitation des terres dégradées a été bien démontré par plusieurs études. Félix *et al.*, (2018) ont montré que la présence de *P. reticulatum* dans les zones semi-arides en Afrique de l'ouest améliore la productivité des cultures et les caractéristiques du sol. Par contre pour l'arbre *E. guineense*, une

étude réalisée et publiée depuis 1970 par l'Institut Fédéral Géobotanique (Université de Zürich) a montré que l'arbre est à l'origine des «îlots forestiers» en créant des conditions favorables à l'établissement d'autres espèces comme les *Commelinaceae*, les *Composeae* (*Aspilia rudis*), les arbustes et lianes par exemple : *Elaeis guineensis*, *Lannea acida*, *Leea guineensis*, *Tetracera alnifolia*, *Psychotria*, *Balanophoracée*, *Thonningia sanguinea* etc. Ces auteurs ont rapporté que la production d'azote minéral est plus importante sous recouvrement forestier de l'espèce, même quand le feu passe, comparée à la zone non couverte. Depuis cette date, il est rare de trouver des travaux qui confirment ou infirment ces résultats. Toutefois son utilisation en agroforesterie est assez limitée du fait de la toxicité des feuilles (Burkill, 1995) et aucune étude n'a été faite sur l'impact de l'arbre sur le sol et les communautés microbiennes qui y vivent.

D'autre part, des études ont démontré que l'efficacité de la mesure de la diversité des communautés microbiennes pourrait varier en fonction de la méthode d'extraction de l'ADN (Dimitrov *et al.*, 2017 ; Zielińska *et al.*, 2017). Ce qui laisse supposer que les méthodes d'extraction ne couvrent pas toutes les communautés bactériennes d'un échantillon donné avec la même efficacité. Donc dans le but d'obtenir une meilleure estimation de la diversité nous allons utiliser différentes méthodes d'extraction pour évaluer (Figure 21) :

- i. l'effet sur la structure des communautés bactériennes du sol par la technique RISA, et
- ii. l'impact de *P. reticulatum* et *E. guineense* sur les communautés bactériennes totales par le séquençage Miseq.

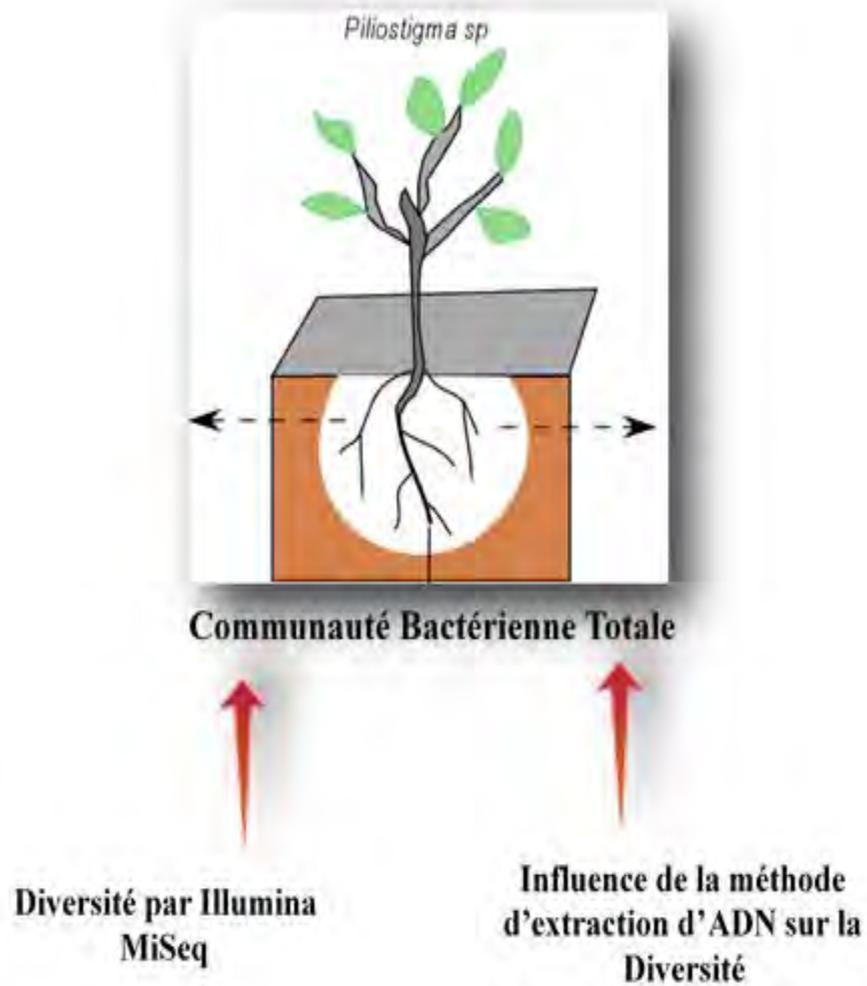


Figure 21. Approche pour évaluer la diversité métagénomique associée à *P. reticulatum*

II. Matériel et Méthodes

II. 1. Site d'étude et échantillonnage

Les échantillons de sols utilisés dans cette étude ont été prélevés dans le même site et dans les mêmes conditions que précédemment (chapitre III). Ainsi, du sol a été prélevé sous six (6) arbustes de *P. reticulatum*, sous six (6) plantes de *E. guineense* comme témoin positif et six (6) prélèvements sol nu qui nous ont servis de témoin négatif. Et pour chaque pied 4 prélèvements au tour de la plante ont constitué un échantillon composite.

II. 2. Analyse physico-chimique des sols

La caractérisation physico-chimique des sols a été effectuée par des méthodes conventionnelles au Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) de l'IRD et au Laboratoire Mixte International Intensification Ecologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest (LMI IESOL, Campus IRD-ISRA de Bel-Air, Dakar).

- Texture du sol

La texture, analyse de la répartition des particules minérales en fonction de leur taille, a été déterminée par tamisage, sédimentation et prélèvement à la pipette de Robinson (Aubert *et al.*, 1954). Dix grammes de sol tamisés à 2 mm ont été soumis à une attaque par l'eau oxygénée (H_2O_2 ; 50 ml diluée à 30%) afin d'éliminer la matière organique. Les particules minérales ont été ensuite dispersées par ajout de 25 ml d'une solution diluée de pyrophosphate de sodium 65 g L^{-1} . La solution obtenue a été tamisée sous flux d'eau à 200 et à 50 μm pour obtenir les fractions les plus grossières (sables et limons grossiers) et les particules les plus fines (limons fins et argiles) ont été prélevées après sédimentation dans une allonge. Les fractions obtenues ont été pesées après séchage à l'étuve et la proportion relative de chaque fraction granulométrique a été calculée afin de déterminer la texture des échantillons de sol.

- pH du sol

Le pH des échantillons de sol a été mesuré dans l'eau selon le ratio 1/2.5 (p/v) à l'aide du pH-mètre (Delta 320, Mettler Toledo, Suisse).

- Carbone et de l'azote total

Les dosages du carbone et de l'azote total ont été effectués par combustion sèche à l'aide d'un analyseur élémentaire CHN (EA1112 Séries, Thermo Finnigan, Italie) à une température de 1800°C. Les composés obtenus après combustion passent successivement dans le catalyseur d'oxydation (900°C) et dans la colonne de réduction (750°C). Le carbone a été alors transformé en gaz carbonique et l'azote en monoxyde d'azote. Ils ont ensuite été séparés dans une colonne

de chromatographie en phase gazeuse utilisant l'hélium et équipé de deux détecteurs. L'ammonium et le nitrate ont été déterminés par colorimétrie avec la solution de KCl (1 M) par flux. Après filtration à travers un filtre en fibre de verre, l'ammonium-N et le nitrate-N ont été déterminés respectivement par les méthodes salicylate-nitroprusside et hydrazine-sulfanilamide (Mulvaney, 1996).

II. 3. Extraction de l'ADN des sols avec 3 méthodes (kits)

L'ADN des sols prélevés dans les zones d'influence de *P. reticulatum*, de *E. guineense* et du sol nu (hors couvert) a été extrait en utilisant 3 méthodes (kits) d'extraction d'ADN (MoBio PowerSoil, NucleoSpin soil Macherey Nagel et FastDNA SPIN for soil) suivant les recommandations des fournisseurs.

II. 3 1. Méthode avec le PowerSoil DNA Isolation Kit

Le principe du kit MoBio repose sur une lyse à la fois mécanique et chimique. Une quantité de 0,25 g de sol de chaque échantillon a été mise dans un tube contenant à la fois des micro-grains ainsi qu'un tampon de lyse (éliminant également d'éventuels agents inhibiteurs de PCR). Le tube a été agité durant une dizaine de minutes afin d'homogénéiser le mix et de «casser» les cellules bactériennes. L'ADN génomique libéré dans la matrice a été ensuite recueilli et fixé sur une membrane en silice sur colonne, puis lavé, avant d'être élué pour la suite des applications. Au final, l'ADN extrait a été récupéré dans environ 100 µl de tampon d'éluion (Tris 10 mM).

II. 3 2. Méthode avec le NucleoSpin soil Macherey Nagel Isolation Kit

Ce kit repose sur le même principe que le premier, il fait étape d'une lyse mécanique et chimique avec l'utilisation du tampon «SL1» et «enhancer SX». La lyse a été faite dans des tubes «NucleoSpin Bead» par un vibrobroyeur avec 0.5g de sol. Ensuite une solution «SL3» a été ajoutée dans le surnageant avant d'être incubé et centrifugé. La phase liquide a été transférée dans une colonne «NucleoSpin inhibitor removal». Les conditions de liaisons de l'ADN sur la membrane ont été favorisées avec l'ajout du tampon «SB». Puis 4 lavages avec les solutions (SB, SW1 et SW2 deux fois) ont été réalisés. Chaque lavage a été suivi d'une phase de centrifugation. Le séchage de la membrane de silice et une éluion avec 100 µl de la solution «SE» ont été faits.

II. 3 3. Méthode avec le FastDNA Isolation Kit

Cette méthode d'extraction combine aussi deux différents types de lyses cellulaires : une lyse mécanique par broyage et une lyse enzymatique. Un «lysing matrix tube», contenant des billes de céramique et de silice, a été ajouté successivement une prise d'essai de 0,5 g de sol, 978 µl de tampon Phosphate de Sodium et 122 µl de tampon MT (MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Les tubes ont été ensuite placés dans un Vibro-broyeur (Fast Prep de MP Biomedicals, USA) afin de fragiliser la paroi bactérienne et d'accéder à l'ADN des cellules. Après la phase de broyage, l'ADN ainsi que les débris cellulaires, les acides humiques, les protéines etc. ont été récupérés. La précipitation des protéines avec le PPS (Protein Precipitation Solution) a été faite. L'ADN récupéré avec le Binding Matrice, a été lavé avec de l'éthanol et élué dans 100 µL d'eau stérile exempte de désoxyribonucléase (DNase free).

II. 3 4. Quantification de l'ADN obtenu

Après l'extraction, tous les extraits d'ADN ont été contrôlés sur un gel agarose (1,5% p/v) et quantifiés au Qubit® fluorometer (invitrogen) avec le kit Quant-iT™ dsDNA BR assays (invitrogen) selon le protocole fourni par le fabricant (Figure 22).

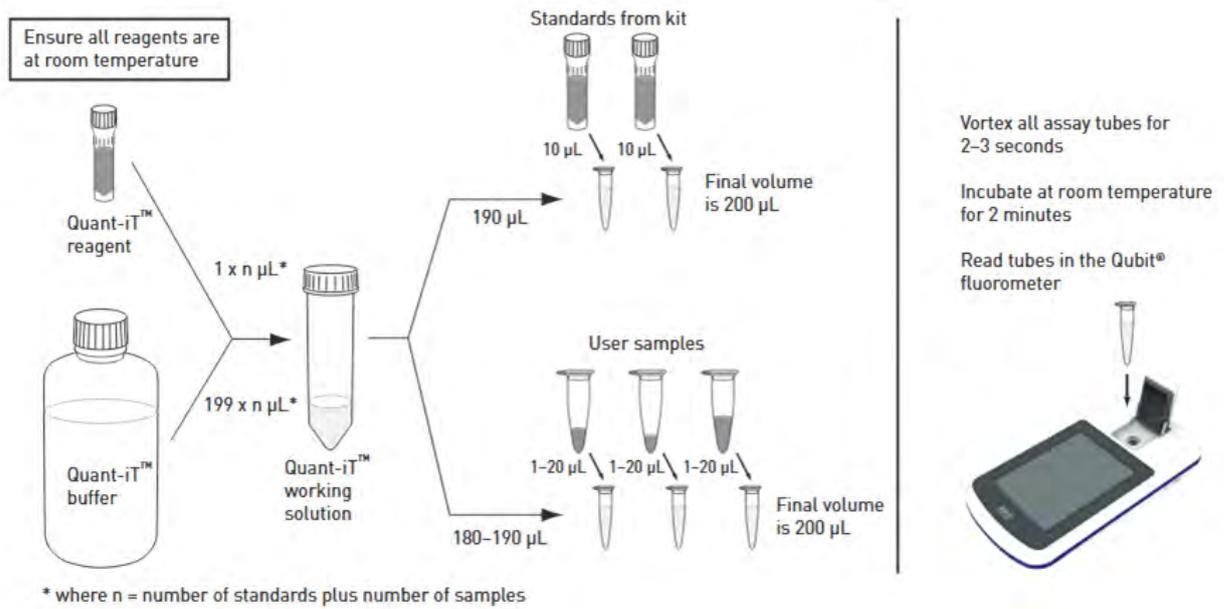


Figure 22. Méthode de quantification de l'ADN au Qubit[®] fluorometer (invitrogen) avec le kit Quant-iT[™] dsDNA BR

II. 4. Amplification de la région intergénique 16S-23S

La région intergénique (IGS) localisée entre la petite et la grande sous unité du gène ADNr a été amplifiée avec les amorces suivantes : S-D-Bact-1522-b-S-20 (petite sous unité, 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') et L-D-Bact-132-a-A-18 (grande sous unité, 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') (Normand, 1996). Les séquences amplifiées contiennent l'IGS plus approximativement 150 pb correspondant aux 20 nucléotides de l'amorce S-D-Bact-1522-b-S-2 et environ 130 pb du gène 23S rDNA. Les amplifications à partir des échantillons d'ADN ont été réalisées à l'aide du kit Illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) qui combine une Taq ADN polymérase recombinante de haute qualité, une protéine activatrice recombinante Hot Start, et des nucléotides (sous forme d'une bille contenue dans un tube 0.2 ml). Seules les amorces (à 10 mM), de l'eau et la matrice d'ADN ont été rajoutées pour compléter la solution réactionnelle. Les conditions PCR utilisées sont les suivantes : une phase de préchauffage à 94°C pendant 5min, suivi de 30 cycles : de dénaturation (94°C pendant 15s), d'hybridation (55°C pendant 30s) et d'élongation (72°C pendant 1 min), et une phase terminale à 72°C pendant 2 min.

II. 4 1. La RISA des communautés bactériennes des échantillons de sol

- Préparation des puces Agilent

Les produits d'amplification ont été ramenés à la même concentration avant d'être déposés dans les puits des puces du kit Agilent DNA 1000 suivant les recommandations du fabricant. D'abord, le «Gel Dye Mix» a été préparé en mélangeant un tube de «Gel Matrix » avec 15 µl de «Dye concentrate» puis une puce DNA 1000 constituée de 16 puits (3 destinés au gel, 12 aux échantillons et 1 pour le ladder) a été placée dans une station de préparation. Un volume de 9 µl de ce gel a été déposé dans l'un des puits destiné au gel et à l'aide d'une seringue vissée sur la station de préparation, le gel a été distribué dans tous les puits pendant 1mn. Ensuite 9 µl du gel a été mis dans les 2 autres puits du gel, puis 5 µl de marqueur vert dans les 12 puits destinés aux échantillons et dans le puits du ladder. Un volume 1 µl du marqueur jaune a été rajouté dans le puits du ladder etenfin pour chacun des puits destinés à l'ADN, 1 µl d'amplifiat d'ADN a été mis. La puce a été voltexée à 2400 rpm pendant 1mn et placée dans le bioanalyseur.

- Migration des amplifiats sur Bioanalyseur

Les profils RISA ont été obtenus à l'aide du Bioanalyseur 2100 (Agilent, Santa Clara, CA). Le Bioanalyseur, basé sur des micro-flux, détecte à l'aide de micro-capillaires la fluorescence

des différentes bandes au cours du temps. Le logiciel 2100 expert convertit la fluorescence en électrophérogramme (Figure 23, 24).

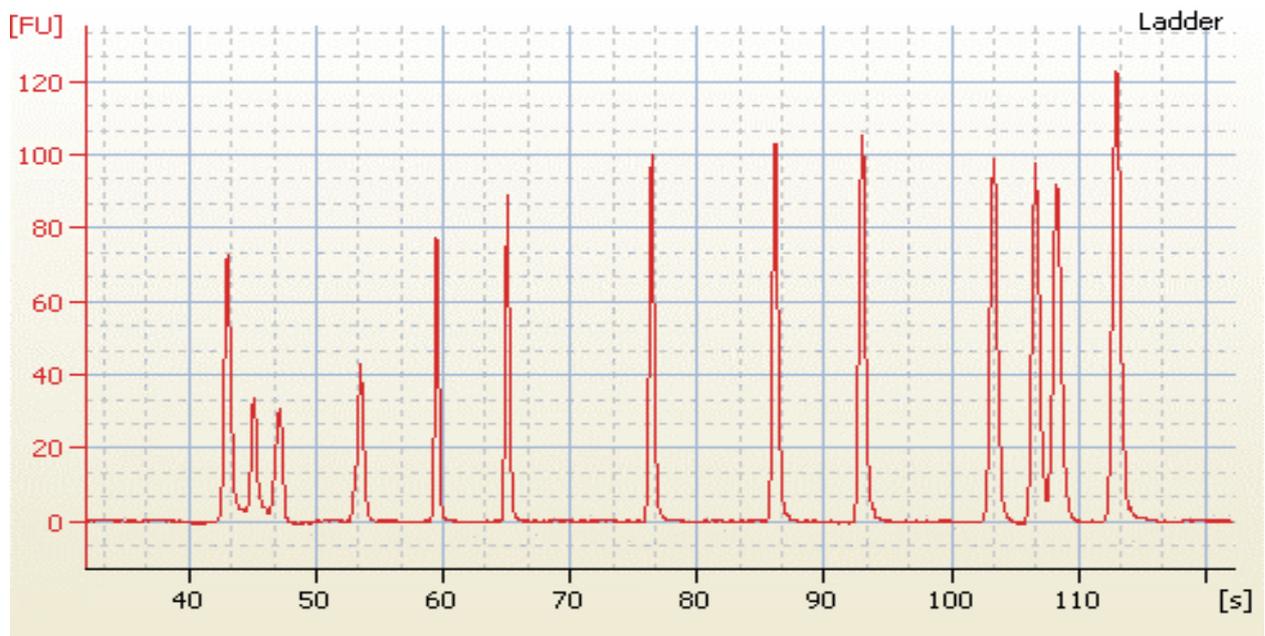


Figure 23. Type d'électrophorégrammes obtenu avec un Ladder

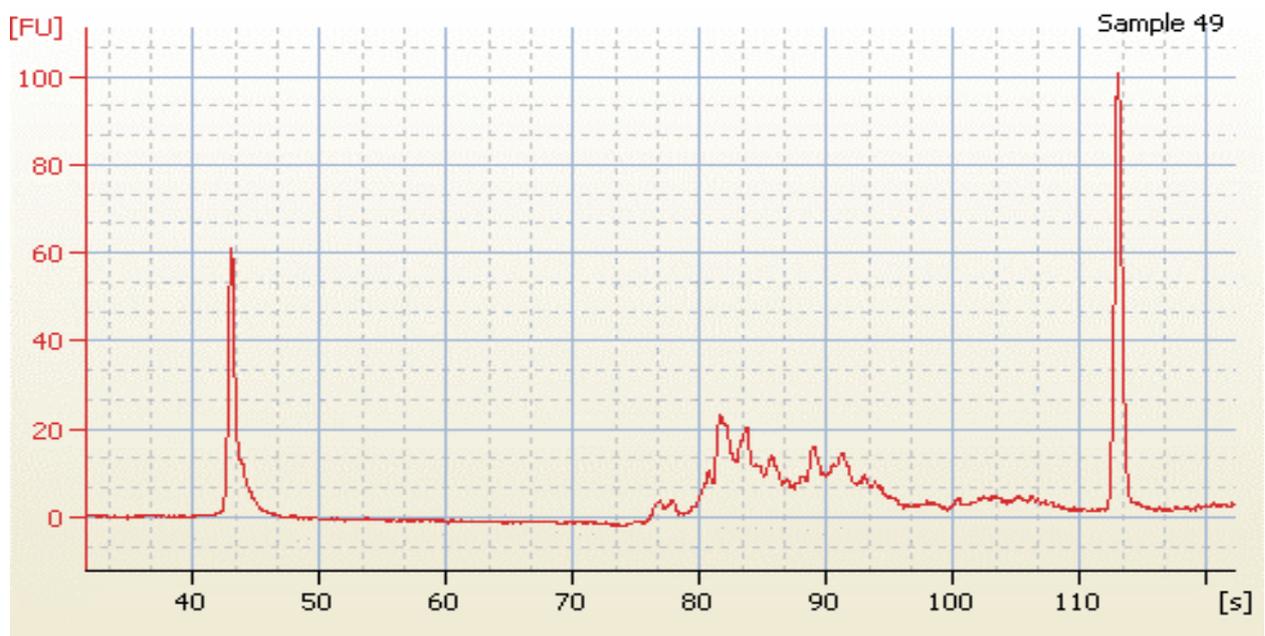


Figure 24. Type d'électrophorégrammes obtenu avec un l'échantillon

- Traitement de l'information

Les pics obtenus représentent les différentes tailles de fragment, et la hauteur de ces pics traduit la proportion relative de ces fragments dans le produit total. Les données RISA obtenues à l'aide du logiciel «Bioanalyseur» ont été normalisées. Ainsi, la ligne de base a été corrigée avec le logiciel «Bioanalyseur Expert» pour obtenir une ligne de base uniforme. Les données ont été exportées en «fichier csv» et tous les profils (gel et électrophorégrammes) ont été alignés en même temps sur «RisaAligner» (Figure 25). Pour ce faire un marqueur de référence a été choisi, l'objectif de ce logiciel est d'aligner chaque marqueur avec la référence.

