

ACTIVITE ET DIVERSITE DES COMMUNAUTES
MICROBIENNES D'UN SOL TROPICAL EFFET
DES JACHERES DE COURTE DUREE SUR LES
HABITATS MICROBIENS

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Sols Anthropisés Tropicaux (LEMSAT) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à son élaboration

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Komi Assigbetse pour m'avoir guidée à travers la complexité des sols et de la biologie moléculaire et surtout pour sa patience. Vos enseignements, votre compétence, votre rigueur scientifique, votre disponibilité et votre gentillesse m'ont permis de faire avec passion mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je vous remercie également pour vos conseils éclairés et pour avoir aiguisé mon sens de l'initiative.

J'adresse mes sincères remerciements :

A Mr Kandiora NOBA, chef du département de biologie végétale pour l'honneur qu'il m'a fait de présider cette commission d'examen. A travers sa personne je remercie tous les enseignants de la faculté des sciences et techniques en particulier ceux du département de biologie végétale pour avoir contribué de près ou de loin à ma formation.

A Mr Ibrahima Ndoye pour ses conseils et l'attention qu'il a porté à ce travail. Je ne saurais vous remercier assez pour votre disponibilité, votre ouverture d'esprit et votre sympathie envers les étudiants.

A Mr Samba Ndao Sylla pour avoir accepté de juger ce travail. Nous sommes persuadés que vos remarques et suggestions contribueront à améliorer ce travail.

Je tiens à remercier Mr Jean Luc Chotte de m'avoir accueilli au sein de son équipe alors que je n'avais aucune expérience et m'a beaucoup encouragée. Je le salue également pour ses précieux conseils, remarques et corrections qui ont contribué à l'élaboration de ce rapport.

Je veux exprimer ma reconnaissance à Mr Saïdou Nourou Sall et Mme Ndeye Yacine Ndour pour leurs conseils et le regard bienveillant qu'ils auront porté sur mon travail.

Merci Mariama Dalanda Diallo pour ton amitié, tes conseils et ton soutien mais surtout pour m'avoir dépanné lorsque mes limites techniques laissaient penser que j'allais me débarrasser de mon ordinateur.

Je tiens à remercier chaleureusement les techniciens du laboratoire de biologie moléculaire. Je veux citer Amadou Lamine Dieng et Mariama Gueye qui ont participé à mon initiation à la biologie moléculaire. Merci pour votre aide technique et vos conseils pratiques.

Mes remerciements vont à l'ensemble du personnel des laboratoires de Biopedologie et de Microbiologie de sols pour leur précieuse collaboration et sans qui cette expérience n'aurait jamais été pareille. Les chercheurs : Dr A. Braumann, Dr E. Baudoin... Les techniciens : A. Traore, Mme F. Gueye, M.B. Sow, T. Badji, M. Diouf, M. Sane, O. Faye, S. Faye, H. Tendeng, L. Sagna, J. Bakhoum, L. Biagui, O. Gueye...

Aux camarades du DEA : Mountakha Seck, Amar Saloum Fall, Awa bousso, Katy Diop, Ampa K. Badiate, Thierno Sow et aux aînés thésards : Mame farma Ndiaye, Siré Diedhiou, Pacome P., D. Djigal, J. Logbo, Anicet, Mansour, fatima, je dis un grand merci pour leur amitié, leur complicité, leur sympathie et leurs conseils précieux.

Une pensée particulière va à feu tata Paule Diatta et feu Ndeye Katy Manet. Merci pour tout. Que la terre vous soit légère.

Loin d'avoir cité tout le monde je souhaite que tous ceux qui ont ensoleillé mes années universitaires trouvent ici ma reconnaissance pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur confiance et leur sourire.

Je dédie ce travail

A feu mon Cher Père

A ma mère

A toute ma famille

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNr :	Acide Désoxyribonucléique ribosomique
Amp :	ampicilline
BET :	Bromure d'éthidium
BSA :	Bovine Serum Albumin
dNTP :	désoxynucléosides triphosphate
EDTA :	Ethylène Diamine-Tetraacetic Acid
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
JN4D :	Jachère naturelle de 4 ans à la défriche
Ag4D :	Jachère à <i>Andropogon gayanus</i> de 4 ans à la défriche
Ah4D :	Jachère à <i>Acacia holosericea</i> de 4 ans à la défriche
JN4R :	1 ^{ère} récolte sur ex-jachère naturelle de 4 ans
Ag4R :	1 ^{ère} récolte sur ex-jachère à <i>Andropogon gayanus</i> de 4 ans
Ah4R :	1 ^{ère} récolte sur ex-Jachère à <i>Acacia holosericea</i> de 4 ans
C6/JN4 :	sol cultivé depuis 6 ans à antécédent jachère naturelle
C6/Ag4 :	sol cultivé depuis 6 ans à antécédent jachère à <i>Andropogon gayanus</i>
C6/Ah4 :	sol cultivé depuis 6 ans à antécédent jachère à <i>Acacia holosericea</i>
Cc :	sol de culture continue
RV :	Résidus Végétaux
g :	gramme
LB :	Luria Bertani
mg :	milligramme
mM :	millimolaire
min :	minute
nar :	gène des nitrates réductases membranaires
pb:	paires de bases
qsp:	quantité suffisante pour
PCR:	Polymerase Chain Reactiobn
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm :	rotations par minute
RV :	Résidus végétaux
s :	seconde
TBE :	Tris borate EDTA
U :	Unité enzymatique
UV :	Ultra-Violet
X-Gal :	5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-thiogalactoside
10X :	concentré 10 fois
μm :	micromètre
μl :	microlitre
μg :	microgramme
UV :	Ultra Violet
% :	pourcentage
°C :	degré Celsius
& :	et

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Cycle de l'azote (Cellier et *al.* 1997).

Figure 2 : Situation du village de Sonkorong dans la région de Kaolack.

Figure 3 : Dispositif expérimental.

Figure 4 : Procédure d'étude.

Figure 5 : Schéma du protocole de fractionnement granulométrique.

Figure 6 : Principe de la PCR.

Figure 7 : Les différentes étapes du clonage moléculaire.

Figure 8 : Quantité de CO₂ libéré en µg CO₂-C/g sol au bout de 7 jours d'incubation par les différentes situations.

Figure 9 : Distribution pondérale des fractions granulométriques des différentes situations. P. 28

Figure 10 : Variations des quantités de carbone total des fractions >2000 µm et 2-50 µm des différentes situations.

Figure 11 : Variations des quantités d'azote total des fractions >2000 µm et 2-50 µm des différentes situations.

Figure 12 : Activité (ng N-N₂O/g sol sec) potentielle de dénitrification au sein des fractions >2000 µm et 2-50 µm des différentes situations.

Figure 13 : Profils DGGE de l'amplifiat d'une partie du gène 16S rDNA de la communauté bactérienne totale de 2 types d'agrégats d'un sol soumis à différentes pratiques culturales.