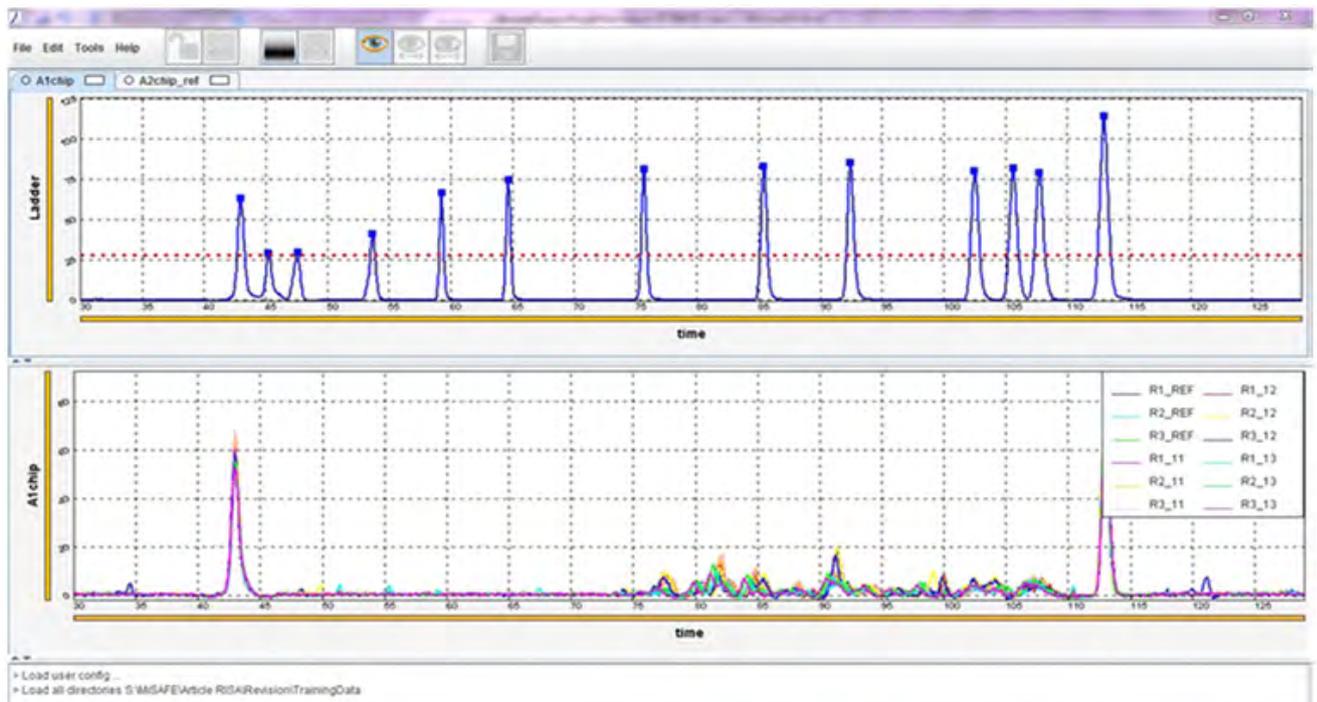


Figure 25. Alignement des profils sur le logiciel RisaAligner

II. 4 2. Analyse des profils RISA

Les données ont été exportées en fichier Excel et analysées avec le logiciel R. Les analyses en composante principale (ACP) obtenues à partir des données normalisées RISA ont été utilisées pour comparer les différences de structure des communautés bactériennes des traitements. Les analyses (ACP) ont été réalisées à l'aide du logiciel ADE-4 software (Thioulouse, 1997).

II. 5. Amplification V3-V4 de la région 16S génomique

La partie hypervariable V3-V4 de la région 16S de l'ARNr de chaque échantillon a été amplifiée en utilisant l'amorce sens 16S Amplicon TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG et l'amorce anti sens 16S Amplicon GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C (Klindworth *et al.*, 2012). Les PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25 µl avec 2.5µl de ADN génomique, 0.5 µl de l'amorce sens (10 µM), 0.5µl de l'amorce anti sens (10 µM), 0.5µl Taq Titanium (50x), 2.5µl tampon Taq (10x) et 18µl d'eau (qq). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : une phase de préchauffage à 95°C pendant 3 min, suivi de 25 cycles : de dénaturation (95°C pendant 30s), d'hybridation des amorces (55°C pendant 30s) et d'élongation (72°C pendant 30s), et une phase terminale (72°C pendant 5 min).

II. 5 1. Purification et quantification des ADNs au thermo scientific multiskan

Les produits d'amplification ont été déposés sur un gel de 2%, faits migrer à 100 Volt pendant 60 min et puis purifiés avec le Kit de purification «GE Healthcare illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification» selon les recommandations du fabricant. D'abord, les bandes (1500 pb environ) ont été découpées et pesées (à environ 100 mg), 300 µl du tampon de capture (type 3) a été rajouté, puis les bandes ont été incubées à 60°C jusqu'à ce que le gel soit complètement fondu. Le tout a été transféré dans la colonne MicroSpin GFX. Après centrifugation, l'ADN lié à la colonne a été lavé avec 500 µl du tampon (type 1), ensuite élué dans du tampon (type 4) et quantifié au thermo scientific multiskan (Software 4.0 for Microplate Readers RE, ver. 4.0.1.136).

II. 6. Séquençage massif du 16S avec la technologie Illumina MiSeq

Tous les échantillons purifiés ont été séquencés au laboratoire (Ampère) par le séquenceur Illumina MiSeq. D'abord, la fixation des indices et adaptateurs de séquençage Illumina a été réalisée en utilisant 5µl de produits PCR, 5µl de l'index amorcel Illumina Nextera XT (N7xx), 5µl de l'index amorce 2 Nextera XT (S5xx), 25µl de 2x KAPA HiFi Hot Start Ready Mix, et 10µl de l'eau PCR (Ultra pure MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). Le programme est le suivant : 95°C pendant 3 min, suivi par 8 cycles de 95°C pendant 30s, 55°C pendant 30s, et 72°C pendant 30s, et une extension finale de 72°C pendant 5 min. Pour vérifier la qualité et la distribution de taille des bandes, un contrôle qualité des produits PCR a été fait avec le «Bioanalyseur 2100 Agilent 1000 DNA». Les produits PCR ont été quantifiés, normalisés et mélangés. Le séquençage a été effectué en utilisant le Kit de réactif MiSeq dans le système Illumina MiSeq. Tous les échantillons ont été multiplexés et séquencés dans Illumina MiSeq en utilisant 2 x 300 pb appariées. L'analyse des images a été effectuée directement sur le MiSeq.

II.7. Traitement et analyse bio-informatique des données

Les séquences fastq démultiplexés sorties de Miseq ont été analysées en utilisant le logiciel QIIME (Quantitative Insight In Microbial Ecology) version 1.8 (Caporaso *et al.*, 2011). D'abord un "nettoyage" des séquences a été effectué car les 50 dernières bases des séquences sont souvent de mauvaise qualité. Ensuite, la fonction «fastx_trimmer» a été utilisée pour éliminer les séquences de faible qualité (erreur de séquençage, séquences courtes etc.). De même, les séquences chimères ont été soustraites de l'analyse avant que celles restantes ne soient attribuées à un échantillon. Ensuite la fonction «pandaseq» (Masella *et al.*, 2012) a été utilisée pour assembler les séquences de même échantillons. Les 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 minimum de 80%. (Caporaso *et al.*, 2010). Pour éviter les biais, les échantillons dont leur nombre de séquences est inférieur à (10000) ont été éliminés des jeux de données. 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 (Ribosomal Database Project) (Cole *et al.*, 2014) avec un pourcentage de similarité de 80%. Les indices de diversité alpha (nombre d'OTUs, indice de Chao1, indices de Shannon et Simpson's etc.) ont été calculés en tirant de manière répétitive

dans chaque échantillon (raréfaction) pour corriger l'effet éventuel sur ces paramètres de la variabilité du nombre de séquences entre les échantillons. La taxonomie a ensuite été attribuée à chaque OTU représentatif utilisant le classificateur de base de données «Greengenes» avec un seuil de support minimum de 97%.

II. 8. Analyse statistique

Les données de la diversité alpha (nombre de séquences, indices de diversité) et de l'assignation taxonomique ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA). Les moyennes de chaque variable ont été comparées en utilisant le test de Tukey (HSD) au seuil de significativité de 5%.

III. Résultats

III. 1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Comme souligné dans le chapitre précédent, les sols de la zone Saré Yorobana sont sableux avec un pourcentage de limon élevé. Ainsi, la composition chimique (Tableau 7) des sols sous influence rhizosphérique de (*P. reticulatum* et *E. guineense*) et des sols témoins a été analysée et comparée. Le pourcentage de l'humidité du sol et la valeur du phosphore assimilable ont été significativement ($P < 0,05$) plus élevés sous *P. reticulatum* comparés aux sols prélevés sous *E. guineense* et des sols témoins hors couverts. Le NH_4^+ a été significativement ($P < 0,05$) plus élevé dans les sols prélevés sous la zone d'influence de *P. reticulatum* comparé aux sols témoins. Par contre les autres paramètres n'ont pas montré de différence significative entre les sols étudiés.

Tableau 7. Propriétés physico-chimique des sols étudiés

Paramètres mesurés	Sols étudiés		
	<i>P. reticulatum</i>	<i>E. guineense</i>	Témoin
Humidité sol (%)	1,32 ^a	0,65 ^b	0,59 ^b
NH_4^+ ($\mu\text{g N-NH}_4^+$ / g sol)	0,46 ^a	0,42 ^{ab}	0,34 ^b
NO_3^- ($\mu\text{g N-NO}_3^-$ / g sol)	2,24 ^{ab}	3,26 ^a	1,7 ^b
P. assimilable (ppm)	4,55 ^a	3,83 ^b	3,38 ^b
pH eau	5,9 ^b	5,68 ^c	6,26 ^a
pH KCl	5,01 ^a	4,56 ^c	4,79 ^b
C (%)	0,23 ^a	0,28 ^a	0,28 ^a
N (%)	0,02 ^a	0,03 ^a	0,03 ^a

III. 2. Qualité de l'ADN obtenu selon la méthode d'extraction

La quantification au Qubit® fluorometer (invitrogen) avec le kit Quant-iT™ dsDNA BR assays (invitrogen) des ADNs obtenus avec les trois méthodes a révélé une variation de la concentration d'ADN en fonction de la méthode d'extraction utilisée (Figure 26).

La méthode FastDNA a présenté les meilleures concentrations (100% des échantillons) sur l'ensemble des sols étudiés et des échantillons traités excepté l'échantillon N°6 (T6) des sols témoins qui a montré une faible concentration avec le kit FastDNA (13,8 ng/ml), comparée au kit MoBio (24,9 ng/ml) et au kit NucleoSpin (5,93 ng/ml) ou la concentration est moins importante (Figure 25). Cependant la (Figure 27) a montré une bonne qualité de l'ADN, sur tous les échantillons des sols étudiés, quantifiée au thermo scientific multiskan après purification. La tendance a été plus ou moins changée après purification, qui a révélé que la concentration d'ADN obtenu était toujours plus importante avec le kit FastDNA mais seulement avec (55,6% des échantillons au lieu de 100% avant purification), suivi de NucleoSpin (33,3% des échantillons) et enfin MoBio (11,1% des échantillons). Ce qui laisse penser que la méthode d'extraction peut impacter sur la concentration de l'ADN final. En outre, l'amplification de la région 16S et de l'intergène (16S-23S) a été possible avec les extraits provenant de tous les kits. Des bandes claires ont été obtenues sur tous les échantillons.

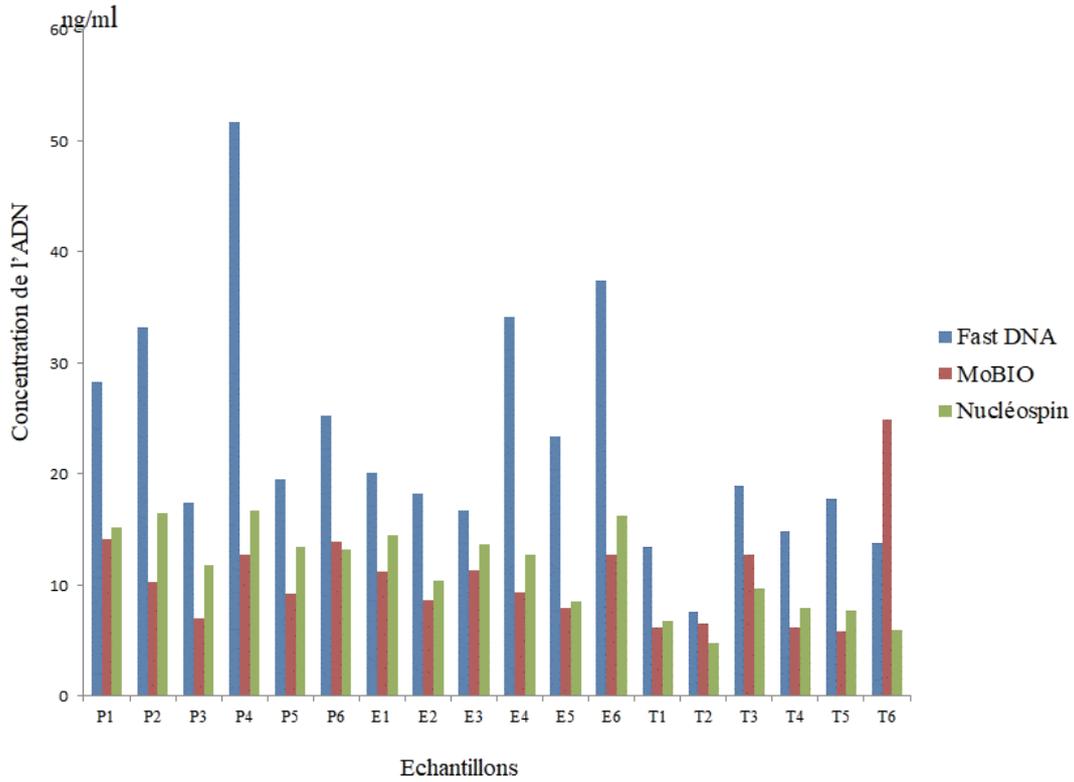


Figure 26. Quantification de l'ADN non purifié au Qubit

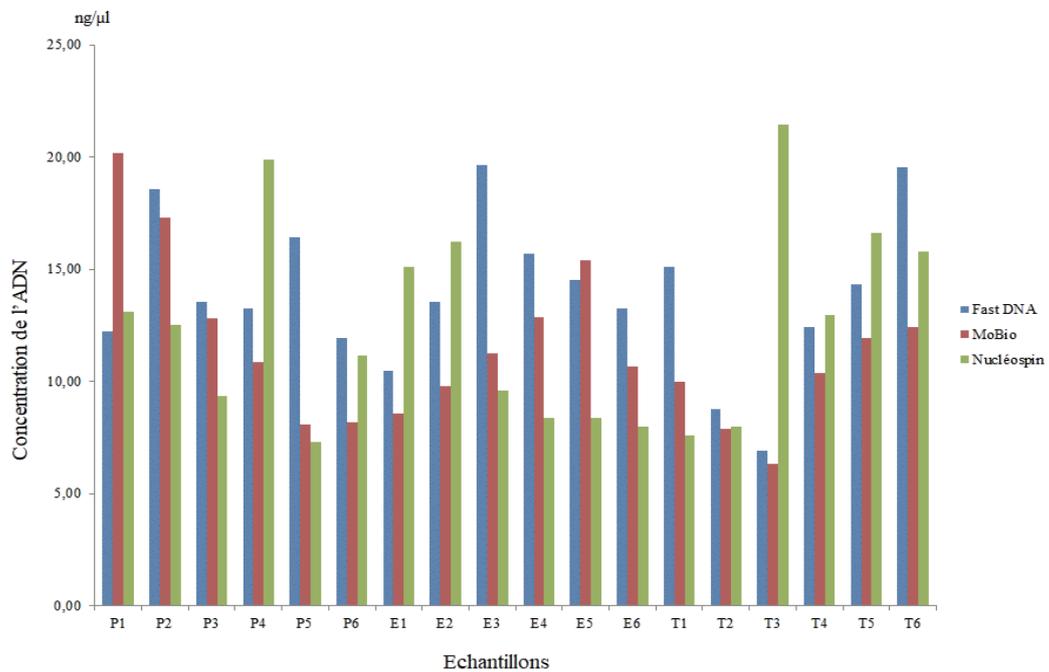


Figure 27. Quantification de l'ADN après purification au thermo scientific multiskan

III. 3. Analyse des données RISA de l'intergène 16S-23S

III. 3 1. Analyse des profils RISA selon la méthode d'extraction

Dans le but de comparer les méthodes (Kits) d'extraction, une première analyse a été faite sur la base d'une amplification de l'espace intergénique bactérien via la technique RISA. L'analyse des profils des 3 gels RISA obtenus a révélé une variation de l'intensité des bandes observées pour un même échantillon de sol. Alors que le nombre de bandes présente dans les profils d'un même échantillon semble être le même quel que soit la méthode (kit) d'extraction d'ADN utilisée. L'analyse globale des profils a montré aussi une différence de fluorescence d'une méthode d'extraction à l'autre ; le NucleoSpin et le MoBio (Figure 28, 29, 30) ont une fluorescence au niveau des bandes plus importante comparée au kit FastDNA (Figure 28, 29, 30).

L'amplification du marqueur l'intergénique, a permis aussi, au vu de ces 3 gels, d'avoir une première idée de la biodiversité sous l'arbuste *P. reticulatum* et sous l'arbre *E. guineense* comparée aux sols témoins. Pour chaque échantillon donné, plusieurs bandes ont été observées, ce qui suggère la présence de communautés bactériennes différentes, particulièrement sous la zone d'influence de *E. guineense*, où la diversité des communautés semble être plus importante et plus hétérogène.

L'analyse a révélé aussi que les profils obtenus avec les échantillons prélevés sous *E. guineense* ressemblaient beaucoup à ceux des témoins, contrairement aux profils de l'arbuste *P. reticulatum* qui semblent être différents à ceux des témoins. Cependant les fragments sont trop petits et trop complexes ce qui ne nous permettait pas de faire une interprétation poussée. Afin de compléter ces observations, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée.

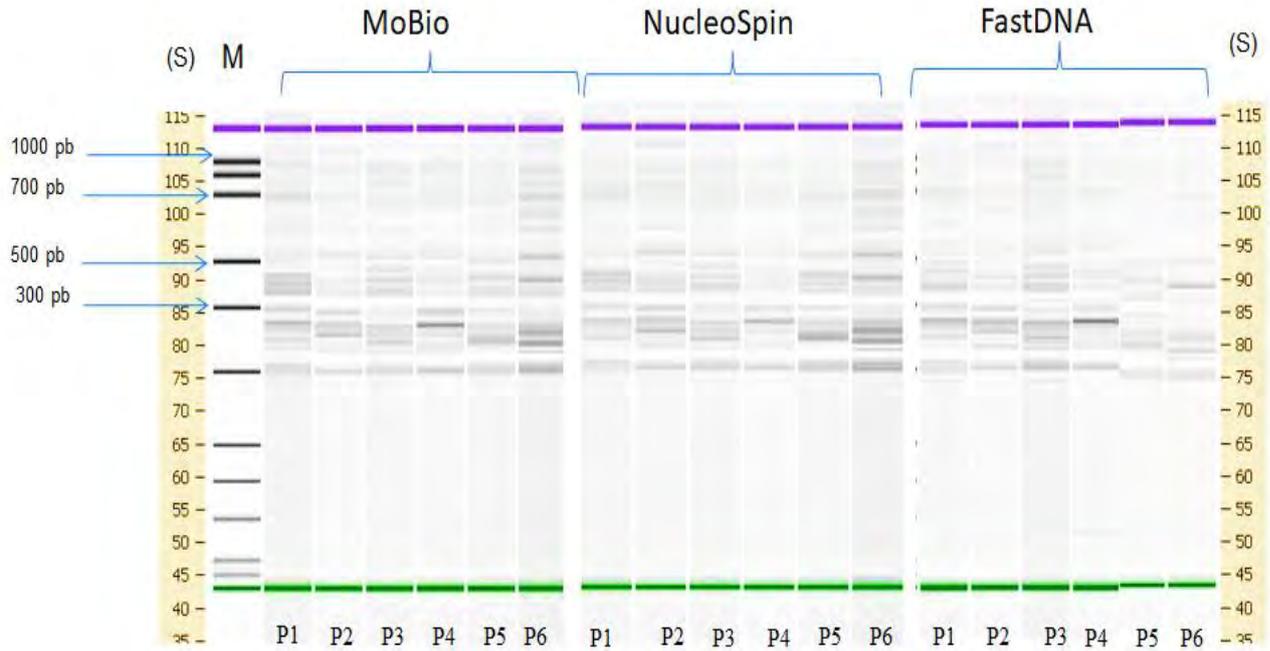


Figure 28. Profils RISA des échantillons de *P. reticulatum* extraits avec les 3 kits utilisés

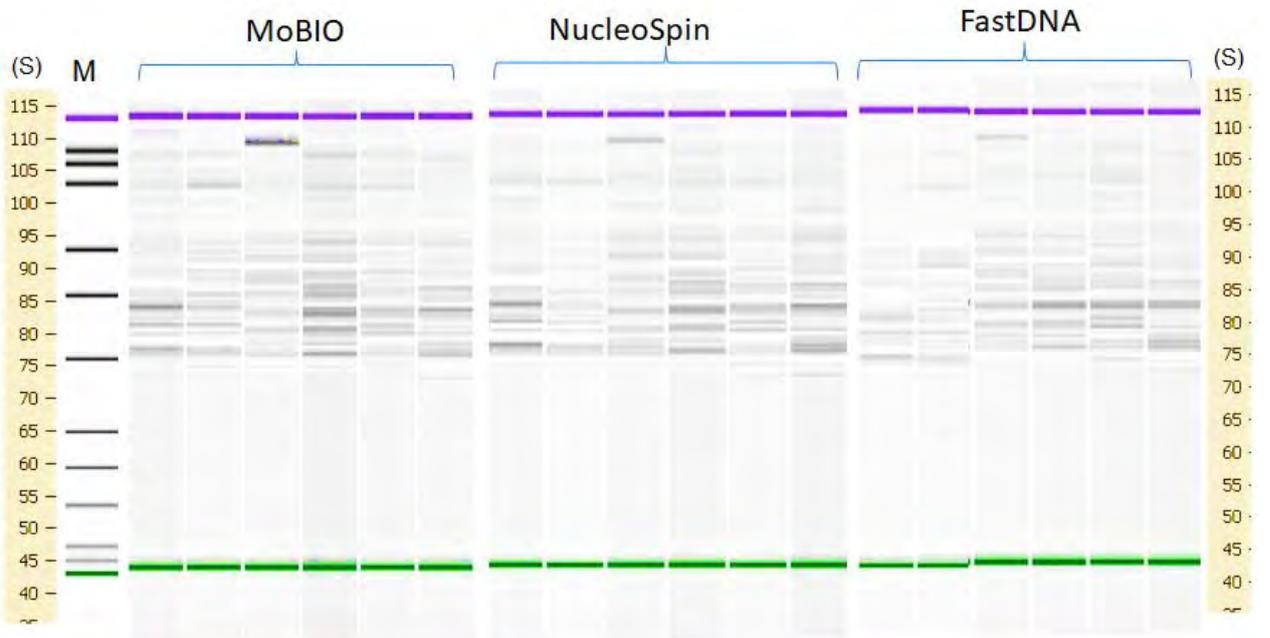


Figure 29. Profils RISA des échantillons de *E. guineense* extraits avec les 3 kits utilisés