Figure 14 : Amplification PCR du gène narG des communautés dénitrifiantes présentes dans les deux types d'agrégats (>2000 µm et 2-50 µm) des différents agrosystèmes étudiés.

Figure 15 : Gel agarose montrant différents profils RFLP (types RFLP, phylotypes) obtenus par digestion Alu I du gène narG chez les bactéries dénitrifiantes.

Figure 16 : Histogrammes de la distribution des profils narG sur sols de jachère.

Figure 17 : Histogrammes de la distribution des profils narG sur sols de jachère 1^{ère} récolte.

Figure 18 : Histogrammes de la distribution des profils narG sur sols cultivés depuis 6 ans.

Figure 19 : Courbes de raréfaction.

Planches

Planche 1 : Système de jachère manipulée sur le site de Sonkorong.

Planche 2 : Système de culture sur le site de Sonkorong.

Planche 3 : Photo d'*Acacia holosericea*.

Planche 4 : Photo d'*Andropogon gayanus*

Tableaux

Tableau I : Liste des échantillons avec les situations étudiées.

Tableau II : Quantités de carbone et d'azote en mg/g de sol obtenues sur les différentes situations.

Tableau III : Valeurs C/N obtenues sur les différentes situations.

Tableau IV : Nombre de familles RFLP ou phylotypes obtenus dans les différents agrosystèmes.

Tableau V : Indices de diversité.

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Le sol, un système écologique.....	6
1.1 Les constituants du sol	6
1.1.1 - Les constituants minéraux.....	6
1.1.2 - Les constituants organiques	6
1.1.2.1 - La fraction organique inerte.....	7
1.1.2.2 La fraction organique vivante	7
a - Les microorganismes du sol.....	7
b - La faune du sol.....	8
1.2 - L'organisation du sol	8
1.2.1 - La structure ou mode d'assemblage des éléments	9
1.2.2 - Les agrégats : habitats microbiens	9
1.3 - Le fonctionnement du sol.....	10
1.3.1. - Le cycle de l'azote	10
1.3.1.1.- La nitrification	11
1.3.1.2. - La dénitrification.....	12
a - Les bactéries dénitrifiantes.....	12
b - Enjeux du processus.....	13
2 - La jachère.....	13
2.1 - Rôle dans les systèmes de culture	13
2.2 - Rôle dans la restauration de la matière organique.....	14
2.3 - Rôle dans la structuration.....	14
2.4 - Gestion actuelle de la jachère	14
MATERIEL ET METHODES	16
I - MATERIEL	17
1.1 - Présentation de la zone d'étude	17
1.2 - Dispositif expérimental et échantillonnage.....	18
II - METHODES	21
2.1 - Minéralisation du carbone.....	22
2.2 - Fractionnement physique du sol en classes d'habitats.....	22
2.3 - Dosage du carbone total et azote total	22
2.4 - Dosage de l'activité potentielle de dénitrification	23
2.5 - Analyse moléculaire des communautés microbiennes	23
2.5.1. - Extraction de l'ADN du sol	23
2.5.2. - Etude de la structure des communautés bactériennes totales.....	24
2.5.3. - Etude de la diversité des communautés fonctionnelles dénitrifiantes	25
5.3.1. - Amplification du gène narG.....	25
5.3.2. - Purification du fragment narG	26
5.3.3. - Construction de banques de clones du gène narG	26
a - La ligation	26
b - La Transformation	27
c - Sélection des différents types de familles narG (Criblage des banques)	27
2.6. - Analyses statistiques	28
RESULTATS	30

1. - Minéralisation du carbone.....	31
2. - Distribution pondérale des fractions granulométriques	32
3. - Dosage carbone total et azote total	33
4. - Activité potentielle des bactéries dénitrifiantes	34
5. - Etude de la structure des communautés	35
bactériennes totales	35
6. - Diversité des communautés fonctionnelles narg associées à l'habitat 2-50 µm.....	37
6.1. - L'amplification du gène fonctionnel narG.....	37
6.2. - Diversité des communautés dénitrifiantes narG	37
6.2.1 - Caractérisation des profils RFLP	38
6.2.2 - Distribution des phylotypes	39
6.2.3 - Analyse de raréfaction	41
6.2.3 - Indice de diversité	42
DISCUSSION	43
1. - Effets des pratiques culturales sur l'agrégation	44
2. - Effets des pratiques culturales sur la matière organique.....	44
3. - Effets des pratiques culturales sur l'activité potentielle de dénitrification	45
4. - Effets des pratiques culturales sur la diversité microbienne	46
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	48
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50
ANNEXES	61

Titre du mémoire : Activité et diversité des communautés microbiennes d'un sol tropical : effets des jachères de courte durée sur les habitats microbiens.

Nom du candidat : Ndèye Hélène DIALLO

Nature du mémoire : Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Végétale

Jury : Président : M. Kandoura NOBA
 Membres : M. Ibrahima NDOYE
 M. Samba Ndao SYLLA
 M. Komi ASSIGBETSE

Soutenu le 31 Mai 2005

Résumé :

Pour étudier l'influence de différents modes de gestion des terres sur la diversité et l'activité des bactéries du sol, des échantillonnages de sol sont réalisés sur 4 parcelles d'un essai au champ située à Thyssé Kaymor (Sénégal) : jachère naturelle, jachère améliorée à *Andropogon gayanus*, jachère améliorée à *Acacia holosericea*, sol sous culture continue (rotation mil - arachide).

Les prélèvements sont effectués selon la chronoséquence suivante : à la défriche des jachères âgées de 4 ans, à la récolte de la première culture (3 mois après la défriche) et enfin après la 6^{ième} culture (6 ans après la défriche).

Un fractionnement physique du sol est réalisé pour isoler les habitats microbiens en fonction de leur granulométrie. Des mesures chimiques (carbone et azote organiques, dénitrification potentielle) et des analyses moléculaires (PCR-DGGE du gène 16S ADNr, clonage-RFLP du gène narG) sont effectuées sur les habitats >2000 µm (macro-agrégat) et 2-50 µm (micro-agrégat).

Les résultats obtenus montrent que la communauté microbienne hébergée dans l'habitat 2-50 µm est caractérisée par une activité potentielle et une diversité génétique plus élevées que la communauté présente dans les agrégats >2000 µm.

La comparaison des différentes jachères indique que la présence d'*Andropogon gayanus* stimule l'activité et la diversité des communautés microbiennes par rapport à la jachère à *Acacia holosericea*.

L'analyse des profils RFLP narG de la communauté microbienne dénitrifiante présente dans l'habitat 2-50 µm indique que la diversité de ces communautés est liée au type de végétation et à l'antécédent cultural.