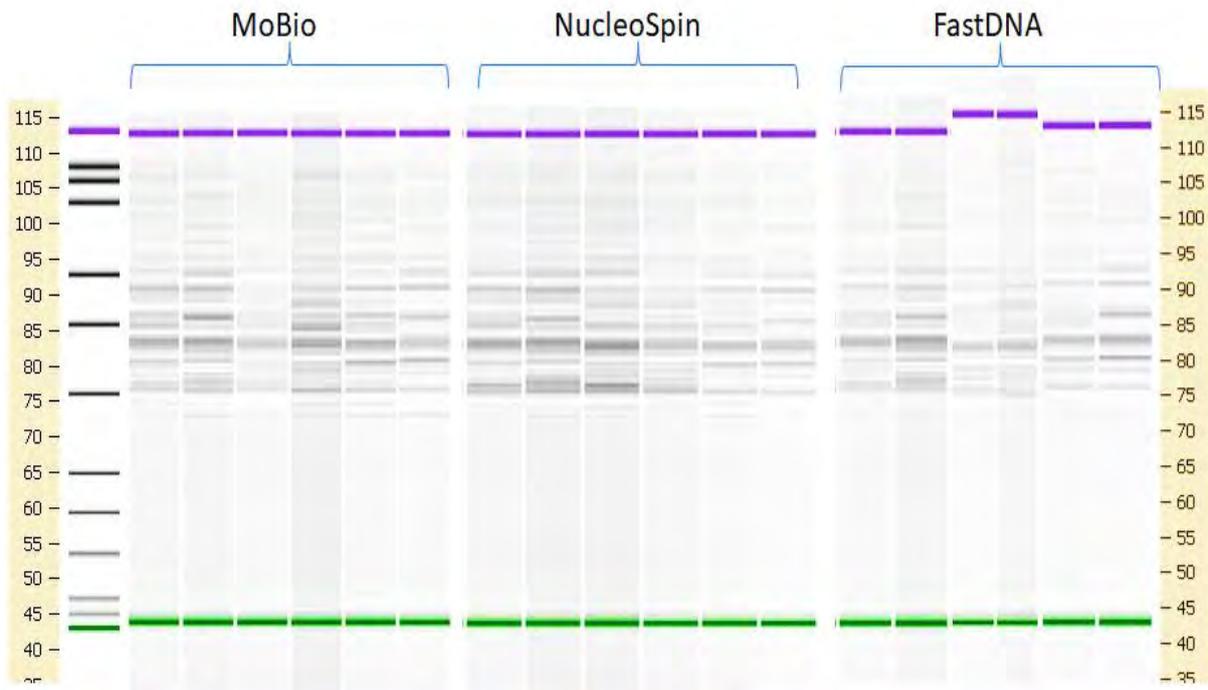


Figure 30. Profils RISA des échantillons des témoins extraits avec les 3 kits utilisés

III. 3 2. Analyse en Composante principale (ACP) de la structure des communautés bactériennes de l'intergène 16S-23S

L'analyse en composante principe (ACP) des profils du marqueur intergénique 16S-23S a complété l'analyse visuelle des profils et a permis de révéler des différences et des ressemblances entre les profils. L'analyse des données de RISA a confirmé les variations des profils de la structure des communautés bactériennes obtenues en fonction de la plante et/ ou de la méthode (kit) d'extraction utilisée. En effet, les communautés bactériennes issues des extraits de la méthode d'extraction MoBio (Figure 31a) et de NucleoSpin (Figure 31b) ont montré une séparation nette des trois sols étudiés. De plus les regroupements des échantillons ont formé de petites ellipses distinctes les unes des autres en fonction de la plante. A l'opposé, pour la méthode (kit) FastDNA (Figure 31c), ici les échantillons d'un même sol ont été plus dispersés favorisant ainsi de larges ellipses. Ces résultats suggèrent que les deux premières méthodes d'extraction (MoBio et NucleoSpin) ont été les plus reproductibles.

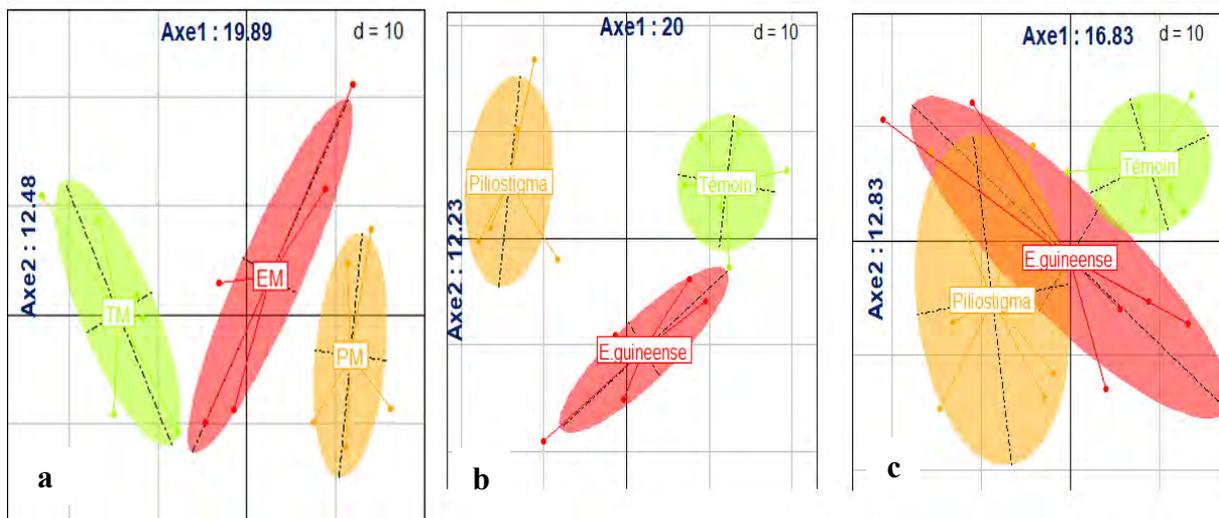


Figure 31. ACP de l'intergène 16S-23S selon la méthode d'extraction : a) MoBio ; b) NucleoSpin et c) FastDNA

III. 3 3. Analyse globale de l'intergène 16S-23S de tous les échantillons

L'analyse globale (Figure 32a) de tous les échantillons des 3 méthodes d'extraction d'ADN a montré que les différences observées entre les méthodes d'extraction sont faibles. Cette faible différence pourrait se traduire par une zone spécifique pour chaque méthode, ce qui pourrait augmenter les communautés bactériennes couvertes d'où une augmentation de la diversité dans les sols étudiés. Une vue globale de tous les échantillons en fonction des sols étudiés par une analyse en composante principale (ACP) des données de RISA a révélé (Figure 32b) des différences au niveau des communautés bactériennes des trois sols étudiés. Par conséquent, la spécificité des méthodes (kits) d'extraction a été très visible ici (Figure 32c). Pour les mêmes échantillons extraits avec les 3 kits différents, nous avons obtenus des ellipses différentes qui se sont recoupées par endroit, avec des barycentres différents.

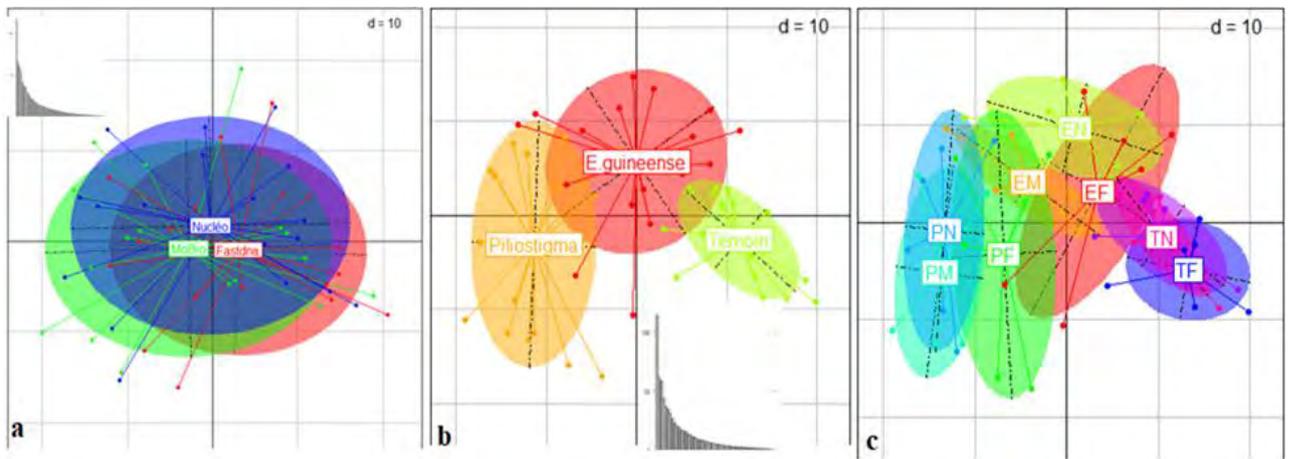


Figure 32. ACP globale de tous les échantillons selon : a) la méthode d'extraction ; b) les sols étudiés et c) par répétition : E (*E. guineense*), P (*P. reticulatum*) et T (Témoin)

III. 4. Analyse de la diversité totale des communautés bactériennes de la région 16S

La méthode RISA a permis globalement de montrer l'efficacité des méthodes d'extraction, mais aussi de montrer que les sols hébergeaient une grande diversité de communautés bactériennes. L'approche par séquençage haut débit utilisée dans cette partie du travail nous a permis de mieux quantifier les différences (indices de diversité) pour une analyse plus fine des communautés bactériennes présentes.

III. 4 1. Alpha diversité

III. 4 1 1. Nombre de séquences obtenues

Après le séquençage, un grand nombre de séquences a été obtenu pour les trois sols étudiés (Figure 33, 34, 35). Au total, le nombre de séquences a été beaucoup plus important avec la méthode MoBio (588349 séquences), suivi de la méthode FastDNA (480084 séquences) et enfin de la méthode nucleoSpin (477897 séquences). Toutefois, le plus grand nombre de séquences par échantillon extrait a été obtenu dans la méthode d'extraction du kit NucleoSpin.

Concernant la répartition pour les deux espèces végétales, le nombre de séquences obtenues demeurait plus élevé dans la zone d'influence de *P. reticulatum* comparé à celui de la zone d'influence de *E. guineense* et des sols témoins. Ces différences ont été significatives selon le test de Fisher.

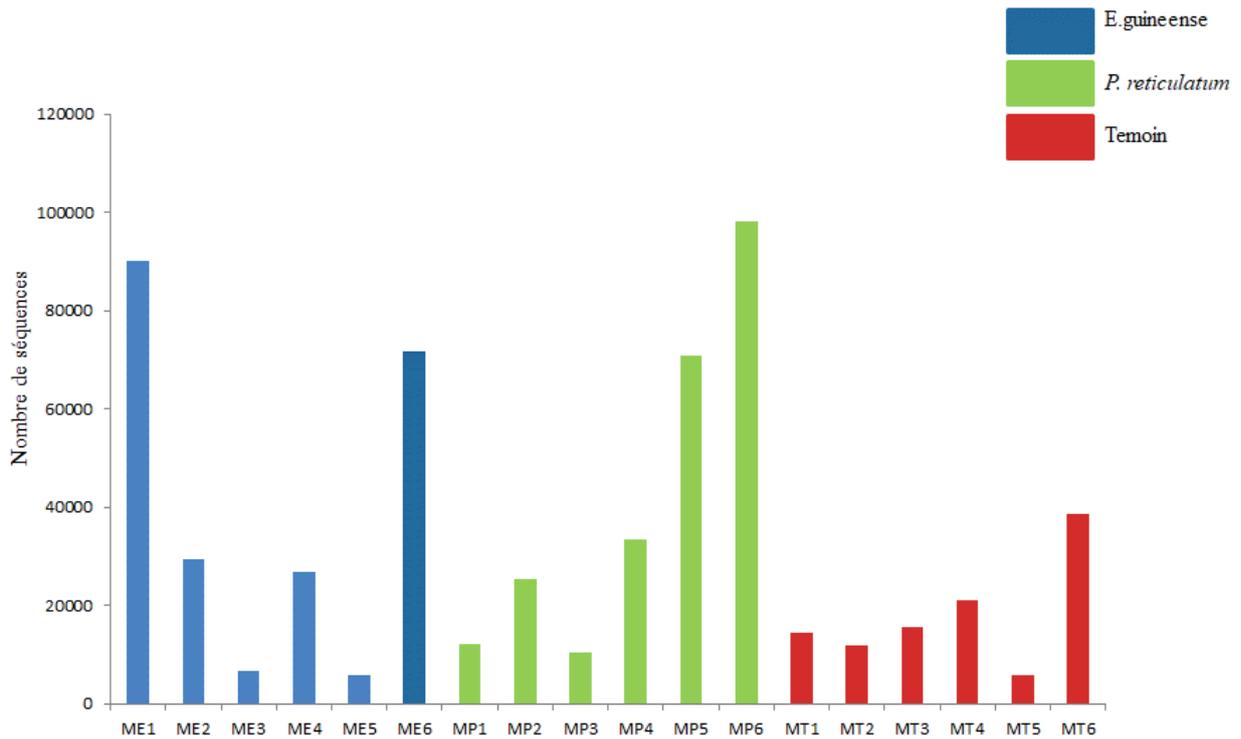


Figure 33. Séquences obtenues avec la méthode d'extraction ADN MoBio

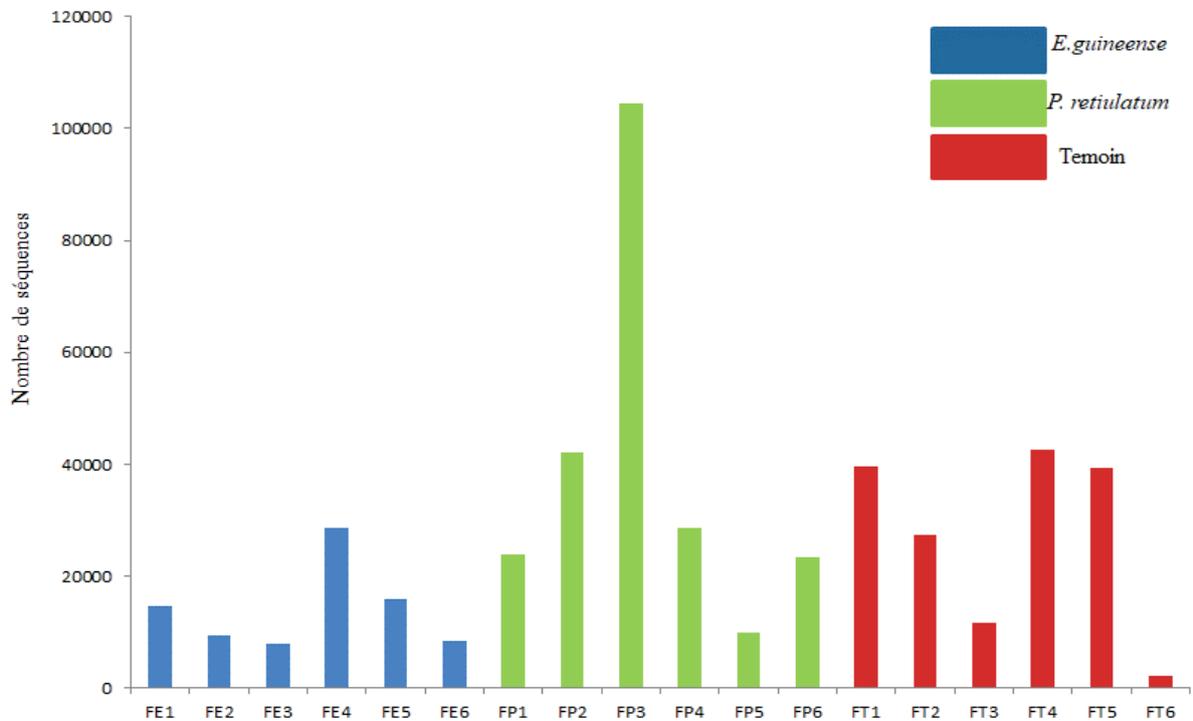


Figure 34. Séquences obtenues avec la méthode d'extraction ADN FastDNA

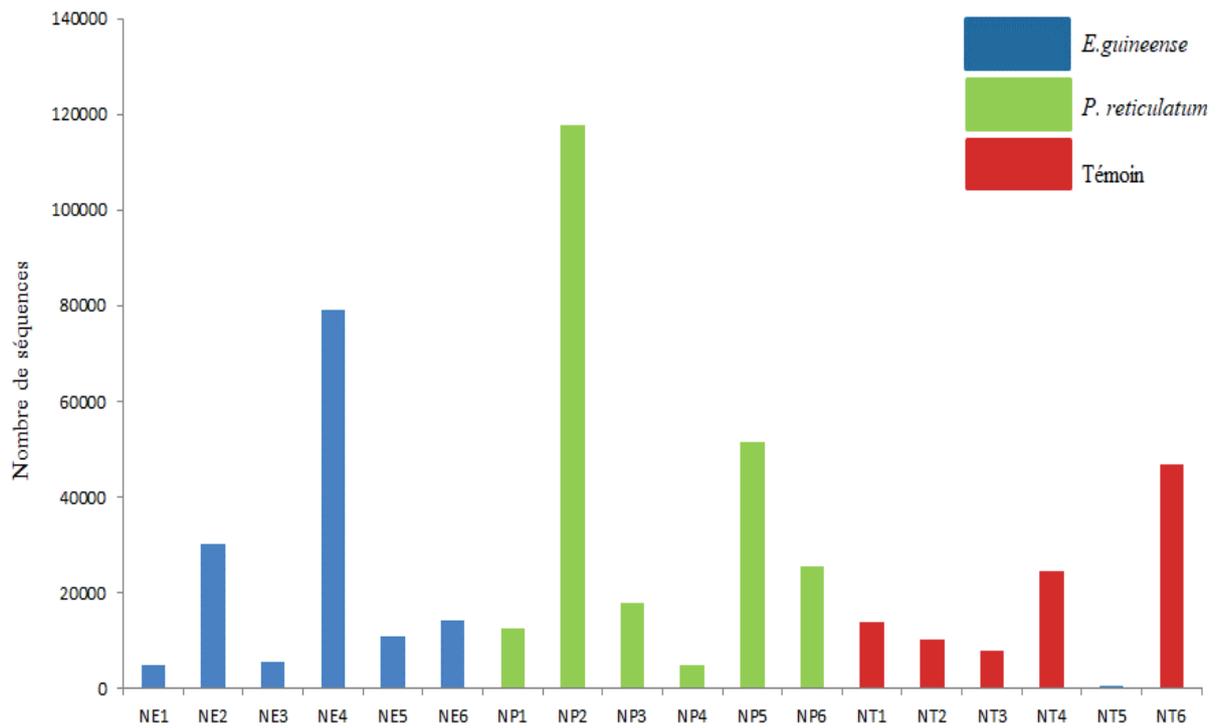


Figure 35. Séquences obtenues avec la méthode d'extraction ADN NucleoSpin

Pour la suite des analyses, un filtre a été appliqué concernant le retrait des échantillons pour lesquels le nombre de séquences était trop faible et n'atteignait pas le seuil requis. De ce fait, 12 échantillons ont eu moins de séquences que le seuil requis dont 4 pour la méthode FastDNA, 3 pour la méthode MoBio et 5 pour la méthode NucleoSpin. Parmi ces 12 échantillons, un seul appartenait à l'arbuste *P. reticulatum*. Après ce filtre, les échantillons ont été regroupés et les méthodes (kits) d'extraction ont été prises comme des répétitions pour éviter un écart élevé entre les sols étudiés.

III. 4 1 2. Les UTOs et les indices de diversité

Les séquences obtenues ont été regroupées en Unité Taxonomique Opérationnelle (UTO) en considérant que des séquences d'ARNr 16S des bactéries qui ont plus de 97% de similarité appartenaient à la même espèce.

Afin de déterminer le nombre de séquences permettant une bonne estimation de la diversité des communautés bactériennes des sols étudiés, le niveau 2106 a été choisi parmi le tirage aléatoire pour calculer les indices de diversité. L'analyse statistique a montré que l'estimateur de richesse Chao1 n'a pas montré de différence significative entre les trois sols étudiés à ce niveau. Alors que les indices de diversité Simpson's et Shannon ont montré des différences significatives entre les sols sous *P. reticulatum* et des témoins (Tableau 8).

Tableau 8. Indices de diversité (Chao1, Simpson's et Shannon) des sols étudiés

Sols étudiés	Indices de diversité		
	Chao1	Simpson's	Shannon
<i>E. guineense</i>	1353,07 ^a	0,99 ^{ab}	8,63 ^{ab}
<i>P. reticulatum</i>	1368,28 ^a	0,99 ^b	8,54 ^b
Témoin	1300,97 ^a	1,00 ^a	8,74 ^a

III. 4 2. Beta-diversité par la distance Bray-Curtis

L'analyse de la diversité Beta, par la distance de Bray-Curtis (Figure 36) a montré une distribution des échantillons par rapport aux axes. Les échantillons de *P. reticulatum* et de *E. guineense* sont plus hétérogènes comparés aux échantillons du témoin qui forment un bloc plutôt compact. L'observation en trois dimensions a permis de voir en termes de distance que certains échantillons de *P. reticulatum* et de *E. guineense* étaient très proches, et que ceux de *P. reticulatum* étaient très éloignés des échantillons du témoin. Ce qui consolide les résultats obtenus avec la RISA sur la structure des communautés bactériennes des sols étudiés. Un regroupement de quelques échantillons de *P. reticulatum* a été noté entre les axes Pco1 et Pco3 ce qui pourrait constituer une communauté bactérienne spécifique à l'espèce.