Mots clés : jachère, habitats microbiens, diversité, communautés dénitrifiantes, PCR-DGGE, clonage, PCR-RFLP

INTRODUCTION

Dans les pays soudano-sahéliens d'Afrique de l'ouest, l'agriculture est essentiellement paysanne et les rendements dépendent de la productivité intrinsèque des écosystèmes. Les systèmes traditionnels de gestion des terres agricoles impliquaient une phase de culture de quelques années suivie d'une phase de jachère ou abandon cultural de l'ordre de 20 à 30 ans. La mise en jachère vise un accroissement de la quantité de matière organique et une restauration de la fertilité des sols. Au cours de ces dernières décennies, la pression démographique a entraîné une forte augmentation des surfaces cultivées et un raccourcissement significatif des temps de jachère (Floret et *al.*, 1993). De nombreux itinéraires culturaux impliquent dorénavant une jachère de un an ou deux (Manlay et *al.*, 1997). Cette pratique, donc, évolue, se raréfie, change de nature (Serpantié et Floret, 1994). On assiste à une manipulation de la jachère caractérisée par une introduction de plantes améliorantes (graminées ou légumineuses). Ceci dans le but d'arriver en peu de temps à reconstituer l'effet positif d'une jachère naturelle de 10 ans (Hoefsloot et *al.*, 1993). Ainsi le rôle des jachères de courte durée sur la reconstitution ou le maintien de la fertilité du sol a souvent retenu l'attention (Gillier, 1960 ; Charreau et Nicou, 1971 ; Feller et *al.*, 1993 ; Hien et *al.*, 1993 ; Roose, 1993 ; Some, 1994). Mais l'impact du cycle jachère-culture sur les microorganismes et en particulier les bactéries a fait l'objet de peu d'études.

Les stress environnementaux ou encore l'intervention de l'homme induisent différents changements d'état, ou de modifications de fonctionnement du milieu sol (Grouzis et Alberger, 1989). Ces perturbations sont décelables depuis le paysage jusqu'aux habitats microbiens. Celles-ci altèrent les populations microbiennes du sol (Atlas et *al.*, 1991) et peuvent entraîner une diminution de leur diversité ou le développement de nouvelles espèces mieux adaptées.

Les micro-organismes du sol (champignons et bactéries) représentent la communauté la plus importante tant en terme de fonctions (cycle des nutriments) qu'en terme de diversité (4000 séquences différentes dans 1 gramme de sol ; Torsvik et *al.*, 1990). Leur intervention dans les cycles biogéochimiques des éléments majeurs (C, N, S) et des oligoéléments est capital. Ils sont impliqués dans les transferts d'énergie et de nutriments au niveau du sol. Pourtant des revues récentes (Hooper et *al.*, 2000 ; Wolters et *al.*, 2000) sur les interactions biotiques dans les écosystèmes terrestres soulignent la faible représentation des bactéries du sol dans les études de biodiversité liées au fonctionnement des écosystèmes. Ceci est due en grande partie à la complexité de cette communauté et aux difficultés d'isolement des bactéries. Aussi l'écologie microbienne des sols a longtemps été abordée selon une approche

centrée sur la diversité des individus. De nombreux milieux de culture ont été développés pour le large spectre de bactéries et champignons utilisant différentes sources d'énergie et aux besoins en O₂ différents : autotrophes, hétérotrophes, anaérobies stricts ou facultatifs, aérobies. Mais ces contraintes techniques ont été en partie levées par l'essor de techniques moléculaires qui permettent d'explorer la diversité des communautés microbiennes sans passer par leur isolement (Duarte et *al.*, 1998). Ces techniques sont basées sur l'analyse de l'ADN directement extrait du sol. Il est aujourd'hui établi que la structure des communautés microbiennes est sensible aux perturbations (Atlas et *al.*, 1991), à la qualité de la matière organique (Bossio et *al.*, 1998), à l'irrigation (Bloem et *al.*, 1992), au travail du sol et à la structure des communautés végétales (Broughton et Gross., 2000), mais force est de constater que la majorité des études se restreignent à mesurer le degré de similarité entre communautés.

Une étude récente (Buckley et Schmidt, 2001) montre que la structure des communautés microbiennes du sol est remarquablement similaire dans les parcelles qui partagent un même historique de pratique culturale. Ainsi pour une communauté microbienne donnée, la résistance de cette communauté à un changement des pratiques agricoles est donc probablement très dépendante du sol lui-même et des types de pratiques agricoles.

Les organismes vivants colonisent le milieu sol à la fois selon leur taille et leur métabolisme et selon l'organisation des particules organiques et minérales et de vide associés. Selon Chotte et *al.* (1998) la localisation des microorganismes dans les différents habitats du sol dépend de leur résistance aux différentes contraintes environnementales et 40 à 70% de la population totale sont préférentiellement localisés dans la fraction 2-50 µm (Hattori, 1988 ; Ranjard et *al.*, 1997). Chotte et *al.* (1998) montrent que la dynamique des microorganismes associés aux résidus végétaux est totalement différente de celle des organismes localisés dans des micro-agrégats. Les premiers trouvent dans ces débris organiques, des composés assimilables leur permettant un développement rapide. Ils sont cependant plus exposés aux contraintes extérieures (prédation) que les microorganismes associés aux micro-agrégats qui trouvent dans ces structures une niche protectrice. Ainsi la distribution non homogène des microorganismes dans les différents agrégats du sol met en évidence une étroite relation entre la dynamique de la structure du sol et celle des microorganismes qui le colonisent.

C'est dans ce contexte que le suivi des changements de la structure et de la diversité des communautés microbiennes devrait donc permettre de comprendre l'influence des modes de gestion des terres sur le fonctionnement biologique des sols.

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'effet de différents modes de gestion des terres sur la diversité et l'activité microbiologique des sols. Le travail est effectué essentiellement à l'échelle des fractions $>2000\ \mu\text{m}$ (macro-agrégat) et $2-50\ \mu\text{m}$ (micro-agrégat), habitats naturels. Les expériences mises en place nous permettront de tester les hypothèses suivantes :

- L'organisation du sol et le type de végétation déterminent conjointement la diversité des communautés microbiennes.
- La réponse des communautés aux changements de pratiques agricoles dépend de sa localisation dans les différents habitats microbiens.

Le mémoire s'articule autour de quatre chapitres. Le premier chapitre est une analyse bibliographique. Dans le deuxième chapitre nous présentons le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième est consacré aux résultats et le quatrième réservé à la discussion.

CHAPITRE PREMIER :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE SOL, UN SYSTEME ECOLOGIQUE

Le sol est défini comme une formation naturelle vivante et dynamique qui se développe à la surface de l'écorce terrestre. C'est une combinaison, en proportions variables, d'une fraction minérale et d'une fraction organique, combinaison par ailleurs plus ou moins riche en eau et en gaz et abritant de nombreux organismes vivants.

1.1 Les constituants du sol

On distingue les constituants minéraux et organiques

1.1.1 - Les constituants minéraux

La fraction minérale du sol est composée de particules élémentaires dont la nature, l'état physique et les propriétés sont très différents. Elle représente 93 à 95 % du poids du sol total. Ces particules minérales sont en fait des fragments de roche-mère plus ou moins altérés. Il s'agit des sables (entre 2 mm et 50 μm), des limons (entre 50 μm et 2 μm) et argiles (inférieur à 2 μm). Les proportions relatives en sables, limons, argiles définissent la texture du sol.

Les sables sont composés essentiellement des minéraux primaires. Ce sont des particules inertes et leur quantité influencent surtout l'aération du sol et la perméabilité.

Les limons ont des caractéristiques voisines de celles des sables mais elles sont moins perméables.

Les argiles constituent des éléments colloïdaux. Elles jouent un rôle fondamental dans le sol par leurs propriétés d'absorption de l'eau et de fixation des ions minéraux (Oades, 1992 ; Tate, 1995 ; Lavelle et Spain, 2001). Ces ions minéraux, particules mobiles présentant une charge négative (anions) ou positive (cations) se trouvent soit en solution dans l'eau du sol, soit fixés sur les éléments colloïdaux. Ces ions, puisés dans le sol par les racines des végétaux, sont à la base de leur nutrition minérale.

Les particules minérales délimitent, entre elles, des vides. Ces vides sont occupés par de l'air ou de l'eau. La composition, les propriétés de ces deux phases, gazeuse et liquide, dépendent de la taille des pores, de la nature des processus qui se déroulent dans le sol.

1.1.2 - Les constituants organiques

L'ensemble des substances biologiques d'origine animale ou végétale présentes dans le sol constitue la phase organique. Cette dernière comprend la fraction organique inerte et la fraction organique vivante (Theng, 1987).

1.1.2.1 - La fraction organique inerte

La fraction organique inerte est composée des résidus issus des végétaux et animaux. Cette matière organique subit sous l'action de la faune du sol et de la microflore un ensemble de transformations. Elle présente deux composantes essentielles suivant son degré d'altération : la fraction organique fraîche (matières organiques figurées) et la fraction organique humifiée (Theng, 1987). Ces composées organiques qui représentent les substrats énergétiques pour les communautés microbiennes du sol, libèrent au cours de ces transformations du carbone (CO_2), de l'azote (NH_4^+ , NO_3^- ...). Cette activité des microorganismes est particulièrement élevée dans les zones riches en matériels organiques comme la rhizosphère (Griffiths et *al.*, 1992), la litière.

1.1.2.2 La fraction organique vivante

Le sol héberge une grande diversité de microorganismes (bactéries, champignons) et une faune très variée (nématodes, protozoaires, vers de terres, termites). Ces organismes jouent un rôle important dans le cycle des nutriments, le stockage du carbone et la conservation de la diversité des plantes.

a - Les microorganismes du sol

Les bactéries et les champignons régulent les processus de décomposition de la matière organique et du cycle des nutriments (Bardgett et Griffiths, 1997).

Les bactéries : Ce sont des procaryotes unicellulaires à paroi rigide et de forme très diverses. Leur classification est habituellement basée sur des caractères phénotypiques (bâtonnets, cocci, bacilles...), la structure de la paroi cellulaire (gram positif, gram négatif), la présence d'endospores, la position des flagelles (Lavelle et Spain, 2001), les groupes nutritionnels (hétérotrophes et autotrophes), les groupes fonctionnels (ammonifiantes, nitrifiantes, dénitrifiantes...). Les bactéries hétérotrophes constituent la majorité de la microflore du sol. Les bactéries sont plus nombreuses et plus actives dans les zones riches en matière organique facilement métabolisable (litière, rhizosphère). L'activité bactérienne est essentiellement concentrée dans les premiers centimètres du sol. Elle est indispensable pour le recyclage de la matière organique morte. Cette activité constitue donc une étape cruciale de toutes les réactions bio-géochimiques (Paul et Clark, 1989). De plus certaines bactéries sont responsables des émissions d'oxyde nitreux N_2O qui entre dans l'atmosphère. Or le N_2O est le troisième agent derrière le CO_2 et le méthane responsable de l'effet de serre.

Les champignons : Ce sont des eucaryotes dotés d'une structure filamenteuse végétative appelée mycélium. Ils peuvent être des colonisateurs primaires qui, avec les bactéries, envahissent les substrats nouveaux tombés sur le sol (Diem, 1973) ou des colonisateurs secondaires qui se développent sur des substrats abandonnés par les premières vagues de microorganismes. Beaucoup de ces champignons exsudent ou libèrent des produits variés : substrats hydrosolubles (Colotelo, 1973), substances antibiotiques qui vont réorienter l'équilibre microbiologique, ou pigments granulaires sombres dont le rôle est important dans l'humification (Reisinger et Kilbertus, 1973). Ils résistent mieux que les bactéries à la sécheresse et à l'acidité du sol (Duchaufour, 1991).

b - La faune du sol

De nombreuses études ont montré que la faune du sol participe activement à la décomposition de la matière organique (Agbogba et Roy-Noël, 1982 ; Lavelle et *al*, 1992). Elle assure une aération du milieu prospecté par ses déplacements en créant des microsites nouveaux pour les activités bactériennes et fongiques . Selon leur taille on distingue :

- la microfaune qui est essentiellement représentée par les arthropodes et les nématodes. Les arthropodes vivent essentiellement dans la litière dont ils se nourrissent . Ils fractionnent de façon active la matière végétale, créent des structures où se développe une forte activité microbienne. Les nématodes sont nombreux dans le sol (500 000 espèces ; (Hawkswoth, 1991)) et dans les litières. Ils peuvent être saprophages, phytophages, bactériophages (Djigal, 2003) ou fongivores.

- la macrofaune très dense et diversifiée, est dominée par les termites, les vers de terre et les fourmis. Les termites jouent un rôle important dans la transformation et l'humification des débris végétaux ainsi que dans la constitution morphologique, physique et chimique des sols (Wood, 1988). Ils interviennent aussi dans la concentration et le stockage des nutriments (azote et phosphore). Les vers de terre influencent la structure et la fertilité du sol à travers leurs activités de fouissage et d'ingestion de matière organique. Les fourmis construisent des nids avec des particules provenant des horizons profonds. Ces nids sont généralement de grande taille et modifient la texture des sols environnants.

1.2 - L'organisation du sol

Elle confère au sol un certain nombre de propriétés qui agissent sur les microorganismes et les autres composants vivants du sol mais également sur leurs interactions et les différents processus qui s'y déroulent.

1.2.1 - La structure ou mode d'assemblage des éléments

La structure du sol peut être définie comme le regroupement de particules primaires du sol en de larges unités de composés d'origine, de taille et de formes différentes. Elle est caractérisée par la manière dont sont assemblés les divers constituants minéraux et organiques (Henin, 1976). Ainsi elle se réfère assez généralement à la forme, la taille et l'arrangement spatial d'unités structurales ou agrégats existant dans le sol et séparables les uns des autres par les faces de moindre résistance. Ces agrégats ne peuvent être définis que par rapport aux forces de rupture qui permettent de les obtenir (Monnier et Tri, 1971). Ces unités structurales sont délimitées par des pores, lesquelles permettent les mouvements d'eau et les échanges gazeux avec l'atmosphère. La structure normale d'un sol apte à la culture est une structure fragmentaire: le sol est constitué de petits grains ou agrégats, eux-mêmes agglomérés en mottes. La stabilité structurale dépend de la constitution de ces agrégats.