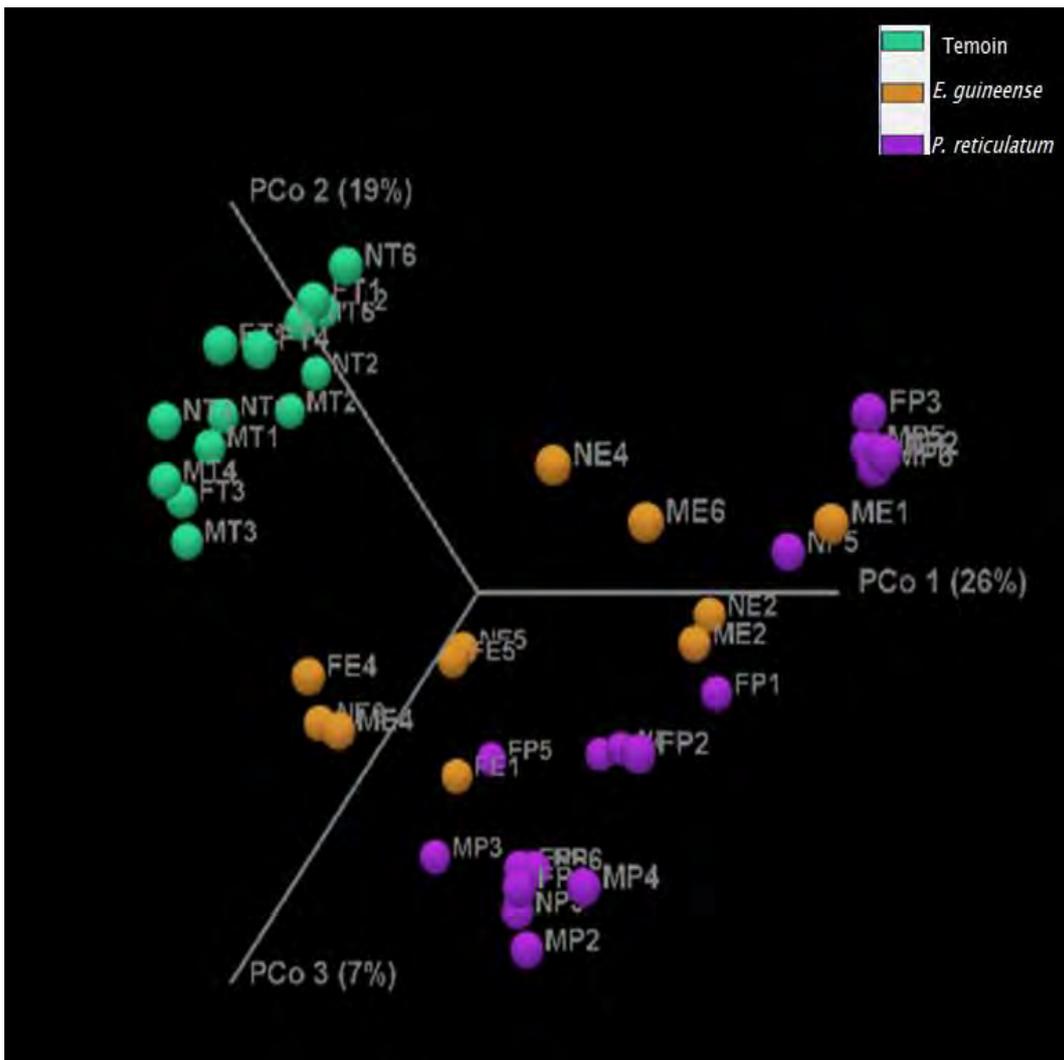


Figure 36. Distribution des échantillons par rapport à l'espace (PCo1, PCo2 et PCo3)

III. 4 3. La taxonomie des communautés bactériennes des sols

La composition bactérienne des différents sols a été étudiée à plusieurs niveaux taxonomiques.

III. 4 3 1. Diversité au niveau des Phyla

Au niveau des Phyla (Figure 37), 20 groupes ont été dénombrés composés de 16 dominants qui sont les : *Protéobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Chlamydiae*, *AD3*, *WS3*, et 4 considérés comme des phyla rares (*WPS*, *OD1*, *TM6* et *TM7*) car peu abondants. Il ressort que les *Protéobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, et les *Verrucomicrobia* ont été significativement dominants dans tous les sols étudiés et aussi plus abondants dans les sols prélevés sous la zone d'influence de *P. reticulatum* comparés à ceux trouvés dans les sols prélevés sous *E. guineense* et les témoins (Tableau 9). Toutefois les *Firmicutes* sont abondants aussi dans tous les sols mais plus dans les sols témoins avec (42,70%), que les sols sous influence des plantes de *P. reticulatum* (22,38%) et *E. guineense* (34,91%).

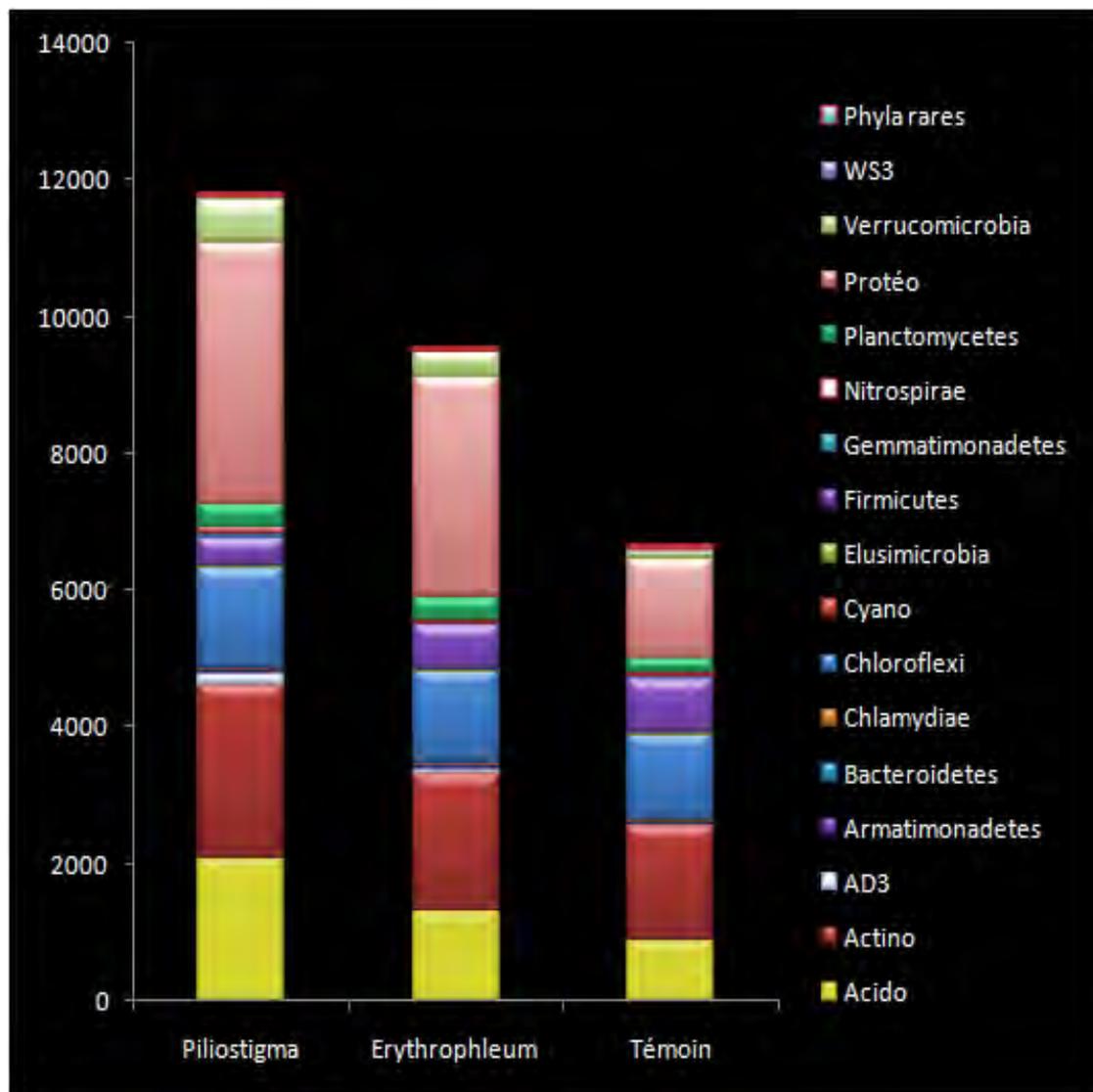


Figure 37. Les différents phyla obtenus dans les sols d'étudiés

Tableau 9. Sept (7) phyla les plus dominants dans les sols

Phyla	Sols étudiés (%)		
	<i>P. reticulatum</i>	<i>E. guineense</i>	Témoin
<i>Acidobacteria</i>	48,57	30,78	20,66
<i>Actinobacteria</i>	41,05	32,25	26,70
<i>Chloroflexi</i>	35,63	33,29	31,08
<i>Planctomycetes</i>	39,15	36,03	24,82
<i>Protéobactéria</i>	44,98	38,07	16,94
<i>Verrucomicrobia</i>	54,13	32,95	12,91
<i>Firmicutes</i>	22,38	34,91	42,70

III. 4 3 2. Diversité au niveau des Classes

Au niveau des classes, plus de 40 groupes ont été identifiés avec une abondance très variée en fonction des sols étudiés. Certaines classes sont faiblement représentées et même négligeables par rapport aux autres. La figure (38) ci-après prend seulement en compte les classes dominantes qui sont au nombre de 15. L'analyse comparative du tableau (10) a montré que ces classes ont été plus abondantes dans les sols sous influence de *P. reticulatum* comparées aux sols prélevés sous *E. guineense* et aux sols témoins. De manière intéressante il faut souligner aussi la présence des communautés de bactéries qui ne sont pas affiliées à des classes connues ont été obtenues. D'un point de vue du fonctionnement des communautés bactériennes associées à la rhizosphère des plantes, ces communautés pourraient jouer un grand rôle dans les sols et/ ou la croissance des plantes.

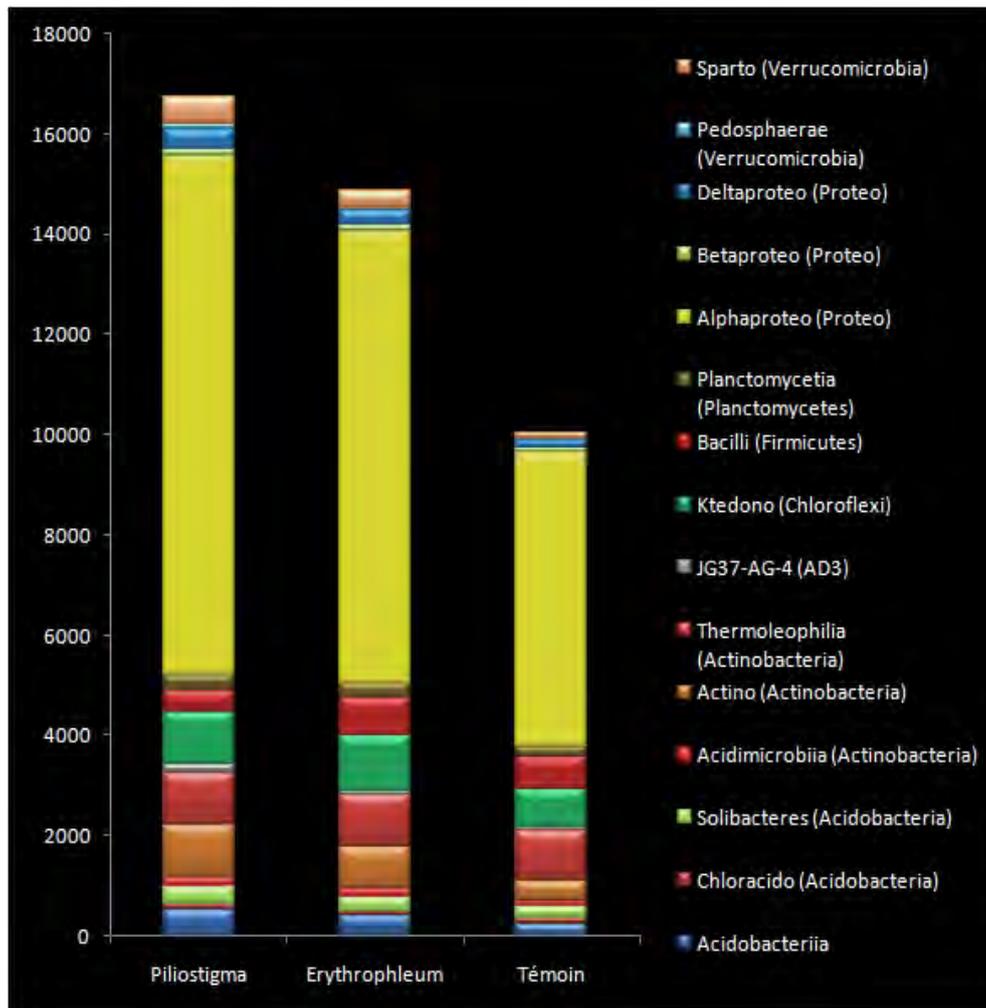


Figure 38. Les classes dominantes dans les sols étudiés

Tableau 10. Proportion relative des classes de bactéries dans les sols étudiés

Classes	Sols étudiés (%)		
	<i>P. reticulatum</i>	<i>E. guineense</i>	Témoin
<i>Acidobacteriia</i>	45,18	34,52	20,30
<i>Chloracido</i>	32,48	27,86	39,67
<i>Solibacteres</i>	39,57	34,35	26,08
<i>Acidimicrobiia</i>	38,69	38,42	22,89
<i>Actino</i>	46,62	35,43	17,94
<i>Thermoleophilia</i>	33,84	33,74	32,42
<i>JG37-AG-4</i>	51,03	27,63	21,34
<i>Ktedono</i>	35,99	37,87	26,13
<i>Bacilli</i>	22,03	41,89	36,08
<i>Planctomycetia</i>	39,28	35,46	25,26
<i>Alphaproteo</i>	41,06	35,70	23,24
<i>Betaproteo</i>	41,35	36,50	22,15
<i>Deltaproteo</i>	46,83	33,48	19,69
<i>Pedosphaerae</i>	54,46	30,40	15,13
<i>Sparto</i>	53,78	33,89	12,33

III. 4 3 3. Diversité au niveau des Ordres

Au niveau des ordres, 30 groupes (*Acidiales*, *solibacterales*, *Acidimicrobiales*, *Actinomycetales*, *Rubrobacterales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Saprospirales*, *Chlamydiales*, *Roseiflexales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatissporales*, *Bacillales*, *Clostridiales*, *Nitrospirales*, *Gemmatales*, *Pirellulales*, *Caulobacterales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales*, *Sphingomonadales*, *Burkholderiales*, *Entotheonellales*, *Myxococcales*, *Syntrophobacterales*, *Thiotrichales*, *Xanthomonadales*, *Pedosphaerae*, *Chthoniobacterales*, *Sediment-1*) ont été identifiés, ajouté à cela quelques ordres inconnus.

Il ressort de l'analyse que parmi les 30 groupes répertoriés, 11 ordres ont une abondance relative très grande dans tous les sols étudiés et ont occupé une proportion importante dans leurs phyla respectifs. Les *Acidiales* et les *Solibacterales* ont représenté respectivement (27,32% et 20,81% des *Acidobacteria*), *Actinomycetales*, *Gaiellales* et *Solirubrobacterales* (36,49%, 31,80% et 16,67% des *Actinobacteria*), *Ktedonobacterales* et *Thermogemmatissporales* (39,62% et 28,84% des *Chloroflexi*), *Bacillales* (96,69% des *Firmicutes*), *Rhizobiales* et

Rhodospirillales (49,94% et 23,13% des *Protéobacteria*) et *Chthoniobacterales* (82,13% des *Verrucomicrobia*). Une répartition des pourcentages des 11 ordres selon les sols étudiés a été montrée dans le (tableau 9)

Tableau 11. Pourcentage comparatif des 11 dominants ordres dans les sols étudiés

Ordres	% dans les sols étudiés		
	<i>P. reticulatum</i>	<i>E. guineense</i>	Témoin
<i>Acidoles</i>	12,34	9,43	5,55
<i>Solibacterales</i>	8,20	7,16	5,46
<i>Actinomycetales</i>	17,30	12,57	6,63
<i>Gaiellales</i>	12,20	9,40	10,20
<i>Solirubrobacterales</i>	4,74	5,24	6,69
<i>Ktedonobacterales</i>	14,98	15,85	8,79
<i>SThermogemmatisporales</i>	10,35	8,79	9,71
<i>Bacillales</i>	21,49	33,87	41,33
<i>Rhizobiales</i>	23,16	20,05	6,73
<i>Rhodospirillales</i>	10,33	8,47	4,34
<i>Chthoniobacterales</i>	44,17	27,83	10,13

L'analyse du tableau a montré aussi que l'abondance relative de tous les ordres sauf (*Solirubrobacterales* et *Bacillales*) a été plus importante dans les sols sous *P. reticulatum* comparée aux deux autres sols.

IV. Discussion

Effets de la méthode d'extraction sur la structure des communautés bactériennes du sol

Dans le souci d'avoir des résultats rapides, fiables et moins coûteux de l'analyse de diversité des communautés bactériennes des sols étudiés, nous avons utilisé la technique RISA qui est une méthode d'analyse avec une résolution relativement fine. Cette technique hautement reproductible a été utilisée dans plusieurs études pour explorer la diversité dans les milieux complexes comme le sol (Borneman *et al.*, 1997 ; Ranjard *et al.*, 2001 ; Cardinale *et al.*, 2004). Elle requiert une petite quantité de produit PCR pour un temps court. C'est l'une des techniques les plus appropriées pour analyser rapidement un grand nombre d'échantillons. Elle présente une grande sensibilité pour faire des études comparatives des communautés bactériennes. Cependant, la qualité de l'ADN total obtenu peut influencer les résultats et biaiser leurs interprétations. Dans la première partie, nous avons évalué l'impact de deux espèces (*P. reticulatum* et *E. guineense*) sur les structures des communautés bactériennes des sols en fonction de la méthode d'extraction qui peut constituer un facteur limitant ou éventuellement un biais pour l'étude de la diversité (Dimitrov *et al.*, 2017 ; Zielińska *et al.*, 2017).

Ainsi, les extraits obtenus avec les trois méthodes (kits) utilisées ont permis de montrer que la concentration de l'ADN peut différer selon le kit utilisé. Les résultats similaires ont été obtenus par (Delmont *et al.*, 2011) en utilisant plusieurs approches pour extraire l'ADN génomique du sol. Des différences ont été notées d'une approche à l'autre pour un même échantillon, ce qui pourrait biaiser l'interprétation. Il est généralement accepté que l'importance d'une méthode d'extraction est de veiller à obtenir la meilleure reproductibilité possible, normalement deux échantillons identiques doivent donner un extrait ADN qualitativement et quantitativement similaire. Ces différences sont pour la plupart des contaminants (acides humiques, polysaccharides, l'urée...). En effet, l'extraction de l'ADN du sol entraîne souvent la co-extraction des acides humiques qui interfèrent avec la quantification de l'ADN (Felczykowska *et al.*, 2015) et ces contaminants ont des propriétés chimiques comparables à celles de l'ADN (Sharma *et al.*, 2007 ; Hu *et al.*, 2010). Ceci rend difficile leur élimination. Mais, malgré cette différence de concentration relevée entre les méthodes utilisées, les rendements d'extraction étaient compris dans une gamme acceptable et les amplifications ont été correctes avec les amorces utilisées. L'amplification de l'intergène (16S-23S) a été possible. Toutefois l'analyse des gels de RISA qui se base essentiellement sur la présence et l'absence des communautés bactériennes a montré des différences entre les mêmes échantillons qui sont plus marquées quand on se focalise sur la fluorescence des bandes qui est plus importante avec

les extraits du kit MoBio. Alors que ce kit a présenté les concentrations les plus basses pratiquement dans tous les échantillons. Mais, une plus grande quantité d'ADN obtenue n'est pas toujours synonyme d'une plus grande richesse d'espèces (Stach *et al.*, 2001). C'est ainsi que Lakay *et al.*, (2007) affirment qu'aucun protocole n'a encore été démontré suffisamment universel pour être accepté comme standard. Donc, la méthode d'extraction peut changer la nature ou la composition des communautés bactériennes.

Les 3 ACP obtenues sont différentes les unes des autres selon la méthode d'extraction, ce qui suppose des communautés bactériennes différentes. Nos résultats ont révélé que le nombre d'espèces a varié considérablement selon la méthode utilisée. C'est à dire l'abondance relative de certains phyla, de certaines classes ou de certains genres peuvent être sous-estimer ou surestimer (Delmont *et al.*, 2011). Les ACP des deux méthodes d'extraction (MoBio et NucleoSpin) ont montré que les sols prélevés sous les espèces ne partagent aucune structure avec les sols témoins, d'où un impact des deux espèces sur les structures des communautés bactériennes du sol. Cet impact pourrait être lié aux paramètres biotiques et abiotiques, car les résultats chimiques des sols étudiés (Tableau 7) ont montré des différences de teneur et de pourcentage des différents variables analysés. Aussi on peut citer les sécrétions des racines des espèces végétales étudiées qui peuvent aussi influencer les populations bactériennes. Ceci appuie les résultats de la DGGE du chapitre III. En effet, l'impact des plantes sur les communautés bactériennes des sols a été démontré par plusieurs études, soit par une augmentation de la population bactérienne sous l'influence des plantes ou soit par une diminution d'une communauté ou un groupe bien donné.

La diversité totale des communautés bactériennes par séquençage Miseq

Selon (de Wit & Bouvier, 2006) chaque environnement a ses propres microorganismes. Toutefois des variations peuvent être observées au sein d'un même environnement. Cette variation pourrait être liée non seulement aux méthodes d'extraction qui peuvent influencer le spectre de communautés bactériennes, mais aussi aux espèces végétales présentes dans le sol. Le séquençage Miseq des sols prélevés sous *P. reticulatum*, et *E. guineense* et des sols témoins a montré une grande diversité bactérienne de taille et de composition, variable en fonction de la méthode d'extraction et de la présence/absence ou du type de l'espèce végétale. Cette diversité est constituée de taxons connus, de taxons indéfinis mais aussi de taxons qualifiés rares. En effet, la particularité du séquençage massif est aussi de déterminer les communautés bactériennes non cultivables. Cette diversité a été dominée par les phyla *Protéobacteria*,

Actinobacteria, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, et *Firmicutes* qui ont représenté respectivement : 30,30%, 22,21%, 15,22%, 14,50% et 6,65%. Ces groupes constituent souvent les phyla dominants dans les études métagénomiques (Janssen, 2006). D'ailleurs, cette tendance a été observée dans les résultats des 3 méthodes utilisées séparément. Toutefois le nombre d'espèce dans un échantillon change selon la méthode d'extraction ; donc l'utilisation de plusieurs méthodes d'extraction permet d'augmenter non seulement la diversité alpha qui exprime la diversité à l'intérieur d'un échantillon donné (Jurasinski *et al.*, 2009), mais aussi la diversité Beta qui met en exergue la variation entre les échantillons (Jurasinski *et al.*, 2009). Dans cette étude, les phyla dominants occupent plus de 70% de la population bactérienne obtenue.

En outre, l'analyse détaillée a révélé que 30,30% de la diversité totale est occupée par les *Protéobactéria*. Ce résultat est en phase avec plusieurs études qui ont relaté la dominance des *Protéobactéria* (Janssen, 2006 ; Dorr de Quadros *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2014 ; Rachel *et al.*, 2014 ; Miyashita, 2015). Ce phylum connu pour des bactéries qui interviennent dans la fixation de l'azote, joue un rôle important dans la fertilisation des terres et il est très souvent associé à la disponibilité de la matière organique (Fierer *et al.*, 2007). Nos résultats ont révélé que plus de 70% des espèces de ce phylum ont été affiliées à des ordres définis contrairement aux autres groupes dont la taxonomie se limitait souvent au niveau classe dans l'analyse. L'ordre des *Rhizobiales* a occupé 50% des *Protéobactéria* répertoriés et ont été inclus des espèces bactériennes très importantes dans le sol et les plantes associées par leur aptitude à établir des relations symbiotiques fixatrices d'azotes bénéfiques. Dans notre étude malgré ce pourcentage important aucun nodule n'a été observé sur les racines de *P. reticulatum* (Chapitre I). D'ailleurs la nouvelle classification (LPWG, 2017) range *P. reticulatum* dans la sous famille des *Cercidoideae* qui regroupe des espèces végétales qui sont incapables de faire la nodulation. Toutefois, les bactéries du phylum des *Protéobactéria* peuvent être d'une importance capitale sous la rhizosphère de *P. reticulatum* et cette importance se traduit souvent par une bonne activité enzymatique. Diedhiou-Sall *et al.*, (2013) et Diakhaté *et al.*, (2016a) ont montré une augmentation significative de presque toutes les enzymes mesurées contribuant ainsi à améliorer la fertilité du sol, d'où l'îlot de fertilité décrit sous *P. reticulatum* par (Wezel *et al.*, 2000).

Nos résultats ont révélé aussi que les *Actinobactéria* ont représenté le second groupe avec plus de 22% des bactéries séquencées et font partie de l'un des plus grands phyla bactériens. Ce phylum est largement répandu dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, jouant un rôle important dans l'écologie, la médecine, l'agriculture et l'industrie (McNeill &

Brown, 1994). Les *Actinobactéria* peuvent vivre dans des conditions extrêmes et complexes (Vašková, 2014), participant activement à la décomposition et au recyclage de la matière organique. Ils sont souvent des gram-positives, d'où une teneur élevée en GC (Lo *et al.*, 2002).

Ensuite, les *Acidobactéria* et les *Chloroflexi*, (respectivement 15,22%, 14,50% de la diversité totale obtenue), sont très abondants aussi dans les sols prélevés sous *P. reticulatum* comparés aux deux autres sols. Des auteurs (Fierer *et al.*, 2007 ; Janssen, 2006) ont montré que les *Acidobactéria* ont une grande abondance relative dans les sols forestiers, désertiques ou des prairies comparée aux sols agricoles et aussi sont significativement plus faibles dans les rhizosphères riches en nutriments que dans les sols nus, confirmant ainsi leur mode de vie oligotrophique (Kielak *et al.*, 2009). Les chloroflexi prédominent également dans les sols pauvres en nutriments (Janssen, 2006), d'où une abondance relative faible dans les parcelles à forte teneur en azote (Fierer *et al.*, 2012). Ce qui pourrait supposer que notre site de prélèvement de sols n'est pas aussi riche qu'on l'avait décrit. Ce pendant nos résultats ont révélé que seul le phylum des *Firmicutes* avait une abondance relative très faible dans les sols prélevés sous *P. reticulatum* comparée aux sols sous *E. guineense* et les sols témoins. Ce qui ne reflète pas les résultats du piégeage du chapitre I qui ont montré que les bactéries appartenant aux *Firmicutes* étaient dominantes dans les sols sous influence de l'arbuste. Nos résultats sont en contradictions avec ceux de Li *et al.*, (2014) qui ont montré que les *Firmicutes* sont significativement dominants dans la rhizosphère du maïs. Ils sont souvent corrélés à une faible humidité du sol et un pH faible (Vasileiadis *et al.*, 2013). Alors que la rhizosphère de *P. reticulatum* est caractérisée par une grande humidité grâce à la redistribution hydraulique (Félix *et al.*, 2018).

V. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la diversité insoupçonnée existante dans les rhizosphères ou dans les zones d'influence des racines de *P. reticulatum* et *E. guineense*. D'abord, la technique RISA utilisée avec trois 3 méthodes d'extraction a révélé que la méthode d'extraction influence fortement la structure des communautés bactériennes du sol. La méthode Fast DNA a présenté le meilleur profil avec une concentration en ADN importante en qualité et en quantité avant et après purification.

Le séquençage Miseq a permis de montrer une grande diversité affiliée à 20 phyla : *Protéobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Chlamydiae*, *AD3*, *WS3*, *WPS*, *OD1*, *TM6* et *TM7*. L'analyse comparative a révélé que tous les phyla répertoriés sont dominants dans les sols prélevés sous *P. reticulatum* comparés aux sols prélevés sous *E. guineense* et des sols témoins excepté le phylum des *Firmicutes* qui a une abondance relative beaucoup plus importante dans les sols témoins suivis des sols sous *E. guineense* comparés aux sols sous *P. reticulatum*.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale

Les microorganismes modifient par leurs activités les conditions physico-chimiques du milieu qui les entourent de la même manière que les racines. Ce qui leur confère un rôle essentiel sur le développement des plantes. En effet, la rhizosphère des légumineuses est très connue pour leur richesse en nutriment et constitue la zone de prédilection des relations symbiotiques bénéfiques pour le sol mais aussi pour les plantes qui y développent. Deux grands groupes de symbioses fixatrices d'azote ont été identifiés chez les plantes : la première, la plus connue et la plus étudiée a lieu entre les légumineuses et les *Rhizobia* et la deuxième entre les plantes actinorhiziennes et le genre *Frankia* (Wall, 2000). Toutefois derrière ces groupes bien connus se cache une diversité insoupçonnée très importante mais incapable d'être déterminée par les méthodes conventionnelles de culture au laboratoire. Pour cette raison, il y a eu un intérêt considérable de connaître et d'inventorier les communautés de la rhizosphère des légumineuses (*P. reticulatum* et *E. guineense*) en passant par une combinaison de plusieurs approches.

Est-il possible d'améliorer la nutrition azotée de *P. reticulatum* ?

La fixation biologique d'azote est le processus biologique le plus important après l'assimilation du gaz carbonique (CO₂) durant la photosynthèse (Dixon & Wheeler 1986). L'étude des symbioses légumineuses-rhizobium a fourni des pistes pour comprendre et formuler des stratégies pour le développement des symbioses non-légumineuses-Rhizobium (Berge *et al.*, 2009) ou d'autres associations endophytiques (Boddey *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Sprent *et al.*, 2009). C'est ainsi que les bactéries associées à la rhizosphère de *P. reticulatum* ont été piégées avec trois légumineuses (*Faidherbia albida*, *Acacia bivenosa* et *Vachellia Seyal*) de la famille des *Caesalpinoideae* (LPWG, 2017) très connues pour leur aptitude à établir des relations symbiotiques avec des bactéries symbiotiques et fixatrices d'azote. Contrairement à nos attentes, les résultats à partir des suspensions de sols prélevés sous *P. reticulatum* ont montré la prédominance des genres non symbiotiques tels que (*Cohnella* (27.65%), *Paenibacillus* (21.27%)) et seulement 14,89 du genre *Bradyrhizobium*. Alors que des études ont signalé que les *Acacias* sont principalement nodulés par des genres *Ensifer*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* (Odee *et al.*, 2002 ; Ben Romdhane *et al.*, 2006 ; Diouf *et al.*, 2007 ; Perrineau *et al.*, 2012 ; Cordero *et al.*, 2016 ; Sankhla *et al.*, 2017 ; Sprent *et al.*, 2017). Ce qui ne reflète pas d'ailleurs les résultats des NGS qui ont montré que les phyla (*Protéobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*) sont de loin les plus abondants dans les sols sous *P. reticulatum* et que le phylum des *Firmicutes* dont les genres *Cohnella* et

Paenibacillus sont affilés, a été faiblement représenté. Ce résultat suggère que la technique culturale par piégeage sous-estime non seulement la diversité réelle mais pourrait toutefois biaiser l'information en promouvant des genres à effectifs minoritaires. Ce résultat corrobore des études qui ont signalé que la diversité des souches obtenues par piégeage est très différente de celle isolée des nodules récoltés in situ (Bala *et al.*, 2001 ; Duodu *et al.*, 2006 ; Diouf *et al.*, 2007) et d'une manière générale de celle du sol, car toutes les bactéries trouvant dans le sol ne forment pas de nodules sur les racines des espèces. De ce constat, cette technique couramment utilisée, du fait de sa manque de sensibilité, ne détecte que très aléatoirement des bactéries à effectifs très élevés mais parfois à effectifs minoritaires qui ne constituent qu'une très faible proportion de la diversité.

En outre les microorganismes associés aux racines des végétaux sont d'une importance fondamentale pour la nutrition et la stimulation de la croissance des plantes. Le principe de notre approche consistait à piéger des bactéries capables d'améliorer la nutrition azotée de l'arbuste et de voir si *P. reticulatum* répondrait positivement à l'inoculation. C'est pourquoi (Dommergues, 1995 ; Requena *et al.*, 2001 ; Thrall *et al.*, 2005) ont montré que la réintroduction de plantes autochtones, associées à leurs symbiotes microbiens, est un outil biotechnologique efficace pour la reconstitution des écosystèmes dégradés. Cependant, la symbiose fixatrice d'azote à des plantes non-nodulantes constitue un enjeu important de la recherche (Gleason *et al.*, 2006). Des travaux ont mis en exergue l'existence d'associations naturelles entre endophytes et des plantes non nodulantes, comme par exemple l'association entre endophytes de maïs et *Rhizobium etli* (Gutierrez-Zamora & Martinez-Romero, 2001). Des diazotrophes appartenant aux genres *Enterobacter* (Peng *et al.*, 2009), *Phytobacter* (Zhang *et al.*, 2008) et *Rhizobium* (Peng *et al.*, 2008) ont été isolées à partir de racines de riz (*Oryza spp.*). C'est pourquoi les bactéries piégées et qui présentaient des signaux fixateurs (amplification du gène *nifH*) ont été inoculées aux plantules de *P. reticulatum*. Les résultats ont révélé que les souches PZG_S14 (très proche de *Bradyrhizobium elkanii*), PZG_A18 (de *Cohnella*), et PZS_S05 (de *Ensifer*) ont induit une augmentation significative de la teneur en chlorophylle des plantes inoculées. Les souches (PZG_A18 et PZS_S05) ont en plus entraîné une augmentation significative de la hauteur des plantes inoculées comparées aux plantes non inoculées. Les biomasses aériennes sèches ont été significativement améliorées par la souche PZS_S05. Ce résultat, qui reste à conforter, serait particulièrement intéressant parce qu'il suggère que l'inoculation de l'arbuste *P. reticulatum* est possible et qu'il serait possible aussi de sélectionner

des souches bénéfiques capables d'améliorer la croissance de l'arbuste mais aussi sa nutrition azotée par un mécanisme qu'on ne maîtrise pas encore.

Comment l'arbuste *P. reticulatum* modifie la structure des communautés bactériennes du sol ?

La zone du sol sous influence des plantes est caractérisée souvent par des conditions biotiques et abiotiques différentes de celle du sol hors influence (Ibekwe *et al.*, 2010,). La densité des populations de bactéries serait considérablement supérieur dans le sol sous influence rhizosphérique comparée au sol hors influence rhizosphérique (Karthikeyan *et al.*, 2008 ; McGahan *et al.*, 2014). Ce qui suggère que les plantes jouent un rôle crucial dans l'abondance des structures des communautés microbiennes de la rhizosphère qui sont variables et dépendent de nombreux facteurs abiotiques (Noguez, 2005 ; Colares & Melo, 2013). Plusieurs études ont montré que les caractéristiques des sols constituent des facteurs les plus déterminants dans le modelage des structures des communautés microbiennes de la rhizosphère (Raynaud, 2010 ; Sanallah *et al.*, 2011 ; McGahan *et al.*, 2014). Par exemple le pH est considéré comme l'un des forts indicateurs de la composition des communautés bactériennes. D'autres facteurs comme la disponibilité des nutriments, le contenu en carbone, l'azote, l'humidité des sols, les variations climatiques etc. peuvent aussi être déterminant sur la structure des communautés bactériennes du sol (Fierer *et al.*, 2003 ; Buyer *et al.*, 2010 ; Sul *et al.*, 2013).

Afin de vérifier cela, nous avons étudié l'impact de *P. reticulatum* sur la structure des communautés bactériennes du sol en utilisant deux approches : la DGGE (pour étudier la structure des communautés de la région 16S) et la RISA (pour la structure des communautés bactériennes de l'intergène 16S-23S). Nos résultats ont montré que l'humidité du sol, le Phosphore assimilable, le nitrate et l'ammonium ont été significativement élevés dans les sols sous *P. reticulatum* comparés aux sols témoins (sol nu). Ce qui consolide les études antérieures sur *P. reticulatum* qui avaient décrit la rhizosphère de l'arbuste comme un îlot de ressources où règne une humidité permanente même en période de sécheresse (Kizito *et al.*, 2012). L'analyse comparative des gels de DGGE, de la RISA et des ACP a révélé que les communautés bactériennes sous *P. reticulatum* sont plus abondantes, plus diversifiées et plus hétérogènes par rapport à celles trouvées dans les sols témoins et les sols prélevés sous la zone d'influence de *E. guineense* qui est une *Caesalpinioideae* symbiotique. Il ressort donc que cette diversité est variable selon le type de plantes. Ce qui suggère que le génotype de la plante a une influence importante sur la composition de la communauté bactérienne de la rhizosphère, ce qui d'ailleurs, a été démontré dans les travaux de (Xu *et al.*, 2009 ; Koranda *et al.*, 2011). Les

plantes impactent les microorganismes de leurs rhizosphères via leurs exsudats. Les exsudats racinaires représentent la part dominante de la rhizodéposition et ils sont rapidement métabolisés par les microorganismes (Gobat *et al.*, 1998). Les exsudats sont souvent de petites molécules organiques, solubles dans l'eau ou volatiles : glucides, acides organiques, acides aminés, acides gras, stérols, vitamines, enzymes, nucléotides etc. (Lemanceau *et al.*, 1998 ; Dakora *et al.*, 2002). Ils sont déterminants dans le processus de colonisation de la rhizosphère par les microorganismes. Les exsudats constituent donc un substrat nutritif disponible pour la croissance et le développement des microorganismes dans la rhizosphère mais ils sont utilisés comme des signaux chimiques (Chao *et al.*, 2013 ; Prescott & Grayston, 2013).

Comment les méthodes d'extraction d'ADN peuvent influencer la diversité des bactéries du sol ?

Malgré l'avancée de la biotechnologie, des biais techniques, au niveau des étapes d'extraction, d'amplification et de purification de l'ADN limitent l'accès à la totalité du potentiel génétique présent dans un échantillon. Étant donné que la fiabilité et l'efficacité de toute manipulation postérieure de l'ADN dépend d'abord de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait. Notre travail a donc consisté à utiliser plusieurs méthodes d'extraction pour essayer éventuellement de limiter les biais liés à ces différentes étapes et aussi à couvrir une plus grande diversité bactérienne du sol tout en ciblant les populations récalcitrantes du fait de leurs faibles effectifs.

L'analyse comparative de l'ADN extrait avec les 3 méthodes (kits) d'extraction d'ADN ont montré des différences au niveau de la concentration. D'abord, le premier niveau de différence a été constaté après quantification au Qubit® fluorometer (invitrogen). La concentration d'ADN obtenu a été plus importante avec la méthode d'extraction du kit FastDNA (100% des échantillons), suivi de la méthode d'extraction du kit NucleoSpin et du kit MoBio. Par exemple l'un des échantillons (N°2) prélevé sous *P. reticulatum* (P2) avait des concentrations respectivement (33,2 ng/ml ; 16,5 ng/ml ; 10,3 ng/ml), un autre échantillon (N°4) prélevé sous *E. guineense* (E4) avait des concentrations respectivement (34,2 ng/ml ; 12,7 ng/ml ; 9,33 ng/ml) et l'échantillon N°5 des témoins (T5) avait respectivement des concentrations (17,8 ng/ml ; 7,76 ng/ml ; 5,81 ng/ml). La tendance a été plus ou moins changée après purification et quantification au thermo-scientific, qui a révélé que la concentration d'ADN obtenu a été plus importante avec la méthode d'extraction du kit FastDNA (55,6% des échantillons), suivi de NucleoSpin (33,3% des échantillons) et enfin de MoBio (11,1% des

échantillons). Pour les mêmes échantillons cités en exemple et dans le même ordre : pour P2, les concentrations étaient respectivement (18,56 ng/μl ; 12,50 ng/μl ; 17,31 ng/μl), pour E4, les concentrations étaient respectivement (15,67 ng/μl ; 8,365 ng/μl ; 12,88 ng/μl) et enfin avec T5 (14,33 ng/μl ; 16,63 ng/μl ; 11,92 ng/μl). Ce qui suggère que les concentrations élevées relevées par la méthode d'extraction du kit FastDNA avant purification pourraient être dues à la co-extraction de l'ADN avec des acides humiques et d'autres polluants. Ainsi, Felczykowska *et al.*, (2015) ont démontré que l'extraction d'ADN constitue l'étape la plus délicate, car de nombreux contaminants tels que les acides humiques, les métaux lourds, les protéines, les polysaccharides etc. sont extraits avec l'ADN et sont très difficiles à séparer de l'ADN lors des différentes phases de l'extraction. En effet, les acides humiques du sol présentent des propriétés physico-chimiques similaires à celles de l'ADN, ce qui entraîne fréquemment leur co-extraction et même leur co-purification (Zielińska *et al.*, 2017). Ils présentent ainsi une absorbance à la fois à 230 nm et à 260 nm (Sharma *et al.*, 2007) et ce rapport est largement utilisé pour quantifier l'ADN métagénomique. Ces polluants ont tendance aussi à rendre difficile l'amplification d'ADN par PCR en inhibant la TaqDNA polymérase (Gabor *et al.*, 2003) et en désactivant les enzymes de restriction et les ligases, réduisant alors leur efficacité (Tebbe & Vahjen, 1993). Donc, la purification de l'ADN apparaît comme une étape critique dans le but d'obtenir de l'ADN d'une pureté satisfaisante (Felczykowska *et al.*, 2015), pour minimiser les biais lors de l'étude de la diversité. En fait, la diversité microbienne représente un réservoir génétique immense mais très difficile à pénétrer. Cependant, l'accès à l'ADN de toutes les bactéries d'un échantillon serait possible grâce à la métagénomique qui permet d'exploiter la diversité génétique bactérienne du sol tant au niveau populationnel que fonctionnel. Nous avons cependant montré que l'analyse demeure non exhaustive et biaisée quand on se limite aux bactéries cultivables surtout s'il s'agit d'un arbuste qui forme pas de nodules ni sur le terrain ni au laboratoire (LPWG, 2013). Mais aussi nous avons montré que la méthode (kit) d'extraction utilisée peut influencer l'abondance et la composition des communautés bactériennes du sol. Dans notre étude l'analyse en composante principale (ACP) a révélé que la méthode d'extraction avec le kit FastDNA couvre une diversité beaucoup plus abondante et plus hétérogène comparée aux 2 autres kits (NucleoSpin et MoBio). D'ailleurs, en terme de composition taxonomique au niveau des sols étudiés, nous avons identifié plus de 30 ordres (*Acidiales*, *Solibacterales*, *Acidimicrobiales*, *Actinomycetales*, *Rubrobacterales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Saprospirales*, *Chlamydiales*, *Roseiflexales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatissporales*, *Bacillales*, *Clostridiales*, *Nitrospirales*, *Gemmatales*, *Pirellulales*,

Caulobacterales, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales*, *Sphingomonadales*, *Burkholderiales*, *Entotheonellales*, *Myxococcales*, *Syntrophobacterales*, *Thiotrichales*, *Xanthomonadales*, *Pedosphaerae*, *Chthoniobacterales*, *Sediment-1*) avec toutefois une abondance relative très déséquilibrée. Au total, 11 ordres (*Acidoles*, *Solibacterales*, *Actinomycetales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatisporales*, *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* et *Chthoniobacterales*) ont une abondance relative très grande dans tous les sols étudiés et sont plus ou moins influencés par les méthodes (kits) d'extraction d'ADN utilisées. Par exemple l'ordre des *Rhizobiales* qui regroupe le plus grand nombre d'individus a révélé en moyenne (2095,17 individus dans le kit FastDNA ; 1698 individus dans le kit Nucléospin et 2049,67 individus dans le kit MoBio) dans les sols prélevés sous *P. reticulatum*. Dans les sols sous *E. guineense* nous avons répertorié (809,33 individus dans le kit FastDNA ; 1253 individus dans le kit Nucléospin et 2811,25 individus dans le kit MoBio).

.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse était focalisé sur une meilleure compréhension de la relation entre *P. reticulatum* et les communautés bactériennes du sol et, l'impact de cette relation sur la fertilité des sols.

En premier lieu, nous avons évalué la diversité génétique des *Rhizobia* et des PGPR dans les zones d'influence de *P. reticulatum* et leurs impacts sur la croissance et le statut azoté de l'espèce. Cette connaissance pourrait donc aider à mieux utiliser *P. reticulatum* dans les zones arides et semi-arides du Sahel. Les résultats de cette étude ont montré que le sol sous influence de *P. reticulatum* est associé à une grande diversité bactérienne, qui est variable en fonction de la zone de prélèvement (nord ou sud du Sénégal). Les approches utilisées, telles que le piégeage des bactéries, la PCR-RFLP et le séquençage du gène ARNr 16S, ont révélé que *P. reticulatum* exerce une influence sur les communautés bactériennes du sol en favorisant les genres non symbiotiques (*Cohnella* et *Paenibacillus*). Les souches PZS_S05 (*Ensifer*) et PZG_A18 (*Cohnella*) ont induit une amélioration de la croissance des plants de *P. reticulatum* in vitro et une augmentation de la teneur en chlorophylle des feuilles. Ces résultats ouvrent des perspectives à l'utilisation de l'association bactéries endophytes / *P. reticulatum* pour améliorer la croissance de l'arbuste. Il serait donc intéressant de tester l'effet PGPR des souches isolées en association avec des bactéries symbiotiques sur la croissance de *P. reticulatum*.

Nous avons aussi étudié l'impact de *P. reticulatum* sur la structure des communautés bactériennes du sol. Nos résultats ont montré que l'humidité du sol, le Phosphore assimilable, le nitrate et l'ammonium ont été significativement élevés dans les sols prélevés dans les zones d'influence des racines de *P. reticulatum* comparés aux sols prélevés dans la zone hors influence (sol nu). L'approche DGGE utilisée a permis de montrer que *P. reticulatum* modifie la structure des communautés bactériennes du sol. L'arbuste exerce une influence positive sur la composition de la population du sol en favorisant essentiellement une augmentation de l'abondance de certaines communautés bactériennes notamment celles moins riche en «GC». Toutefois, une communauté en composition en «GC» très riche semble être fortement réprimée par la présence de l'arbuste *P. reticulatum*. L'ACP a révélé aussi que les communautés bactériennes sont très hétérogènes et abondantes sous la zone d'influence de *P. reticulatum* par rapport à celles des sols témoins qui sont plutôt compactes et homogènes. En perspective, il serait intéressant d'étudier la structure des communautés bactériennes fixatrices d'azote afin de faire une corrélation avec les paramètres physico-chimiques du sol.

L'objectif de la dernière partie de la thèse consistait à évaluer, l'effet des méthodes (Kits) d'extraction d'ADN sur la structure des communautés bactériennes du sol par la technique RISA. Nos résultats ont montré que la concentration de l'ADN obtenu a été plus importante en quantité et en qualité avant et après purification avec le kit FastDNA comparée aux deux autres kits (NucleoSpin et MoBio). Alors que, la fluorescence des bandes était plus importante avec les extraits du kit MoBio. L'analyse des gels RISA et des ACP obtenues individuellement avec les trois kits d'extraction nous ont permis de conclure que la méthode d'extraction influence fortement la structure des communautés bactériennes du sol.