Les différences dans la structure sont utilisées par de nombreux auteurs pour expliquer la distribution des microorganismes du sol et de leurs activités (Ladd et *al.*, 1992 ; Darbyshire et *al.*, 1993 ; Elliot et Coleman, 1988).

1.2.2 - Les agrégats : habitats microbiens

Dans le sol, la matrice minérale, l'eau, les gaz, et les substances biologiques d'origine végétale et animale s'associent par liaisons entre molécules organiques et supports minéraux. Ils forment ainsi des structures stables de différentes tailles: les agrégats.

Les agrégats, de par leur constitution physique, leur composition chimique et biologique, représentent des micro-habitats particuliers dans le sol (Kilbertus et *al.*, 1979b; Arpin et *al.*, 1980). La taille de ces micro-niches écologiques occupées par les microorganismes, fait qu'ils sont le siège de phénomènes physiologiques nettement différents de ceux s'effectuant dans les espaces inter-agrégats. Ainsi les microorganismes ont plus ou moins accès aux substrats organiques, ce qui influe par conséquent sur leur activité et sur le turnover de la matière organique (Foster, 1988). Ces microorganismes interviennent dans la formation des agrégats. Les bactéries stabilisent les micro-agrégats qui par la suite peuvent se mélanger avec les hyphes des champignons et construire ensemble des agrégats de grande taille. Ainsi on distingue les micro-agrégats de taille inférieure à 250 µm et les macro-agrégats de taille supérieure à 250 µm. Les micro-agrégats sont des sous unités des macro-agrégats au sein desquels ils sont séparés par des macropores.

Dans de nombreux travaux les agrégats et les communautés microbiennes qu'ils hébergent sont utilisés pour décrire le fonctionnement du sol (Gregorich et *al.*, 1989 ; Beare et

al, 1994 ; Chotte et *al.*, 1998, Ndour, 2003). Dans ces travaux les agrégats sont obtenus par des méthodes de fractionnement physique qui préservent leur nature et leurs propriétés (Monrozier et *al.*, 1991 ; Chotte et *al.*, 1994).

1.3 - Le fonctionnement du sol

Le sol est à la fois un support physique et un réservoir d'eau et de nutriments pour les plantes. L'utilisation agricole du sol, organisée en systèmes de culture, entraîne des modifications de ses propriétés physiques et chimiques et influence le développement des organismes présents dans le sol. Ces derniers (végétaux, animaux et microorganismes) y jouent des rôles importants. Les plantes influencent le fonctionnement du sol en synthétisant à partir du CO₂ atmosphérique et de l'énergie solaire l'essentiel des substances hydrocarbonées (Beare et *al.*, 1995). De plus elles jouent un rôle actif dans les mouvements d'eau et d'éléments minéraux. A l'instar de la faune du sol les plantes contribuent aussi à la structuration du sol. Les éléments de cette faune participent à la dissémination, au contrôle et à la redistribution des substrats et des microorganismes.

Les microorganismes jouent un rôle dans les processus écologiques de base des écosystèmes terrestres (Babich et Stotsky, 1983). Ils transforment la majorité des déchets organiques, contrôlent les cycles des bioéléments (Alexander, 1977) (en particulier ceux du carbone, de l'azote, du phosphore, du soufre).

Parmi ces microorganismes, les bactéries accomplissent un rôle important puisque d'elles dépend en partie la croissance végétale et donc la nutrition des animaux. On peut dire que ce sont les bactéries qui font fonctionner le sol (Gobat et *al.*, 1998). Elles sont impliquées, entres autres, dans des processus (cycle de l'azote par exemple) privant ou mettant à la disposition des plantes certains éléments nécessaires à leur croissance.

1.3.1. - Le cycle de l'azote

L'azote (N) est un constituant des protéines et des acides amines. Le recyclage de l'azote présent dans la matière organique joue un rôle essentiel dans la vie sur terre. Une partie de l'azote du sol prélevé annuellement du sol par les plantes lui est restitué sous forme organique par la litière ou la mort des organismes. Ainsi l'azote est transféré d'une composante à l'autre du système sol-plante. Au cours de ces transferts, l'azote subit des modifications, modifications qui constituent le cycle de l'azote. Les caractéristiques principales de ce cycle sont donc le passage phase minérale/phase organique et le transfert biosphère/atmosphère où s'inscrivent les processus de nitrification et dénitrification (figure 1)

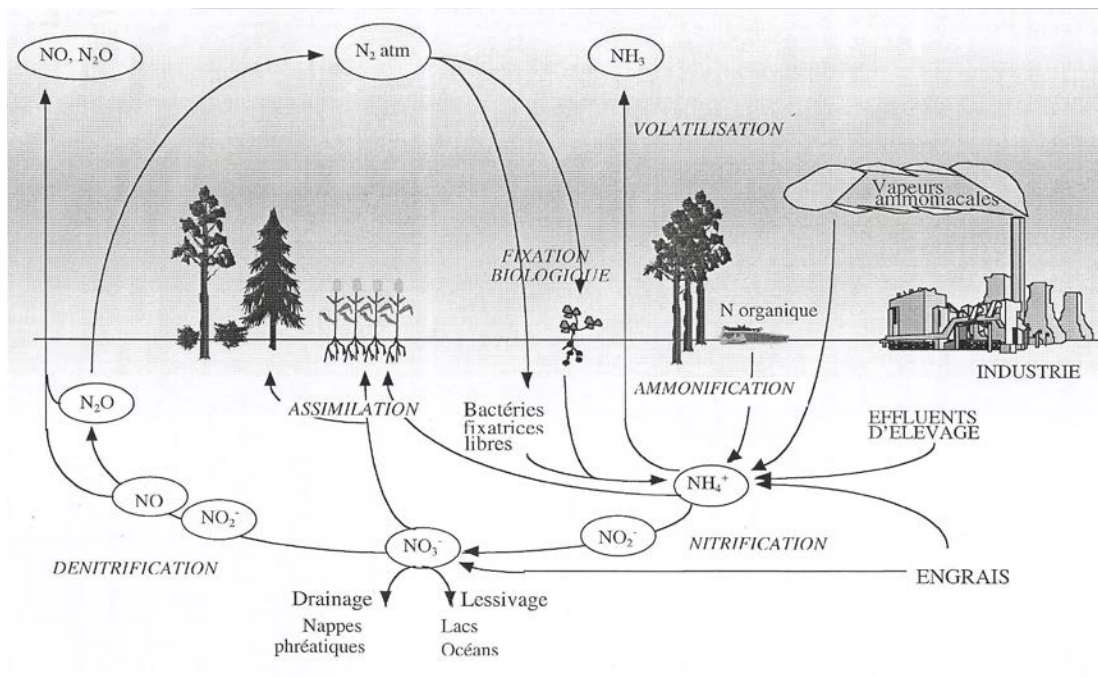


Figure 1 : Cycle de l'azote (d'après Cellier et al., 1997)

1.3.1.1.- La nitrification

La nitrification est un processus principalement respiratoire et aérobie responsable de l'oxydation de l'ammonium en nitrite (nitritation), puis du nitrite en nitrate (nitratisation) (Prosser, 1986).