Pour étudier l'impact de *P. reticulatum* et *E. guineense* sur les communautés bactériennes totales, un séquençage Miseq a été fait. Nos résultats ont permis de mettre en évidence la diversité insoupçonnée existante dans les rhizosphères ou dans les zones sous influence des racines de ces deux espèces. En terme de composition taxonomique au niveau des sols étudiés, nous avons identifié plus de 30 ordres affiliés à 20 phyla avec toutefois une abondance relative très déséquilibrée. 11 ordres (*Acidiales*, *Solibacterales*, *Actinomycetales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatisporales*, *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* et *Chthoniobacterales*) ont une abondance relative très grande dans tous les sols étudiés et sont plus ou moins influencés par les méthodes (kits) d'extraction d'ADN utilisées. L'analyse comparative a révélé aussi que tous les phyla répertoriés sont dominants dans les sols prélevés sous *P. reticulatum* comparés aux sols prélevés sous *E. guineense* et des sols témoins excepté le phylum des *Firmicutes* qui a une abondance relative beaucoup plus importante dans les sols témoins suivis des sols sous *E. guineense* comparés aux sols sous *P. reticulatum*.

En définitive, Il serait intéressant d'étudier le comportement des souches isolées chez des cultures vivrières en milieu réel, et aussi faire d'autres tests pour confirmer si les isolats appartenant au genre *Cohnella* sont de nouvelles espèces. De plus, comme toutes ces études ont été faites sur les communautés bactériennes du sol, il serait donc intéressant d'élargir l'étude sur les champignons auxiliaires des bactéries en utilisant les mêmes approches. L'impact de la double inoculation bactéries bénéfiques (symbiotiques et ou PGPR)/ champignons mycorhiziens devra aussi être testé. Les effets de cette double inoculation sur les propriétés physico-chimiques du sol, sur la fertilité des sols et les cultures seront aussi évalués.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Amarger N** (2002) Genetically modified bacteria in agriculture. *Biochimie*. 84 (11): 1061-72.
- Amarger N, Macheret V, Laguerre G** (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov, from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47 :996–100.
- Ambouta JMK, Bouzou MI** (2004) Expériences de récupération des sols sahéliens dégradés grâce à l'incorporation de doses variables de fumier et d'un hydro rétenteur fertilisant. *Sécheresse*, 15(1), 49-55.
- Amrani S, Noureddine NE, Bhatnagar T, Argandona M, Nieto JJ, Vargas C** (2010) Phenotypic and genotypic characterization of *Rhizobia* associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and applied microbiology* 33:44–51.
- Arbonnier M** (2009) Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Versailles, France : Éditions Quæ.
- Aubert G, Ollat C, Pinta M** (1954) Méthodes d'analyses utilisées actuellement aux laboratoires des sols de l'IDERT. In : 2ème Conférence Interafricaine des Sols. Léopoldville (ZR), 9-14 Août: Document n° 101, Ministère des Colonies, Bruxelles. pp. 1267-1276.
- Babajide OJ, Babajide OO, Daramola AO, Mabusela WT** (2008) Flavonols and anoxychromonol from *Piliostigma reticulatum*. *Phytochemistry* 69: 2245–2250.
- Bachar A, Soares MIM, Gillor O** (2012) The effect of resource islands on abundance and diversity of bacteria in arid soils. *Microbial Ecol.* 3:694 - 700.
- Badri DV, Vivanco JM** (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 32: 666 – 681.
- Bagayoko M, Mansou SC, Traoré S, Eskindrige KM** (1996) Pearl millet/cowpea cropping system yields and soil nutrient levels. *African Journal of Crop Science* 4: 453–462.
- Bai Y, Zhou X, Smith DL** (2003) Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop science* 43:1774-1781
- Baik KS, Lim CH, Choe HN, Kim EM, Seong CN** (2011) *Paenibacillus rigui* sp. nov., isolated from a freshwater wetland. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61:529–534.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco, JM** (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233-266.
- Bakhom N, Le Roux C, Diouf D, Kane A, Ndoye F, Fall D, Duponnois R, Noba K, Sylla SN, Galiana A** (2014) Distribution and diversity of rhizobial populations associated with *Acacia*

- senegal (L.) Willd. Provenances in senegalese arid and semiarid regions. *Open Journal of Forestry* 4:136.
- Bakker PAHM, Berendsen RL, Doornbos RF, Wintermans PCA, Pieterse CMJ** (2013) The rhizosphere revisited: root microbiomics, *Front. Plant Sci.*, 4: 1–7.
- Bala A, Murphy P, Giller KE** (2001) Genetic diversity of *Rhizobia* from natural populations varies with the soil dilution sampled. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 841-843.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcon R, Azcon-Aguilar C** (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* 56:1761–1778.
- Bashan Y, Holguin G** (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGP B (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*. 30: 1225-1228.
- Bashan Y, Puente ME, de Bashan LE, Hernandez JP** (2008) Environmental use of plant growth-promoting bacteria. In A.E. Barka et C. Clément. *Plant-Microbe interactions* (p. 69-93).
- Ben Romdhane S, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M, Ghorbal MH, de Lajudie P** (2006) Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana Rhizobia* in Tunisia assessed by 16S and 16S–23S rDNA genes analysis. *J Appl Microbiol* 100: 436–445.
- Berge O, Lodhi A, Brandelet G, Santaella C, Roncato M A, Christen R, Heulin T, Achouak W** (2009) *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 367-372.
- Blaikie P, Brookfield H** (1987) *Land degradation and society*. London, 296: 10.95
- Boddey R M, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V** (2003) Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil* 252, 139-149.
- Bodelier PLE, Wijnhuizen AG, Blom CWPM, Laanbroek HJ** (1997) Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima* studied in a genotobiotic microcosm. *Plant and Soil*, 190: 91-103.
- Borneman J, Triplett EW** (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol*. 63: 2647-2653.
- Borresen AL, Hovig E, Brogger A** (1988) Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes. *Mutation Research* 202: 77-83.

- Bouizgarne B** (2013) Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management Chapter 2 p: 15-47, in, D.K. Maheshwari (ed.), *Bacterial Agrobiolgy: Disease Management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bowen GD, Rovira AD** (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. In : *Advances in agronomy*. Elsevier, pp 1–102
- Bright MBH, Diedhiou I, Bayala R, Assigbetse K, Chapuis-Lardy L, Ndour Y, Dick RP** (2017) Long-term *Piliostigma reticulatum* intercropping in the Sahel: Crop productivity, carbon sequestration, nutrient cycling, and soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 242 : 9–22.
- Brunel B** (2006) La microbiologie des sols pp. 115-144 : un champ prometteur pour l’agro-écologie. In : *Pour une gestion intégrée et durable de la production agricole en France*. Paris: Club Demeter.
- Buckley DH, Schmidt TM** (2002) Exploring the diversity of soil - a microbial rainforest In *Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere*, ed. AL Reysenbach. New York, New York, USA: Wiley.
- Burkill HM** (1995) *The useful plants of west tropical Africa*. Vol. 1-3. Richmond, UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Buyer JS, Teasdale JR, Roberts DP, Zasada I.A, Maul JE** (2010) Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems, *Soil Biol.Biochem.*, 42:831-841.
- Caldwell MM, Dawson TE, Richards JH** (1998) Hydraulic lift: consequences of water eÇux from the roots of plants. *Oecologia* 131:151-161.
- Caldwell MM, Richards JH** (1989) Hydraulic lift water efflux from upper roots improves effectiveness of water uptake by deep roots. *Oecologia* 79:1-5
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R** (2010) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26: 266–267.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Donna BL** (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* 108: 4516–4522.
- Cardinale M, Brusetti L, Quatrini P, Borin S, Puglia AM, Rizzi A, Zanardini E, Sorlini C, Corselli C, Daffonchio D** (2004) Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6147–6156.

- Carvalhais LC, Dennis PG, Badri DV, Kidd BN, Vivanco JM, Schenk PM** (2015) Linking Jasmonic Acid Signaling, Root Exudates, and Rhizosphere Microbiomes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28:1049–1058.
- Casamayor EO, Schäfer H, Bañeras L, Pedrós-Alió C, Muyzer G** (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 66: 499–508.
- Casida Jr LE** (1982) *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov. : A bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 32:339–345
- Chao Z, Guo-bin L, Sha X, Lie X** (2013) Effect of Different Vegetation Types on the Rhizosphere Soil Microbial Community Structure in the Loess Plateau of China, *J. Integra. Agricul*, 12: 2103–2113.
- Chidumayo EN, Gumbo DJ** (2010) *The dry forests and woodlands of Africa: managing for products and services*. London; Washington: Earthscan
- Clustal W** (1994) improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice Thompson, Julie D. ; Higgins, Desmond G. ; Gibson, Toby J. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–80.
- Cohen Ac, Travaglia CN, Bottini R, Piccoli PN** (2009) Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*. 87(5): 455-462
- Colares GB, Melo VMM** (2013) Relating microbial community structure and environmental variables in mangrove sediments in side *Rhizophora mangle* L. habitats, *Appl. Soil Ecology*, 64: 171–177.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porrás-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM**(2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42: D633–D642.
- Cordero I, Ruiz-Díez B, de la Peña TC, Balaguer L, Lucas MM, Rincón A, Pueyo JJ** (2016) Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. *Soil Biology and Biochemistry* 96: 39–54.
- Dao MCE** (2012) *Biologie et écologie de la reproduction sexuée d'une Caesalpinioideae (Leguminosae): Piliostigma reticulatum (D.C.) Hochst.* Thèse de Doctorat. Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Accessible en ligne: www.beep.ird.fr/collect/upb1/index/assoc/.../IDR-2012-DAO-BIO.pdf

- de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindström K** (1998) Characterization of tropical tree *Rhizobia* and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48: 369–382.
- de Lajudie P, Willems A, Pot B** (1994) Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sino-rhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44, 71 5-733.
- De Wit R, Bouvier T** (2006) Everything Is Everywhere, but, the Environment Selects; What Did Baas Becking and Beijerinck Really Say? *Environmental Microbiology*, 8, 755-758.
- DeLay CL** (2017) Nitrogen Dynamics and Enzymatic Activities of Shrub-Millet Systems in Senegal. The Graduate School of the Ohio State University: 124.
- Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, Hirsch PR, Vogel TM** (2011) Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1315–1324.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K** (2006) Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5069–5072.
- Diabate M** (2005) Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African tropical rainforest and inoculation response of native species useful in reforestation. *New Phytol*, 166 : 231-239.
- Diack M** (1998) *Piliostigma reticulatum* dans un parc à *Cordyla pinnata* : effet sur la régénération des sols dégradés au Sénégal. Mémoire de titularisation, Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Sénégalais, 53p.
- Diack M, Sene M, Badiane AN, Diatta M, Dick RP** (2000) Decomposition of a native shrub, *Piliostigma reticulatum*, litter in soils of semiarid Senegal. *Arid soil research and rehabilitation* 14: 205–218.
- Diakhaté S, Badiane-Ndour N-Y, Founoune-Mboup H, Diatta S, Fall AF, Hernandez RR, Cournac L, Dick R, Chapuis-Lardy L** (2016b) Impact of Simulated Drought Stress on Soil Microbiology, and Nematofauna in a Native Shrub + Millet Intercropping System in Senegal. *Open Journal of Soil Science* 06: 189–203.
- Diakhaté S, Gueye M, Chevallier T, Diallo NH, Assigbetse K, Abadie J, Diouf M, Masse D, Sembène M, Ndour YB** (2016a) Soil microbial functional capacity and diversity in a millet-shrub intercropping system of semi-arid Senegal. *Journal of Arid Environments* 129:71–79

- Diakhaté S, Villenave C, Diallo NH, Ba AO, Djigal D, Masse D, Sembène PM, Chapuis-Lardy L** (2013) The influence of a shrub-based intercropping system on the soil nematofauna when growing millet in Senegal. *European journal of soil biology* 57: 35–41.
- Diedhiou AG, MbayeFK, Mbodj D, Faye MN, Pignoly S, Ndoye I, et al.** (2016) Field Trials Reveal Ecotype-Specific Responses to Mycorrhizal Inoculation in Rice. *PLoS ONE* 11(12): e0167014. doi:10.1371/journal.pone.0167014.
- Diedhiou I, Diedhiou F** (2010) Des manguiers qui croissent sans arrosage. *Agriculture durable à faibles apports externes*. LEISA Afrique ISSN 0851-7932.
- Diedhiou S** (2007) Activity, composition and structure of soil microbial communities in savannah shrubs of agroecosystems in Semi-arid Senegal. PhD thesis. Oregon State University.
- Diedhiou S, Dossa EL, Badiane AN, Diedhiou I, Sene M, Dick RP** (2009) Decomposition and spatial microbial heterogeneity associated with native shrubs in soils of agroecosystems in semi-arid Senegal. *Pedobiologia* 52: 273–286.
- Diedhiou-Sall S, Dossa EL, Diedhiou I, Badiane AN, Assigbetsé KB, Samba N, Arona S, Kouma M, Sène M, Dick R** (2013) Microbiology and macrofaunal activity in soil beneath shrub canopies during residue decomposition in agroecosystems of the Sahel. *Soil Science Society of America Journal* 77: 501–511.
- Dimitrov MR, Veraart AJ, de Hollander M, Smidt H, van Veen JA, Kuramae EE**(2017) Successive DNA extractions improve characterization of soil microbial communities. *PeerJ5*: e2915.
- Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, de Lajudie P** (2007) Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial ecology* 54:553–566.
- Dixon R, Wheeler C** (1986) Nitrogen fixation in plants. Blackie and Son, Glasgow, UK. 192
- Dommergues YR** (1995) Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 42, 215-230.
- Dorr de Quadros P, Zhalnina K, Davis-Richardson A, Fagen, JR, Drew J, Bayer C** (2012) The Effect of Tillage System and Crop Rotation on Soil Microbial Diversity and Composition in a Subtropical Acrisol. *Diversity* 4: 375–395.
- Dossa EL, Baham J, Kouma M, Sene M, Kizito F, Dick RP** (2008) Phosphorus sorption and desorption in semiarid soils of senegal amended with native shrub residues : *Soil Science* 173 : 669–682.

- Dossa EL, Diedhiou I, Kouma M, Sene M, Badiane AN, Samba-Ndiaye SA, Assigbetse KB, Sall S, Lufafa A, Kizito F, Dick RP, Saxena J** (2013) Crop productivity and nutrient dynamics in a shrub-based farming system of the Sahel. *Agron. J.* 105:1237-1246.
- Dossa EL, Diedhiou S, Compton JE, Assigbetse KB, Dick RP** (2010) Spatial patterns of P fractions and chemical properties in soils of two native shrubs communities in Senegal. *Plant Soil* 327:185–198.
- Dossa EL, Kouma M, Diedhiou I, Sene M, Kizito F, Badiane AN, Samba SAN, Dick RP** (2009) Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization potential of semiarid Sahelian soils amended with native shrub residues. *Geoderma* 148:251–260.
- Doucet, JL** (2003) L'alliance délicate de la gestion forestière et de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon. Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).
- Dreyfus BL, Dommergues, YR** (1981) Nodulation of Acacia species by fast and slow growing tropical strains of Rhizobium. *Appl Environ Microbiol* 41: 97–99.
- Dunbar J, Barns SM, Ticknor LO, Kuske CR** (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microbiol.* 68 : 3035-3045.
- Duodu S, Nsiah EK, Bhuvaneswari TV, Svenning MM** (2006) Genetic diversity of a natural population of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii analysed from field nodules and by a plant infection technique. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1162-1165.
- Dwivedi SL, Sahrawat KL, Upadhyaya HD, Mengoni A, Galardini M, Bazzicalupo M** (2015) Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen. Fixation in Grain Legumes. *Adv. Agron.* 129, 1-116.
- Edgar RC** (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC** (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids research* 17:7843–7853.
- El Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W, Top EM** (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:982–988.
- FAO** (2009) Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of food and agriculture; livestock in the balance. F.A.O., Rome.

- Felczykowska A, Krajewska A, Zielińska S, Łoś JM** (2015) Sampling, metadata and DNA extraction - important steps in metagenomic studies. *Acta Biochimica Polonica* **62**: 151–160.
- Félix GF, Scholberg JM, Clermont-Dauphin C, Cournac L, Tittone P** (2018) Enhancing agroecosystem productivity with woody perennials in semi-arid West Africa. A meta-analysis.
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Robeson M, Edwards RA, Felts B, Rayhawk S** (2007) Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 7059–7066.
- Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA, Knight R** (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME journal* **6**: 1007–1017.
- Fisher MM, Triplett EW** (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 4630-4636.
- Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB** (2003) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology*, **44**:153–163.
- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, van Elsas JD** (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **38**:1–15.
- Gholami A, Biyari A, Gholipour M, Rahmani HA** (2012) Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions. *Communications in soil science and plant analysis.* **43**: 1263-1272.
- Gibson AH** (1963) Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. *Australian Journal of Biological Sciences* **16**:28–42.
- Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Munoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GE** (2006) Nodulation independent of *Rhizobia* induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**, 1149-1152.
- Gobat JM, Aragno M, Matthey W** (1998) *Le Sol vivant*. Bases de pédologie biologie des sols. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- Gomiero T** (2016) Soil Degradation, Land Scarcity and Food Security: Reviewing a Complex Challenge. *Sustainability* **8**: 281.
- Graham PH, Sadowsky M J, Keyser H H, Barnett Y M, Bradley RS, Cooper JE, Deley DJ, Jarvis BDW, RoslyCcky EB, Strijdom BW, Young JPW** (1991) Proposed minimal standards for

- the description of new genera and species of root-and stem nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 582-587.
- Groffman PM, Bohlen PJ** (1999) Soil and sediment biodiversity: cross-system comparisons and large-scale effects. *BioScience* 49:139–48.
- Gutierrez-Zamora ML, Martnez-Romero E** (2001) Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology* 91, 117-126.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, Bontemps C** (2011) Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1276–1288.
- Hawthorne WD** (1995) *Ecological profiles of Ghanaian forest trees*. Oxford, UK: University of Oxford.
- Her J, Kim J** (2013) *Rummeliibacillus suwonensis* sp. nov., isolated from soil collected in a mountain area of South Korea. *Journal of Microbiology* 51: 268–272.
- Hernandez RR, Debenport SJ, Leewis M-CC, Ndoye F, Soumare A, Thuita M, Gueye M, Miambi E, Chapuis-Lardy L, Diedhiou I** (2015) The native shrub, *Piliostigma reticulatum*, as an ecological “resource island” for mango trees in the Sahel. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 204: 51–61.
- Heuer H, Wieland G, Schonfeld J, Schnwalder A, Gomes NCM, Smalla K** (2001) Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: Rochelle, P.A. (Ed.), *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp. 177–190.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P** (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical journal* 50: 346–363.
- Housman DC, Yeager CM, Darby BJ, Sanford RL, Kuske CR, Neher DA, Belnap J** (2007) Heterogeneity of soil nutrients and subsurface biota in a dryland ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2138–2149.
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D.** (2017). Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. *BioScience*, 67(4), 386-391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>.
- Ibekwe AM, Poss JA, Grattan SR, Grieve CM, Suarez D** (2010) Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron, *Soil Biol. & Biochem.*, 42: 567–575.

- Iizuka H, Komagata K** (1963) New species of *Pseudomonas* belonging to fluorescent group. (Studies on the microorganisms of cereal grains. Part V). *Nippon Nogekagaku Kaishi* 37:137–141.
- Iyamuremye F, Gewin V, Dick RP, Diack M, Sené M, Badiane A, Diatta M** (2000) Carbon, Nitrogen and Phosphorus mineralization potential of native agroforestry plant residues in soils of Senegal. *Arid. Soil Res. Rehabil.*, 14: 359-371.
- Janssen PH** (2006) Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1719–1728.
- Jurasinski G, Retzer V, Beierkuhnlein C** (2009) Inventory, differentiation, and proportional diversity: a consistent terminology for quantifying species diversity. *Oecologia* 159: 15–26.
- Kajiyama S, Kawasaki H, Yagi M, Seki T, Fukusaki E, Kobayashi A** (2002) *Paenibacillus glycanilyticus* sp. nov., a novel species that degrades heteropolysaccharide produced by the cyanobacterium *Nostoc commune*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52:1669–1674.
- Kämpfer P, Martin K, McInroy JA, Glaeser SP** (2015) Proposal of *Novosphingobium rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65:195–200.
- Karthikeyan B, Abdul Jaleel C, Lakshmanan GMA, Deiveekasundaram M** (2008) Studies on rhizosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants, *Colloi. Surf. B: Biointerf.*62: 143–145.
- Kaur T, Sharma D, Kaura A, Manhasa RK** (2013) Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 46: 1756–1768.
- Kennedy AC, Smith KL** (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.
- Khiangam S, Tanasupawat S, Akaracharanya A, Kim KK, Lee KC, Lee JS** (2010) *Cohnella xylanilytica* sp. nov. and *Cohnella terrae* sp. nov. xylanolytic bacteria from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60: 2913–2917.
- Kielak A, Pijl AS, van Veen JA, Kowalchuk GA** (2009) Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *The ISME Journal*3: 378–382.
- Kim C, Kecskés ML, Deaker RJ, Gilchrist K, New PB, Kennedy IR, Kim S, Sa T** (2005) Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea, *Can. J. Microbiol.*, 51: 948–956.

- Kim SB, Nedashkovskaya OI, Mikhailov VV** (2004) *Kocuria marina* sp. Nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54: 1617–1620.
- Kishore GK, Pande S, Podile AR** (2005) Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Lett Appl Microbiol* 40: 260-268.
- Kizito F, Dragila M, Sène M, Lufafa A, Diedhiou I, Dick RP, Selker JS, Dossa E, Khouma M, Badiane A** (2006) Seasonal soil water variation and root patterns between two semi-arid shrubs co-existing with Pearl millet in Senegal, West Africa. *Journal of Arid Environments* 67: 436–455.
- Kizito F, Dragila MI, Senè M, Brooks JR, Meinzer FC, Diedhiou I, Diouf M, Lufafa A, Dick RP, Selker J, Cuenca R** (2012) Hydraulic redistribution by two semi-arid shrub species: implications for Sahelian agro-ecosystems. *J. Arid Environ.* 83: 69–77.
- Kneip C, Lockhart P, Voß C, Maier UG** (2007) Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* 7: 55.
- Koranda M, Schnecker J, Kaiser C, Fuchslueger L, Kitzler B, Stange CF, Sessitsch A, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A** (2011) Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech –The influence of plant C exudates, *Soil Biol. & Biochem.*, 43 : 551–558.
- Kouadio YL** (2009) Mesures sylvicoles en vue d’améliorer la gestion des populations d’essences forestières commerciales de l’Est du Cameroun. Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).
- Koulibaly B, Traore O, Dakuo D, Lalsaga R, Lompo F, Zombre P** (2015) Acidification des sols ferrugineux et ferrallitiques dans les systèmes de production cotonnière au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8: 2879.
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE** (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* 38:501–505.
- LaBauer DS, Treseder KK** (2008) Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89: 371–379.
- Lafay B, Burdon JJ** (2007) Molecular Diversity of Legume Root-Nodule Bacteria in Kakadu National Park, Northern Territory, Australia. *PLoS ONE* 2, e277.
- Laikie P, Brookfield H** (1994) *Land Degradation and Society*. London and New York, Routledge ed., 296.