Chacune des étapes est catalysée par un système enzymatique inductible :



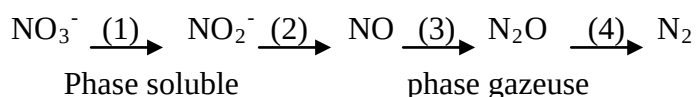
(1) HydroxylAmine Oxydo-reductase (HAO) + Ammonium Mono-Oxygenase (AMO)

(2) Nitrite Oxydo-Reductase

Ces deux étapes successives sont réalisées par deux types de bactéries différentes : bactéries nitreuses (genres *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*) et bactéries nitriques (genres *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*). Ainsi les bactéries impliquées dans le processus de nitrification sont taxonomiquement peu diversifiées et regroupées dans la famille des *nitrobacteriaceae*. Il s'agit de bactéries à Gram négatif, de petite taille et présentant une mobilité variable.

1.3.1.2. - La dénitrification

La dénitrification est un processus respiratoire microbien au cours duquel certains micro-organismes sont capables de substituer à l'oxygène des formes oxydées de l'azote comme accepteur final d'électrons lorsque le milieu devient anoxique (Ferguson, 1994 ; Zumft, 1997). Le substrat initial, nitrate ou nitrite, est réduit en différents produits gazeux selon la chaîne de réaction :



Chaque transformation est catalysée par un système enzymatique

- (1) nitrate réductase (nar) (3) oxyde nitrique réductase (nor)
(2) nitrite réductase (nir) (4) oxyde nitreux réductase (nos)

Deux étapes clés de la dénitrification sont très sensibles à l'O₂ : la réduction du NO₃⁻ en NO₂⁻ par la nitrate réductase codée par les gènes nar et la réduction du NO₂⁻ en N₂O par la nitrite réductase codée par les gènes nos (Philippot, 2002). Il est possible de réaliser des mesures d'activité potentielle en fournissant une quantité non limitante de substrat (NO₃⁻) et une source de carbone dans des conditions d'anaérobiose (Lensi et *al*, 1995).

a - Les bactéries dénitrifiantes

Les bactéries dénitrifiantes sont actuellement définies selon une liste de critères rigoureux proposée par Tiedje (1988) et par Mahne et Tiedje (1995):

- réduction du NO_3^- et du NO_2^- en N_2O et/ou en N_2 avec un taux de réduction d'au moins 80% de l'azote présent sous forme soluble en gaz,
- capacité d'utilisation de l'énergie de cette réduction pour la croissance,
- présence de l'une ou des deux nitrite réductases dissimilatives (nitrite réductase à cuivre ou nitrite réductase à cytochrome cd1)

Les bactéries dénitrifiantes ont généralement un métabolisme chimio-organotrophe et aérobie-anaérobie facultatif.

Au niveau phylogénétique, la capacité à dénitrifier est représentée par une grande diversité de bactéries appartenant à différentes subdivisions des protéobactéries (Zumft et *al.*, 1992 ; Cheneby et *al.*, 2000). Cette importante diversité pourrait être attribuée à des transferts horizontaux de gènes qui auraient eu lieu au cours de l'évolution (Bothe et *al.*, 2000 ; Phillipot, 2002) ou encore à une évolution des bactéries dénitrifiantes actuelles à partir d'un

ancêtre commun. Les genres bactériens *Ralstonia* et *Pseudomonas* sont les genres majoritaires.

Les bactéries dénitrifiantes présentent une diversité fonctionnelle. En effet, certaines parmi elles ne possèdent qu'une partie des enzymes de la chaîne de réduction du nitrate en azote (nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitreux réductase, oxyde nitrique réductase).

b - Enjeux du processus

Le processus de la dénitrification entre en compétition avec les plantes pour l'utilisation de substrat initial NO_3^- . Les pertes d'azote par dénitrification sont très importantes quantitativement, tant au niveau des écosystèmes naturels que des agrosystèmes (Tiedje, 1988 ; Watson et *al.*, 1992). Ces pertes limitent la productivité primaire. L'utilisation massive d'engrais riches en nitrate (Hauck, 1981, 1988) entraîne une augmentation de l'activité des bactéries dénitrifiantes aboutissant à un rejet accru d'oxydes d'azote dans l'atmosphère (NO et N_2O).

L'oxyde nitreux (N_2O) est un gaz à effet de serre (Otte et *al.*, 1996) reconnu pour avoir un impact important sur l'environnement (Berger, 1992 ; Mosier et *al.*, 1996). Les émissions de N_2O liées à la dénitrification dans les sols cultivés contribueraient à 70% des émissions anthropiques de la biosphère vers l'atmosphère (Bouwman, 1990).

Au niveau de la stratosphère, le N_2O réagit avec l'oxygène atomique issu de la photodissociation de l'ozone (O_3). Cette réaction aboutit à la formation d'oxyde nitrique (NO) qui va induire la destruction de l'ozone stratosphérique (Dickinson et Cicerone, 1986 ; Waibel et *al.*, 1999).

2 - LA JACHÈRE

Le système traditionnel de gestion des terres, en Afrique tropicale, consiste en une alternance de culture sur une période de 4 à 5 ans et de mise en repos de durée variable. Cette seconde phase est appelée jachère.

2.1 - Rôle dans les systèmes de culture

La jachère est observée dès qu'une baisse de la fertilité se fait sentir ou qu'un envahissement par des mauvaises herbes est remarqué. La capacité productive d'un sol, c'est à dire sa fertilité, dépend de plusieurs composantes : son état physique, son statut minéral et organique (fertilité chimique), son activité biologique et le niveau de pression des adventices. La jachère joue sur ces différentes composantes.

2.2 – Rôle dans la restauration de la matière organique

Le fonctionnement de la jachère se traduit par l'accroissement des biomasses, litières et racines. Ces apports contribuent activement à la reconstitution du stock organique des sols. Cependant dans les jachère-savanes, les litières sont de faible contribution du fait des feux, des prélèvements de bois mort, de l'activité intense des décomposeurs, enfin du pâturage. Ainsi le stockage de carbone et de minéraux passe essentiellement par la production racinaire (Piéri, 1989). Le transfert de matière organique des racines au sol se fait d'une part par exsudation racinaire de glucides photosynthétisés (Perry et *al.*, 1989) et d'autre part par décomposition des racines mortes

2.3 - Rôle dans la structuration

La grande variation de stabilité structurale dans le cycle culture-jachère est due à la fluctuation de matières fraîches non humifiées. Mais plus que les quantités de matières organiques du sol, ce sont les processus biologiques qui sont responsables de cette stabilité. En effet, il est observé que les jachères mêmes courtes développent rapidement de meilleures structure et stabilité (Talineau et *al.*, 1976 ; Valentin et *al.*, 1990 ; Ouattara et *al.*, 1997 ; Serpantié et Somé, 1998) sans variations de teneurs organiques en de grandes proportions. Les jachères participent largement à la ré-agrégation de sols. Les très gros agrégats (plus de 2 mm) s'accroissent particulièrement et les argiles dispersées tendent à disparaître (Chotte et *al.*, 1997).

2.4 - Gestion actuelle de la jachère

La forte densité de population, l'intensification des cultures, entraîne toujours une baisse du niveau de fertilité du sol (Dommergues et Ganry 1991). Les effets négatifs les plus apparents attribuables à l'intensification sont la baisse du taux de matière organique (Hien et *al.* 1993) et l'infestation des terres de culture par les mauvaises herbes. La croissance rapide de la population mène à l'expansion des cultures, au déboisement et au surpâturage. La disparition du couvert végétal rend le sol vulnérable à l'érosion (Chopart, 1984). Les longs intervalles de jachère naturelle, nécessaires à la régénération de la fertilité du sol, ne peuvent plus être pratiqués. Il est devenu nécessaire de mettre au point une gestion adaptée de la jachère comme l'introduction de plantes à croissance rapide fixatrices d'azote ou à système racinaire très développé.

On parle de jachère naturelle lorsque le sol est au repos sous végétation naturelle.

La jachère améliorée ou jachère cultivée consiste à remplacer la jachère naturelle, composée principalement d'herbacées annuelles et d'arbustes, par des plantes améliorantes semées (graminées ou légumineuses), de façon à arriver en un temps réduit à reconstituer l'effet positif d'une jachère de 10 ans (Hoefsloot, 1993). En cultures intensives, elle s'intègre méthodiquement dans l'assolement pour assurer efficacement la conservation de la fertilité du sol. Selon Hoefsloot (1993), les objectifs d'une jachère améliorée sont l'augmentation du niveau de matière organique dans le sol, l'augmentation du niveau d'éléments nutritifs dans le sol, la diminution des problèmes d'érosion et la production de fourrage amélioré pour compléter le fourrage naturel afin d'augmenter la productivité de l'élevage

Ces jachères sont censées remplacer les jachères pâturées traditionnelles qui mettent longtemps à restaurer la fertilité du sol et dont l'efficacité reste faible (Pieri 1989, Roose 1993). En comparaison, elles sont de courte durée, étouffent efficacement les adventices (Roose 1993), produisent bien plus de biomasse au cours de la première année (Raquet, 1991), limitent l'érosion, permettent de maintenir la biodiversité et améliorent la productivité du sol (Becker *et al.* 1996).

Certains auteurs trouvent des résultats mitigés par rapport aux jachères de courte durée. Selon Hien *et al.* (1993), les jachères améliorées à partir des légumineuses (*Stylosanthes*, *dolique*, etc.) ou de graminées à forte densité racinaire (*Andropogon*, *Pennisetum*, etc.) peuvent contribuer au maintien de la productivité face aux exigences de l'intensification des cultures lorsque le sol n'est pas en voie de dégradation poussée. Pieri (1989) montre que des jachères, même courtes, réduisent le taux de pertes annuelles de matière organique. Néanmoins ces jachères de courte durée doivent être introduites dans le système de culture avant les baisses importantes de la production végétale.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

1.1 - Présentation de la zone d'étude

Le site de notre dispositif d'étude est situé dans le village de Sonkorong (Fig. 2) au sud du bassin arachidier sénégalais dans la région de Kaolack à 30 km à l'est de Nioro du Rip. Ce terroir appartient à la communauté rurale de Thyssé kaymor et c'est une des zones rurales les plus peuplées avec une densité de 70 habitants /km².

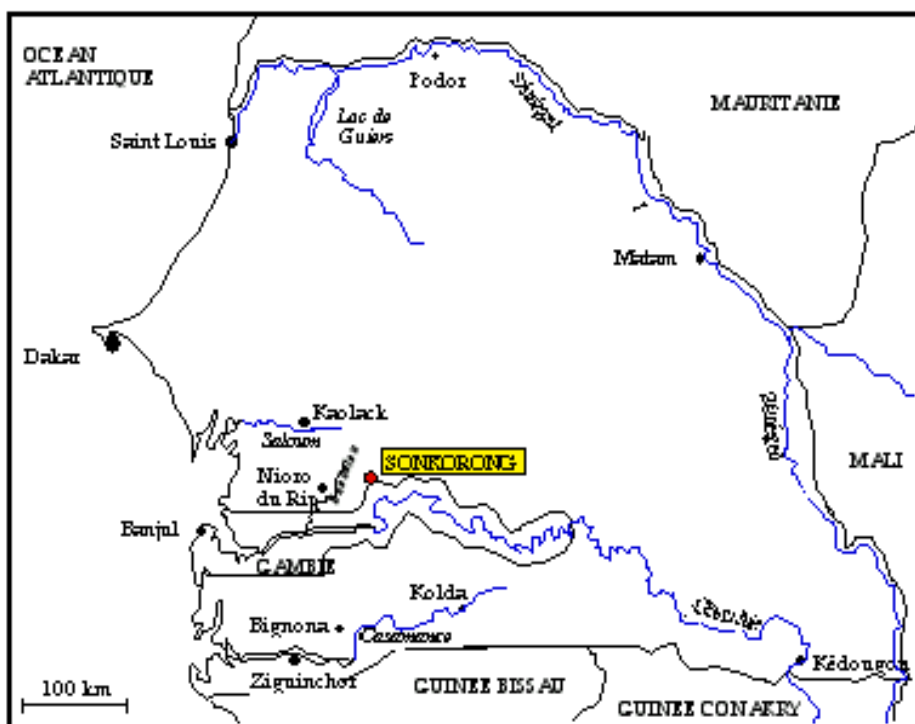


Figure 2: Situation du village de Sonkorong dans la région de Kaolack (carte du Sénégal)

Le climat est de type sahélo-soudanien avec une courte période de saison pluvieuse (juin à octobre) et une longue période de saison sèche. Les précipitations annuelles varient entre 600 à 700 mm et la température moyenne mensuelle est comprise entre 25 et 32°C (Manlay et Masse, 1994). Le régime de température est bimodal avec des maxima en Avril et Octobre.

Les sols sont des sols ferrugineux tropicaux lessivés à texture sablo-limoneuse pauvres en argile (6 - 8%) en surface. Ces sols ont une teneur en carbone organique faible et ils sont peu profonds avec une cuirasse à 1 m environ (Diatta, 1994). On distingue 3 grandes unités géomorphopédologiques dans ce site (Bertrand, 1972): un plateau d'altitude moyenne (40 m), un glacis de raccordement terrasse-plateau et un fond alluvial. La strate arborée est dominée par *Bombax costatum*, *Lannea acida*, *Cordyla pinnata*.

Les parcelles cultivées sont surtout consacrées au mil et à l'arachide en rotation biennale (Masse et *al.*, 1998). Ces cultures sont localisées sur les glacis et considérées comme des terres agricoles par excellence, malgré la carence en phosphore et potassium et une capacité de rétention en eau moyenne (Pate, 1999). A ces cultures, est associé un élevage sédentaire orienté vers l'élevage bovin (Masse et *al.*, 1998).