- Lal R, Safriel U, Boer B** (2012) Zero Net Land Degradation: A New Sustainable Development Goal for Rio+ 20. [A report prepared for the Secretariat of the United Nations Convention to Combat Desertification].
- Lavelle P, Lattaud C, Trigo D, Barois I** (1995) Mutualism and biodiversity in soils. In: The significance and regulation of soil biodiversity. Springer, 23–33.
- Lemanceau P** (1992) Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, 12, 413-437.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M** (2005) *Legumes of the World*. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewis GP, Schrire BD, Mackinder BA, Rico L, Clark R** (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context: A tool for collections management and taxon sampling. *S. African J. Bot.*89: 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.005>.
- Li C, Yan K, Tang L, Jia Z, Li Y** (2014) Change in deep soil microbial communities due to long-term fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 75 : 264–272.
- Lin Y, Du D, Si C, Zhao Q, Li Z, Li P** (2014) Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers, *Biological Control*, 71: 7–15.
- Liu J, Luo J, Ye H, Sun Y, Lu Z, Zeng X** (2010) In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers* 82: 1278–1283.
- Lloyd DA, Ritz K, Paterson E, Kirk GJD** (2016) Effects of soil type and composition of rhizodeposits on rhizosphere priming phenomena. *Soil Biol. Biochem.* 103: 512–521.
- Lo CW, Lai NS, Cheah HY, Wong NKL, Ho CC** (2002) Actinomycetes isolated from soil samples from the Crocker Range Sabah. *ASEAN Review Biodiversity and Environmental Conservation* 9: 1-7.
- LPWG, Legume Phylogeny Working Group** (2013) Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* 62: 217–248.
- LPWG, Legume Phylogeny Working Group** (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny 66:44–77.
- Lufafa A, Bolte J, Wright D, Khouma M, Diedhiou I, Dick RP, Kizito F, Dossa E, Noller JS** (2008) Regional carbon stocks and dynamics in native woody shrub communities of Senegal’s Peanut Basin. *Agriculture, ecosystems & environment* 128: 1–11.

- Lupwayi N, Kennedy A, Chirwa R** (2011) Grain legume impacts on soil biological processes in sub-Saharan Africa. *Afr. J. of Plant Sci.* 5, 1-7.
- Lynch JM** (1983) *Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lynch JM, Whipps JM** (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129: 1–10.
- Maarit Niemi R, Heiskanen I, Wallenius K, Lindström K** (2001) Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods* 45, 155–165.
- Mahieu S, Frérot H, Vidal C, Galiana A, Heulin K, Maure L** (2011) *Anthyllis vulneraria*/Mesorhizobium metallidurans, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant. Soil.* 342, 405-417.
- Martinez-Romero E** (2009) Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis? *DNA and Cell Biology* 28, 361-370.
- Masella AP, Bartram AK, Truskowski JM, Brown DG, Neufeld JD** (2012) PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13: 31.
- McGahan DG, Southard RJ, Zasoski RJ** (2014) Rhizosphere effects on soil solution composition and mineral stability, *Geoderma*, 226–227: 340–347.
- McHardy AC, Rigoutsos I** (2007) What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples. *Curr Opin Microbiol.* 10: 499-503.
- McNeill MM, Brown JM** (1994) The medically important aerobic actinomycetes - epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Review* 7: 357-417.
- Micallef SA, Shiaris MP, Colón-Carmona A** (2009) Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J. Exp. Bot.* 60: 1729–1742
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC** (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4715–4724.
- Miransari M** (2011) Soil microbes and plant fertilization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92: 875-885
- Mokwunye AU, De Jager A, Smaling EMA** (1996) Restoring and Maintaining the productivity of West African soils: key to sustainable development, IFDC miscellaneous studies no. 9, Lome, Togo.
- Mulvaney RL** (1996) Nitrogen – inorganic forms. p. 1123-1184. In D.L. Sparks et al. (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical properties*. SSSA Book Ser. 5. Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI.

- Myers NRA, Mittermeier CG, Mittermeier GAB, da Fonseca JK** (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nakatsu CH** (2007) Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal* 71: 562.
- Nakatsu, CH, Carmosini N, Baldwin B, Beasley F, Kourtev P, Konopka A** (2005) Soil microbial community responses to additions of organic carbon substrates and heavy metals (Pb and Cr). *Appl. Environ.*
- Nguyen C** (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23, 375-396.
- Nick G, de Lajudie P, Eardly BD, Suomalainen S, Paulin L, Zhang X, Gillis M, Lindstrom K** (1999) *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1359-1368.
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P** (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *ResearchGate* 15: 327–337.
- Noguez AM, Arita HT, Escalante AE, Forney LJ, Garcia-Oliva F, Souza V** (2005) Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest, *Global. Ecol. Biogeog.*, 14: 241–248.
- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M, Simonet P** (1996) ITS analysis of prokaryotes. *In* D. L. Akkermans, J. D. van Elsas and E. I. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 1-12.
- Odee DW, Haukka K, McInroy SG, Sprent JI, Sutherland JM, Young JPW** (2002) Genetic and symbiotic characterization of *Rhizobia* isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 801–811.
- OIBT** (2012) Examen annuel et évaluation de la situation mondiale des bois. Yokohama, Japon : Organisation Internationale des Bois Tropicaux.
- Ouedraogo ZM** (2014) Effets de la couverture du sol à base de *Piliostigma reticulatum* (De) Hoscht sur l'association sorgho-niébé dans le village de Yilou, Province du BanI (Burkina Faso). Master En Production Vegetale Université Polytechnique De Bobo-Dioulasso.
- Øvreås L** (2000) Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology letters*, 3: 236-251.

- Ovreas L, Forney L, Daae FL, Torsvik V** (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63(9): 3367-3373.
- Palmer E, Pitman N** (1972) *Trees of Southern Africa*, covering all known indigenous species in the Republic of South Africa, South-West Africa, Botswana, Lesotho & Swaziland. Cape Town, South Africa: A. A. Balkema.
- Paterson E, Gebbing T, Abel C, Sim A, Telfer G** (2007) Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytol.* 173: 600–610.
- Pedraza RO** (2008) Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Journal of food microbiology.* 125: 25-35.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL** (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110: 6548–6553.
- Perrineau MM, Galiana A, de Faria SM, Bena G, Duponnois R** (2012) Monoxenic nodulation process of *Acacia mangium* (Mimosoideae, Phyllodineae) by *Bradyrhizobium* sp. *Symbiosis* 56: 87–95.
- Poly F, Monrozier LJ, Bally R** (2001) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152: 95–103.
- Prescott CE, Grayston SJ** (2013) Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management* 309: 19-27.
- Pretty JN, Morison JI, Hine RE** (2003) Reducing food poverty by increasing agricultural sustainability in developing countries. *Agric. Ecosystems Environ.*
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y** (2009) The rhizosphere : a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341–361.
- Ralston E, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1973) *Pseudomonas pickettii*, a new species of clinical origin related to *Pseudomonas solanacearum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23: 15–19.
- Ramette A** (2009) Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 75: 2495-2505.
- Ranjard L, Poly F, Lata J-C, Mougél C, Thioulouse J, Nazaret S** (2001) Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

- Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4479–4487.
- Rappe MS, Giovannoni SJ** (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 57: 369-394.
- Ray S, Datta R, Bhadra P, Chaudhuri B, Mitra AK** (2012) From space to Earth: *Bacillus Romdhane* SB.
- Raynaud X** (2010) Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model, *Soil Biol. & Biochem.*, 42: 210–219.
- Recous S, Lashermes G, Bertrand I** (2017) Couplages et contrôles des cycles du carbone et de l’azote par les communautés microbiennes dans les sols cultivés. : 28.
- Remigi P, Zhu J, Young JPW, Masson-Boivin C** (2016) Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology* 24: 63–75.
- Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM** (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 495-498.
- Roose E** (2004) La gestion conservatoire de l'eau et de la fertilité des sols : une stratégie nouvelle de la lutte anti-érosive pour le développement durable. *Sécheresse*, 15 (1), 5-7.
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4: 406–425.
- Sall SN, Ndour NYB, Diédhiou-Sall S, Dick R, Chotte JL** (2015) Microbial response to salinity stress in a tropical sandy soil amended with native shrub residues or inorganic fertilizer. *Journal of environmental management* 161: 30–37.
- Sanaullah M, Blagodatskaya E, Chabbi A, Rumpel C, Kuzyakov Y** (2011) Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition, *Appl. Soil Ecology*, 48 : 38–44.
- Sanchez PA** (1976) *Properties and management of soils in the tropics*. John Wiley and Sons, New York.
- Sankhla IS, Tak N, Meghwal RR, Choudhary R S, Tak A, Rathi S, Sprent J, James E, Gehlot H** (2017) Molecular characterization of nitrogen fixing microsymbionts from root nodules of *Vachellia (Acacia) jacquemontii*, a native legume from the thar Desert of India. *Plant and soil* 410: 21–40.
- Schneider A, Huyghe C** (2015). *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durable*. Éditions Quæ RD 10, 78026 Versailles Cedex.

- Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, Uchiyama H** (2001) A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology letters* 23: 1205–1208.
- Shannon CE, Weaver W** (1962) *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL, USA.
- Simpson EH** (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163:688.
- Singh RP, Dhanial G, Sharma A, Jaiwal PK** (2007) Biotechnological approaches to improve phytoremediation efficiency for environment contaminants. In: *Environmental bioremediation technologies*, Singh, S. N ; Tripathi, R. D. (Eds) Springer, 223-258.
- Sparling GP** (1997) Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (eds) *Biological indicators of soil health*. CAB International. 97–119.
- Sprent JI, Odee DW, Dakora FD** (2009) African legumes: a vital but under-utilized resource. *Journal of Experimental Botany*, erp342.
- Sprent JI, Ardley J, James EK** (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist* 215: 40–56.
- Stach JE, Bathe S, Clapp JP, Burns RG** (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 36: 139-151.
- Stajkovic O, Delic D, Josic D, Kuzmanović DD, Rasulić N, Knežević-Vukčević J** (2011) Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. *Rom Biotechnol Lett* 16: 5919–5926.
- Subramanian P, Kim K** (2015) "Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110." *Plant Growth Regulation* 76(3): 327-332.
- Sul WJ, Asuming-Brempong S, Wang Q, Turlousse DM, Penton CR, Deng Y, Rodrigues JLM, Adiku SGK, Jones JW, Zhou J, Cole JR, Tiedje JM** (2013) Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon, *Soil Biol. Biochem.*, 65 : 33–38.
- Swift MJ, Andren O, Brussaard L, Briones M, COUTEAUX M-M, Ekschmitt K, Kjoller A, Loiseau P, Smith P** (1998) Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. *Global Change Biology* 4: 729–743.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S** (2013) MEGA6 : molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30: 2725–2729.
- Team RC** (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Tebbe CC, Vahjen W** (1993) Interference of humic acids and DNA Extracted Directly from soil in detection and transforamation of receombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* 59: 2657–2665.
- TerrAfrica** (2006) Assessment of the Nature and Extent of Barriers and Bottlenecks to Scaling Sustainable Land Management Investments throughout Sub-Saharan Africa. Unpublished TerrAfrica report.
- Theelen B, Silvestri M, Gueho E, van Belkum A, Boekhout T** (2001) Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res.* 1: 79–86.
- Thioulouse J, Chessel D, Doledec S, Olivier JM** (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statitics and computing*, 7:75-83.
- Thrall PH, Millsom DA, Jeavons AC, Waayers M, Harvey GR, Bagnall DJ, Brockwell J** (2005) Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. *Journal of Applied Ecology* 42, 740-751.
- Toal ME, Yeomans C, Killham K, Meharg AA** (2000) A review of rhizosphere carbon flow modelling. *Plant and Soil* 222: 263–281C.
- Torsvik V, Øvreås L** (2002) Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:240–245.
- Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J** (2013) Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME journal* 7:2248.
- Vasileiadis S, Puglisi E, Arena M, Cappa F, Veen JA van, Cocconcelli PS, Trevisan M** (2013) Soil microbial diversity patterns of a lowland spring environment. *FEMS Microbiology Ecology*86: 172–184.
- Vašková D** (2014) The importance of actinobacteria in arctic soil. : 26.
- Vaz-Moreira I, Faria C, Nobre MF, Schumann P, Nunes OC, Manaia CM** (2007) *Paenibacillus humicus* sp. nov., isolated from poultry litter compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57: 2267–2271.

- Vincent JM** (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- Vlek PLG, Le QB, Tamene L**(2010) Assessment of Land Degradation, Its Possible Causes and Threat to Food Security in Sub-Saharan Africa. In: Food Security and Soil Quality. CRC Press, 67–96.
- von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E** (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 21: 213-229.
- Wall LG** (2000) The actinorhizal symbiosis. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 167–182.
- Wang LY, Chen SF, Wang L, Zhou YG, Liu HC** (2012) *Cohnella plantaginis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from plantain rhizosphere soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 102: 83–89.
- Wang Y, Dai CC** (2011) Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology* 61: 207–215.
- Watson SW, Bock E, Harms H, Koops H-P, Hooper AB** (1989) Nitrifying bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. R. G. E. Murray, D. J. Brenner, M. P. Bryant, J. G. Holt, N. R. Krieg, J. W. Moulder, N. Pfennig, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. Williams. pp. 1808-1834. Vol. 3. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Wezel A, Rajot JL, Herbrig C** (2000) Influence of shrubs on soil characteristics and their function in Sahelian agro-ecosystems in semi-arid Niger. *Journal of arid environments* 44: 383–398.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ** (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 6578-6583.
- Willey RW** (1979) Intercropping - its importance and research needs. 1. Competition and yield advantages. *Field Crops Abstracts* 32: 1–10.
- Wise, M.G., JV McArthur, LJ Shimkets** (1999) Methanotroph diversity in landfill soil: Isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 4887–4897.
- Woese C R** (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221-271.
- Xu W, Liu W, Yang W, Tang C, Blank D** (2012) *Rhombomys opimus* contribution to the “fertile island” effect of tamarisk mounds in Junggar Basin. *Ecological Research* 27: 775–78.
- Xu Y, Wang G, Jin J, Liu J, Zhang Q, Liu X** (2009) Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage, *Soil Biol. Biochem.*, 41 : 919–925.

- Yélémou B, Yaméogo G, Zerbo L, Koala J, Ganaba S, Millogo-Rasolodimby J** (2013) Adaptation of the genus *Piliostigma* to climatic aridity in the sahel-soudanian zone: Effect of pedoclimatic factors on the root system. *Asian Journal of Plant Science and Research* 3: 84–94.
- Yelemou B, Bationo BA, Yameogo G, Millogo-Rasolodimby J** (2007) Gestion traditionnelle et usages de *Piliostigma reticulatum* sur le Plateau central du Burkina Faso. *Bois et Forêts des Tropiques* 291 :55–66.
- Yelemou B, Yameogo G, Bationo B, Millogo R.J, Hien V** (2012) Les formations à *Piliostigma* en zone sahélo-soudanienne du Burkina Faso : Etat des peuplements, dynamique de la régénération sexuée et pression anthropique. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 6:2083-2096.
- Zak DR, Grigal FD, Gleeson S, Tilman D** (1990) Carbon and nitrogen cycling during old-field succession: constraints on plant and microbial biomass. *Biogeochemistry* II: 111-129.
- Zakhia F, Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, De Lajudie P** (2006) Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial ecology* 51: 375–393.
- Zerbo D** (2011) Gestion paysanne, densités et production de biomasse aérienne de *Piliostigma reticulatum* (D.C.) Hoscht dans les agrosystèmes du Centre Nord: cas des village de Yilou et de Barsa dans la province du Barn. Mémoire de fin de cycle, Institut du Développement Rural/Université Polytechnique de Bobo- Dioulasso, Burkina Faso, 62p.
- Zhang G, Peng G, Wang E, Yan H, Yuan Q, Zhang W, Lou X, Wu H, Tan Z** (2008) Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacterdiazotrophicus* gen. nov. sp. nov. *Archives of Microbiology* 189, 431-439.
- Zielińska S, Radkowski P, Blendowska A, Ludwig-Gałęzowska A, Łoś JM, Łoś M** (2017) The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. *MicrobiologyOpen* 6: e00453.

ANNEXES

Annexe1.

Tableau I : Nombre de séquences obtenues avec le kit Fast DNA

Echantillons	Nombre de séquences	Notes
FE1	14785	Passed
FE2	9339	Number of reads too low
FE3	7826	Number of reads too low
FE4	28617	Passed
FE5	15876	Passed
FE6	8489	Number of reads too low
FP1	23924	Passed
FP2	42218	Passed
FP3	104383	Passed
FP4	28514	Passed
FP5	10032	Passed
FP6	23321	Passed
FT1	39537	Passed
FT2	27385	Passed
FT3	11758	Passed
FT4	42582	Passed
FT5	39355	Passed
FT6	2143	Number of reads too low

Tableau II : Nombre de séquences obtenues avec le kit MoBio

Echantillons	Nombre de séquences	Notes
ME1	90022	Passed
ME2	29465	Passed
ME3	6582	Number of reads too low
ME4	26819	Passed
ME5	5776	Number of reads too low
ME6	71593	Passed
MP1	12027	Passed
MP2	25468	Passed
MP3	10515	Passed
MP4	33496	Passed
MP5	70843	Passed
MP6	98273	Passed
MT1	14401	Passed
MT2	11823	Passed
MT3	15701	Passed
MT4	21026	Passed
MT5	5833	Number of reads too low
MT6	38686	Passed

Tableau III : Nombre de séquences obtenues avec le kit NucléoSpin

Echantillons	Nombre de séquences	Notes
NE1	4777	Number of reads too low
NE2	30066	Passed
NE3	5577	Number of reads too low
NE4	79028	Passed
NE5	10895	Passed
NE6	14176	Passed
NP1	12439	Passed
NP2	117687	Passed
NP3	17821	Passed
NP4	4864	Number of reads too low
NP5	51332	Passed
NP6	25493	Passed
NT1	14005	Passed
NT2	10127	Passed
NT3	7697	Number of reads too low
NT4	24589	Passed
NT5	664	Number of reads too low
NT6	46660	Passed

Annexe 2.**Tableau IV : Les 30 ordres répertoriés et leur abondance relative dans chaque sol étudié**

Ordre	<i>P. reticulatum</i>	<i>E. guineense</i>	Temoin
<i>Acidoles</i>	525,47	401,45	236,07
<i>Solibacterales</i>	348,88	304,82	232,36
<i>Acidimicrobiales</i>	180,53	179,27	106,79
<i>Actinomycetales</i>	1074,35	780,27	411,50
<i>Rubrobacterales</i>	25,59	16,09	18,64
<i>Gaiellales</i>	757,65	583,82	633,64
<i>Solirubrobacterales</i>	294,59	325,45	415,29
<i>Saprospirales</i>	41,06	32,36	14,79
<i>Chlamydiales</i>	6,29	2,55	2,29
<i>Roseiflexales</i>	37,88	45,09	79,71
<i>Ktedonobacterales</i>	607,47	642,91	356,43
<i>Thermogemmatisporales</i>	419,59	356,64	393,57
<i>Bacillales</i>	399,47	629,45	768,21
<i>Clostridiales</i>	15,82	17,91	25,07
<i>Nitrospirales</i>	67,06	30,64	30,29
<i>Gemmatales</i>	286,24	262,18	189,93
<i>Pirellulales</i>	24,12	19,55	10,29
<i>Caulobacterales</i>	42,18	46,45	16,93
<i>Rhizobiales</i>	1962,29	1698,64	570,36
<i>Rhodospirillales</i>	874,94	717,91	367,36
<i>Sphingomonadales</i>	34,53	48,00	83,07
<i>Burkholderiales</i>	67,29	62,09	25,93
<i>Entotheonellales</i>	56,18	48,18	33,71
<i>Myxococcales</i>	98,18	114,36	81,50
<i>Syntrophobacterales</i>	232,71	110,73	47,21
<i>Thiotrichales</i>	10,53	3,91	0,71
<i>Xanthomonadales</i>	65,88	44,00	17,64
<i>Pedosphaerae</i>	102,24	57,82	30,14
<i>Chthoniobacterales</i>	519,94	327,64	119,21
<i>Sediment-1</i>	53,00	8,36	2,00

Annexe 3.

Valorisation des travaux de thèse

- **Article publié dans une revue internationale**

Annexe 3.1: Niang Nogaye, Demanèche Sandrine, Ndoye Ibrahima, Navarro Elisabeth, Fall Saliou (2018). **Genetic diversity of *Rhizobia* and plant growth promoting rhizobacteria of soil under the influence of *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst and their impact on shrub growth.** African Journal of Agricultural Research

- **Article en préparation:** Niang Nogaye, Demanèche Sandrine, Ndoye Ibrahima, Navarro Elisabeth, Fall Saliou **Metagenomic diversity and influence of DNA extraction methods on bacterial communities associated with *P. reticulatum*.** Plant and soil

- **Communications orales et affichées**

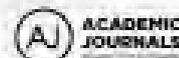
Annexe 3.2. **Amélioration de la croissance d'un arbuste indigène : *Piliostigma reticulatum* utilisé comme plante bénéfique associée aux céréales dans la zone semi-aride de la savane.** Communication orale présentée à la 1ère édition des journées scientifiques du campus de recherche de bel-Air en Juin 2016, ISRA Pôle de Recherche de Hann et aux Doctoriales de l'école doctorale SEV en 2016.

Annexe 3.3. **Study of bacterial diversity in rhizosphere soil of two Caesalpinioideae (*Piliostigma reticulatum* and *Erythrophleum guineense*) associated with dry cereal crops in West Africa.** Poster présenté au «ASM Microbe» en Juin 2016/ Boston/ USA et 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 3.4. **Diversity of endophytic bacteria from *Faidherbia albida*, *Acacia bivenosa* and *Acacia seyal* trap host species and their impact on the growth of *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst shrub.** Poster présenté à la Conférence internationale Intensification Durable : Biodiversité et ingénierie écologique pour une intensification durable de l'agriculture tenue en avril 2017 à l'hôtel Ngor Diarama, Dakar, Sénégal.

Annexe 3.1.

Vol. 13(6), pp. 600, 61, 2018
 DOI: 10.5897/AJAR2018
 Article Number: 600
 ISSN 1991-637X
 ©Copyright ©2018
 Author(s) retain the copyright of this article
 http://www.academicjournal.org/AJAR



African Journal of Agricultural
 Research

Full Length Research Paper

Genetic diversity of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria of soil under the influence of *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst and their impact on shrub growth

Nogaye Niang^{1,2}, Sandrine Demanéche⁴, Ibrahima Ndoye^{1,2}, Elisabeth Navarro^{4,5}, Sallou Fall^{2,3}

¹Département de biologie végétale, Université Cheikh Anta DIOP (UCAD) BP 5000, Dakar/Sénégal.

²Laboratoire Commun de Microbiologie, (LCM) / LMI LAFSE, Route des hydrocarbures Bp1386 Dakar, CP 18524 Sénégal.

³Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), LNRPV, Route des hydrocarbures Bp1386 Dakar, CP 18524 Sénégal.

⁴Université de Lyon, École Centrale de Lyon, Laboratoire Ampère (CNRS UMR5005), Environmental Microbial Genomics, Ecully, France.

⁵IRD-UMR LBIM, Campus de Balgarnet, Montpellier, France.

(Received 27 August, 2018; Accepted 4 October, 2018)

Piliostigma reticulatum shrub is a native legume found in fallow areas in dry and semi-dry savanna soil and is used in intercropping systems. The aim was to understand the functioning of the rhizosphere, particularly the involvement of symbiotic and free living-N fixing bacteria. Soil extracts collected from *P. reticulatum* roots were sampled in two contrasting areas and endophytic bacterial communities were isolated using three trap host species (*F. albida*, *A. bivenosa* and *V. soya*). Potential endophytic bacteria (PEB) were characterized by RFLP, *nifH* PCR and by 16S rRNA gene sequencing. The subsequent behavior of *P. reticulatum* was monitored *in vitro* by measuring leaf weight, biomass and chlorophyll content, after inoculation with PEB. This approach enabled isolation of 68 bacteria belonging to different genotypes. The most abundant genera were *Cohnella* (27.85%) among which 11 isolates clustered together and could represent a new species closely related to *C. plantaginis*. The other dominant genera were *Paenibacillus* (21.27%), *Bradyrhizobium* (14.88%) and *Ensifer* (8.6%). The nitrogen fixing gene (*nifH*) was detected in 21 strains and in particular, detected in a single isolate (PZ8_304) close to *Cohnella xyloxytica*. The strains PZ8_305 (*Ensifer*) and PZ9_A18 (*Cohnella*) significantly increased certain parameters including shoot dry weight, shrub height at 60 days and photosynthetic activity (SPAD), compared to non-inoculated controls. The result obtained showed that soil under the influence of *P. reticulatum* roots harbored a specific diversity of endophytic bacteria including two free living-N fixing bacteria with the potential to improve the growth of *P. reticulatum* in natural conditions.

Key words: *Piliostigma reticulatum*, microbiology, phylogeny, Potential endophytic bacteria (PEB), nitrogen-fixing bacteria.

INTRODUCTION

The rhizosphere of legumes is a fertile zone due to the accumulation of different organic compounds released

Annexe 3.2.



UNIVERSITE CHEKH ANTA DIOP



ECOLE DOCTORALE 'SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE
L'ENVIRONNEMENT (ED-SEV)

(sujet de thèse) Amélioration de la croissance d'un arbuste indigène : *Piliostigma reticulatum* utilisé comme plante bénéfique associée aux céréales dans la zone semi-aride de la savane

UER 301
Biotechnologies végétales et microbiennes et amélioration des plantes

Nogaye NIANG, niangmamie@yahoo.fr
Directeur de thèse : Pr Ibrahima NDOYE, professeur titulaire des universités (UCAD) Fann/ Dakar, sénégal, ibrahima.ndoye@ird.fr
Codirecteur de thèse : Dr Saliou FALL, Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), LNRPV, LCM, sfaall@gmail.com

UMR/UR/ESP
Amélioration des plantes

Introduction

Le Sahel est un environnement touché par la dégradation des terres causée entre autre par la désertification des sols, les mauvaises pratiques agricoles etc. Il devient donc urgent d'adopter de bonnes stratégies pour réhabiliter les sols et créer les conditions de l'assurance d'une sécurité alimentaire. Ainsi, l'association céréales- *Piliostigma reticulatum* (légumineuse) est proposée comme une alternative pour améliorer à la fois le statut organique des sols et la production des cultures. Dans ce cas, une étude de la diversité des bactéries associées à la rhizosphère de *P. reticulatum* aidera à mieux comprendre l'impact et le rôle de l'arbuste dans la fertilité des sols.

Objectifs

Il s'agit d'évaluer l'impact de *P. reticulatum* sur la diversité des communautés bactériennes du sol.

Matériel et Méthodes

L'échantillonnage est constitué de 18 sols prélevés sous 6 pieds de *P. reticulatum*, sous 6 pieds de *E. guineense* (témoin positif) et 6 prélèvements de sol nu (témoin négatif) dans une même zone. Différentes approches moléculaires (DGGE, RISA) ont été réalisées et complétées par une analyse plus exhaustive des communautés bactériennes par le séquençage illumina Miseq.

Résultats obtenus

Les profils de RISA et de la DGGE montrent plusieurs bandes, ce qui suggère la présence de bactéries différentes et une grande diversité. Une grande similarité de structure entre les traitements *P. reticulatum* et *E. guineense* est observée. Aussi, les analyses en composantes principales (ACP) montrent que les communautés bactériennes sous *P. reticulatum* sont très éloignées de celles du sol nu.

De plus, l'analyse des données de séquençage à haut débit montre que les groupes taxonomiques : Actinobacteria, Protéobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia et Chloroflexi sont significativement dominants dans la rhizosphère de *P. reticulatum* comparés à celle de *E. guineense* et du sol nu. Les groupes sont respectivement représentés au niveau des sols rhizosphériques, de *P. reticulatum* par (41,05%, 44,94%, 48,55%, 54,00% et 35,52%), de *E. guineense* par (32,25%, 38,04%, 30,73%, 32,86% et 33,24%), et enfin au niveau du sol nu par (26,69%, 17,02%, 20,73%, 13,13% et 31,25%). Alors que le groupe des Firmicutes est plus représenté au niveau du sol nu avec 42,66%, comparé aux sols rhizosphériques de *P. reticulatum* (22,43%) et *E. guineense* (34,91%).

Conclusion

Nos résultats ont montré que la présence de l'arbuste *P. reticulatum* augmente de manière significative la diversité des communautés bactériennes du sol à l'exception des Firmicutes.

Retombées scientifiques

Ces travaux devront permettre un maintien et une association de l'arbuste *P. reticulatum* avec les cultures dans les champs pour améliorer la fertilisation des sols pauvres et des terres dégradées, d'où une augmentation de la production.

Impacts socio-économiques

Une bonne connaissance de la diversité des bactéries associées à l'arbuste *P. reticulatum* pourrait contribuer à une meilleure compréhension du rôle des arbustes pérennes comme *P. reticulatum*. Les communautés bactériennes bénéfiques pourront être enrichies et apportées sous forme d'inoculum dans les pépinières de *P. reticulatum*.

Mots-clés : *P. reticulatum*, diversité, bactéries, approches métagénomiques, fertilisation des terre

Annexe 3.3.

Diversity of endophytic bacteria from *Faidherbia albida*, *Acacia bivenosa* and *Acacia seyal* trap host species and their impact on the growth of *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst shrub.

Nogaye Niang^{1,2}, Sandrine Demaneche⁴, Ibrahima Ndoye^{1,2}, Elisabeth Navarro^{4,5}, Sallou Fall^{2,3}

- 1: Département de biologie végétale, Université Cheikh Anta DIOP (UCAD) BP 5000, Dakar/Sénégal
- 2: Laboratoire Commun de Microbiologie, (LCM) / LMI LAPSE, Route des hydrocarbures Bp1386Dakar, CP 18524 Sénégal
- 3: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), LNRPV, Route des hydrocarbures Bp1386Dakar, CP 18524 Sénégal
- 4: Université de Lyon, Ecole Centrale de Lyon, Laboratoire Ampère (CNRS UMR5005), Environmental Microbial Genomics, Ecully, France
- 5: IRD-UMR LSTM, Campus de Baillarguet, Montpellier, France



Laboratoire Commun de Microbiologie IRD-UCAD-ISRA

INTRODUCTION

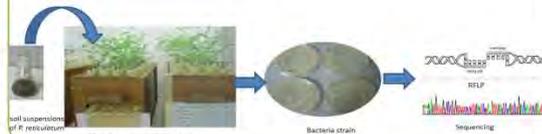
Piliostigma reticulatum is a native legume found in fallow areas in dry and semi dry savanna soil. This shrub is used in farming and as part of intercropping systems in particular. The rhizosphere of *P. reticulatum* is described in terms of islands of fertility (Wezel *et al.*, 2000), due to a shift in soil microbial community diversity and enzymatic functions beneath the rhizosphere of the shrub compared to bulk soil (Diedhiou *et al.*, 2009). Therefore, understanding of how microbial communities including symbiotic and non-symbiotic bacteria, which are present in the rhizosphere of *P. reticulatum* can influence or contribute to the growth of this shrub remains unclear.



> The aim of this study was to propose ways to improve the growth of *P. reticulatum*

MATERIAL AND METHODS

Soil extracts collected from *P. reticulatum* roots was sampled in two contrasting areas and its endophytic bacterial communities were isolated using three trap host species (*Faidherbia albida*, *Acacia bivenosa* and *Acacia seyal*). Firstly, strains obtained after trapping were characterized by RFLP, *ni/H* PCR and by the sequencing of the 16 rRNA genes. Secondly, the behavior of the *P. reticulatum* was monitored in *in vitro* conditions by measuring the growth, biomass and chlorophyll content of leaves, after inoculation by 7 nitrogen-fixing bacteria

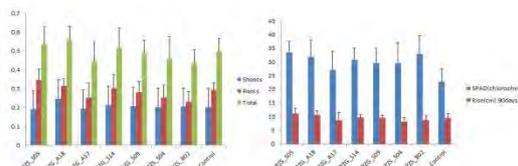


RESULTS

Distribution of 16S RFLP profiles of endophytic bacteria

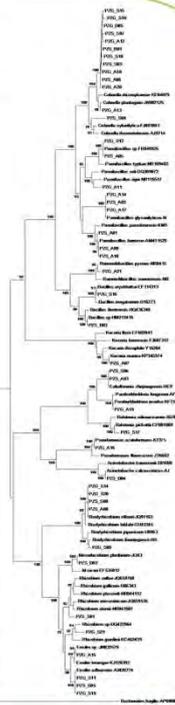
Groups	Distribution of profiles (number)						Distrbution of groups (%)	Type of RFLP profiles	
	ZSS			ZSG				HaeIII	MspI
	Falb	Abiv	Asey	Falb	Abiv	Asey			
I	2	1	5	3	1	6	34		
II	7			3		1	18		
III			1	1		2	7		
IV	1		2			7	17		
V		1				1	3		
VI	1		1			1	5		
VII			1			1	3		
VIII							2		
IX							2		
X							2		
XI							2		
XII	1						2		
XIII			1				2		
XIV						1	2		

> RFLP profiles revealed 14 different phenotypes named I to XIV based on the number of bands and their size



Response of *P. reticulatum* plantlets inoculated with some endophytic isolates

> two endophytic bacteria PZS_S05 (*Ensifer*) and PZG_A18 (*Cohnella*) improved the growth of plants



> Taxonomic diversity of endophytic bacteria revealed 25 different species of endophytic bacteria belonging to 9 families: Paenibacillaceae, Bacillaceae, Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Burkholderiaceae and Micrococcaceae.

CONCLUSION

Our results show that these two diazotroph bacteria may have the potential to improve the growth of *P. reticulatum* in natural conditions

ACKNOWLEDGEMENTS



Annexe 3.4.



Study of bacterial diversity in rhizosphere soil of two Caesalpinioideae (*Piliostigma reticulatum* and *Erythrophleum guineense*) associated with dry cereal crops in West Africa



N. Niang^{1,2}, S. Demanèche⁴, I. Ndoye¹, E. Navarro⁴, S. Fall^{2,3}

- 1: Département de biologie végétale, Université Cheikh Anta Diop (UCAD) Bp 5000, Dakar, Sénégal
- 2: Laboratoire Commun de Microbiologie, IRD-UMI L'APSE, Route des hydrocarbures BP1386, Dakar, Sénégal
- 3: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), LNRPV, Route des hydrocarbures BP1386, Dakar, Sénégal
- 4: Laboratoire Ampère, UMR CNRS 5005, Ecole Centrale de Lyon, 36 avenue Guy de Collongue, 69134 Ecully Cedex, France.

Introduction and objective



P. reticulatum

The Sahel is an environment affected by desertification and land degradation due to high population growth, poor farming practices and abandonment increasingly fallow. However the association cereal-legume is proposed as an alternative to improve both the organic status of soil and crop productivity. In Senegal, *P. reticulatum* and *E. guineense* belonging to subfamily Caesalpinioideae are deliberately left in the fields by farmers because their roles in the soil nutrient cycles. *P. reticulatum* is involved in the soil fertility and on the beneficial effect when paired crop cereals like millet and *E. guineense* improves the soil fertility by the symbiotic nitrogen fixation.



E. guineense

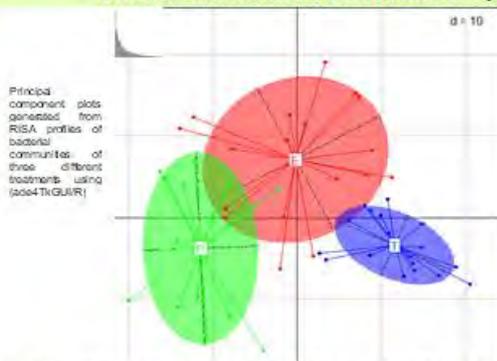
➤ Our objective was to study the impact of *P. reticulatum* compared with that *E. guineense* on soil bacterial communities.

Material and Methods

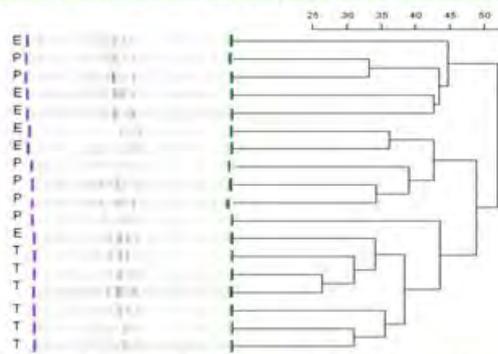
- Soils were collected within the Sare Yorobana site at 0-25 cm horizon from *P. reticulatum* (P), *E. guineense* (E) and bare soil (T)
- Bacterial structures were studied by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) between ribosomal subunits 16S and 23S rDNA
- Bacterial biodiversity and species richness between treatments were studied by sequencing Miseq illumina of the 16S gene

Results

Bacterial structures of *P. reticulatum* compared to that *E. guineense* and bare soil by RISA approaches



➤ Multivariate analysis showed that *P. reticulatum* improved bacterial communities of soil compared to *E. guineense* or bare soil



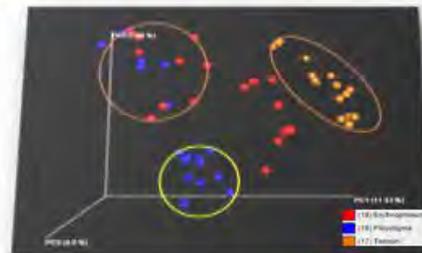
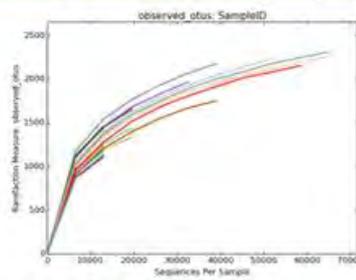
RISA fingerprints of soil bacterial communities from the different treatments accompanied by the corresponding dendrogram (bootstrapped) constructed from presence-absence matrices

➤ This dendrogram showed that the structure of bacterial communities of *P. reticulatum* seems to be very heterogeneous like that of *E. guineense*

alpha and Beta Diversity bacterial communities by sequencing Miseq illumina



Alpha diversity (left: indices and richness estimator, right: rarefaction plot)



Beta diversity of *P. reticulatum*, *E. guineense* and Bare soil

➤ Diversity indices (Shannon), species richness estimators (chao1) and the rarefaction plot showed high diversity and richness in the *P. reticulatum* treatment better than the symbiotic *E. guineense*

➤ Beta diversity *P. reticulatum* has a specific communities that could be the cause of its beneficial effect on associated crops

Conclusion

Our results showed that the rhizosphere bacterial community of *P. reticulatum* is very heterogeneous, rich and diverse compared with that *E. guineense* or bare soil

Acknowledgments

We thank the Ampère laboratory/Lyon; the Cooperation department and Cultural Action (SCAC); PAPES and WAAPP

Résumé :

Le Sahel est un environnement très touché par la dégradation des terres causée entre autre par la désertification, les mauvaises pratiques agricoles et l'abandon des jachères de longue durée etc. Pour faire face à ces contraintes et créer les conditions d'une sécurité alimentaire, des approches et stratégies ont été proposées telles que des associations arbres bénéfiques et cultures. L'association *Piliostigma reticulatum* et cultures céréalières (mil et sorgho) ou légumineuses (arachide) est proposée et pratiquée dans la partie centrale et sud du Sénégal. En plus de ces effets agronomiques, l'arbuste contribuerait aussi à l'amélioration du bilan hydrique et à la fertilité du sol, pour laquelle les micro-organismes associés joueraient un rôle clé. Notre étude vise ainsi à mieux comprendre les interactions entre *P. reticulatum* et les communautés bactériennes du sol et en particulier celles impliquées dans le cycle de l'azote. Elle a porté sur l'étude (i) de la diversité génétique des *Rhizobia* et des endophytes des sols sous influence de *P. reticulatum* et leur impact sur la croissance de l'arbuste in vitro, (ii) de l'impact de *P. reticulatum* sur la structure des communautés bactériennes du sol et enfin (iii) de la diversité métagénomique et l'influence des méthodes d'extraction sur les communautés bactériennes associées à *P. reticulatum*.

Pour ce faire, les sols sous influence de l'arbuste *P. reticulatum* ont été échantillonnés dans deux zones contrastées (Ouest et Sud du Sénégal) et comparés à deux types de sols témoins : un sol hors rhizosphérique et un sol sous influence de *Erythrophleum guineense*, une autre légumineuse de la sous famille des Caesalpinioideae. De même, des approches par culture bactérienne et de séquençage du gène marqueur 16S ARNr ou métagénomique ont été utilisées pour tenter d'accéder à une plus grande diversité bactérienne de ces sols.

L'étude a montré que la diversité des *Rhizobia* et endophytes des sols sous influence de *P. reticulatum* est variable en fonction de la zone d'étude. Le sol provenant de la zone Sud (Saré yorobana) est plus riche en bactéries infectives que le sol de la zone Ouest (Ndiassane). Cette tendance était corrélée aux paramètres abiotiques tels que l'humidité du sol, le phosphore assimilable, le nitrate et l'ammonium. La caractérisation de *Rhizobia* et endophytes des sols sous *P. reticulatum* a aussi montré que l'arbuste exerce une influence sur les communautés bactériennes en favorisant les genres non symbiotiques (*Cohnella* et *Paenibacillus*). L'analyse DGGE a confirmé que *P. reticulatum* modifiait la structure des communautés bactériennes du sol en exerçant une influence positive sur la composition de la population bactérienne. L'étude métagénomique a permis d'identifier plus de 30 ordres affiliés à 20 phyla avec toutefois une abondance relative très déséquilibrée. Onze (11) ordres (*Acidiales*, *Solibacterales*, *Actinomycetales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatissporales*, *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* et *Chthoniobacterales*) ont une abondance relative très grande dans tous les sols étudiés (sous *P. reticulatum*, sous *E. guineense* et sol nu). L'analyse comparative a révélé aussi que tous les phyla répertoriés étaient dominants dans les sols prélevés sous *P. reticulatum* excepté le phylum des Firmicutes qui a une abondance relative beaucoup plus importante dans les sols témoins. D'un point de vue méthodologique, l'analyse des données ARISA et métagénomique a révélé aussi que la méthode d'extraction influence fortement les structures des communautés bactériennes du sol. Parmi les 3 kits utilisés, le kit Fast DNA a présenté le meilleur profil ARISA avec une concentration en ADN importante en qualité et en quantité avant et après purification. Enfin d'un point de vue appliqué, l'inoculation de plants de *P. reticulatum* in vitro a révélé que deux (2) souches appartenant au genre *Ensifer* et *Cohnella*, parmi celles testées induisaient une amélioration significative de la croissance des plants et la teneur en chlorophylle des feuilles.

Dans sa globalité, les résultats de l'étude ont contribué à une meilleure compréhension du rôle et de la diversité bactérienne des sols sous influence de *P. reticulatum* à travers les bactéries isolées et testées. Nos résultats dégagent des perspectives d'améliorer la croissance de l'arbuste par la technique d'inoculation bactérienne

Mots clés : Diversité, Rhizobia, Endophytes, *P. reticulatum*, NGS, RISAs, DGGE, Isolement, ARNr 16S, Sol.

Structural and functional characterization of bacterial communities associated with *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst in two contrasting zones of Senegal

Abstract:

The Sahel is an environment very affected by land degradation caused by desertification, poor agricultural practices and the abandonment of long-term fallows. To address these constraints and create the conditions for food security, approaches and strategies have been proposed such as beneficial tree associations and crops. Among the proposals, the association *Piliostigma reticulatum* and cereal crops (millet, sorghum) or (peanut) was proposed by research and practiced in the central and southern part of Senegal. In addition to its agronomic effects, the shrub would also contribute to improved water balance and soil fertility, for which associated micro-organisms would play a key role. Our study aims to better understand the interactions between *P. reticulatum* and soil bacteria and in particular those involved in the nitrogen cycle. It focused on the study of (i) the genetic diversity of *Rhizobia* and PGPR of soils under *P. reticulatum* and their impact on shrub growth, (ii) the impact of *P. reticulatum* on soil bacteria structure and (iii) metagenomic diversity and influence of DNA extraction methods on bacteria associated with *P. reticulatum*.

In fact, the soil under the influence of *P. reticulatum* was sampled at two climatically and environmentally contrasted sites (western and southern Senegal) and compared to: a bare soil and a soil under the influence of *Erythrophleum guineense* (Caesalpinioideae). Similarly, bacteria culture and 16S rRNA sequencing or metagenomic have been used to access to the greater microbial diversity of these soils. The result showed that the diversity of *Rhizobia* and endophytes in soil under the influence of *P. reticulatum* was varied according to the study site. The soil from the South zone (Saré yorobana) was richer in infective bacteria than the soil from western zone (Ndiassane). This trend was correlated with abiotic parameters such as soil moisture, assimilable phosphorus, nitrate and ammonium. Also the characterization of *Rhizobia* and endophytes were showed that the shrub influenced these bacteria by promoting non-symbiotic genera (*Cohnella* and *Paenibacillus*). The analysis by DGGE confirmed that *P. reticulatum* exerts an impact on the bacterial communities of the soil. The metagenomic study was identified 30 orders belong to 20 phyla with however a relative abundance very unbalanced. Eleven (11) orders (*Acidiales*, *Solibacterales*, *Actinomycetales*, *Gaiellales*, *Solirubrobacterales*, *Ktedonobacterales*, *Thermogemmatissporales*, *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* and *Chthoniobacterales*) had a very high relative abundance in all soils studied (under *P. reticulatum*, under *E. guineense* and bare soil). The comparative analysis also revealed that all phyla recorded were dominant under *P. reticulatum* soils except for Firmicutes phylum which has a much higher relative abundance in bare soil. From a methodological point of view, analysis of RISAs and metagenomic data revealed that the extraction method was influenced the structure of soil bacterial communities. Among the 3 kits, the Fast DNA kit was presented the best RISAs profile with a high concentration of DNA in quality and quantity before and after purification. Finally, the inoculation of *P. reticulatum* plants in vitro revealed that two (2) strains belonging to the genus *Ensifer* and *Cohnella*, among those tested, induced a significant improvement in the growth of the plants and the content in chlorophyll of the leaves. Overall, the results of the study contributed to a better understanding of the bacterial role and diversity of soils under the influence of *P. reticulatum* and through isolated and tested bacteria. Our results point out prospects for improving shrub growth through the bacterial inoculation technique.

Keywords : Diversity, Rhizobia, PGPR, *P. reticulatum*, NGS, RISAs, DGGE, Trapping, ARNr 16S, Structure et communities bacterial, Soil.