1.2 - Dispositif expérimental et échantillonnage

Les études ont été réalisées sur des parcelles expérimentales (Fig. 3) mises en place par le programme jachère. La parcelle utilisée a été cultivée pendant 4 ans (en alternance mil et arachide avec des apports de fertilisants) et on y note la présence de nombreuses souches ligneuses. Elle a ensuite été mise en jachère après la campagne agricole de 1993 et protégée par une clôture pour empêcher les prélèvements de bois et de pâturage.

La parcelle est divisée en quatre parties (Fig. 3):

- une partie laissée en recru naturel ou jachère naturelle (JN),
- une deuxième partie plantée par une herbacée pérenne *Andropogon gayanus* (JAg),
- une troisième par une légumineuse *Acacia holosericea* (JAh) et sur
- la dernière partie, les cultures en rotation mil et arachide sont maintenues (Cc).

En 1998, les situations en jachère ont été défrichées et remises en culture. Ainsi toute la parcelle a été re-soumise à des cultures en alternance mil et arachide jusqu'en 2004.

Les prélèvements de sol ont été réalisés dans l'horizon 0 - 10 cm à l'aide des cubes métalliques de 10 cm × 10 cm × 10 cm. Pour chaque situation, 4 répétitions de prélèvement de cube.

Ces prélèvements ont eu lieu aux dates et dans les situations suivantes (Fig 3 et Tabl I):

a) En 1998 au moment de la défriche, dans les situations de :

- Jachère à *Andropogon gayanus* âgée de 4 ans: **Ag4D**
- Jachère à *Acacia holosericea* âgée de 4 ans : **Ah4D**
- Le recru naturel noté jachère naturelle, âgée de 4 ans : **JN4D**

La comparaison des résultats obtenus permettra de tester

- (i) l'effet de la mise en jachère
- (ii) l'effet du type de végétation de la jachère.

b) En 1998 après 3 mois de culture de mil, des prélèvements de sols ont été faits au moment de la récolte sur les mêmes situations. Ils sont notés **Ag4R**, **Ah4R** et **JN4R**.



planche 1 : Système de jachère manipulée sur le site de Sonkorong (photo : P.Cadet, 1996)



planche 2 : Système de culture sur le site de Sonkorong (photo : P.Cadet, 1996)

c) En 2004, après des périodes de cultures pluviales de mil et arachide, les sols sont collectés et notés **C6/Ag4**, **C6/Ah4**, **C6/JN4**. Le sol maintenu en culture continue (CC) est aussi prélevé. La comparaison des résultats de ces situations permettra de mesurer :

- (i) l'impact de la remise en culture,
- (ii) l'impact du précédent jachère sur l'effet « remise en culture ».

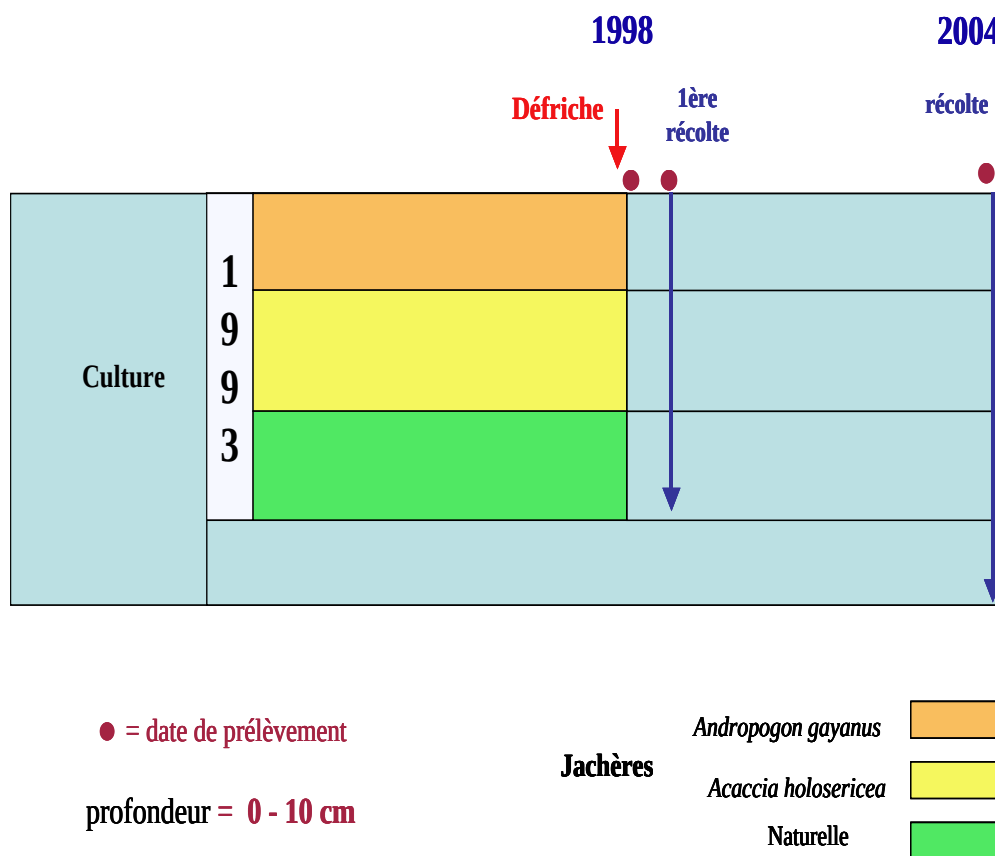


Figure 3 : Dispositif expérimental



Planche 3 : Photo d'*Acacia holosericea*



Planche 4 : Photo d'*Andropogon gayanus*

Tableau I : Liste des échantillons avec les situations étudiées

N°	Situations	Date échantillonnage	Nomenclature	Fraction
1	Jachère Naturelle Défriche	1998	JN4D	>2000
2				2-50
3	Jachère <i>Andropogon gayanus</i> Défriche	1998	Ag4D	>2000
4				2-50
5	Jachère <i>Acacia holosericea</i> Défriche	1998	Ah4D	>2000
6				2-50
7	Remise en culture sur Jachère Naturelle Récolte	1998	JN4R	>2000
8				2-50
9	Remise en culture sur Jachère <i>Andropogon gayanus</i> Récolte	1998	Ag4R	>2000
10				2-50
11	Remise en culture sur Jachère <i>Acacia holosericea</i> Récolte	1998	Ah4R	>2000
12				2-50
13	Remise en culture sur Jachère Naturelle	2004	C6/JN4	>2000
14				2-50
15	Remise en culture sur J. <i>Andropogon gayanus</i>	2004	C6/Ag4	>2000
16				2-50
17	Remise en culture sur J. <i>Acacia holosericea</i>	2004	C6/Ah4	>2000
18				2-50
19	Culture continue	2004	CC	2-50

A propos des jachères améliorées, deux espèces végétales ont été choisies :

- *Andropogon gayanus*, (planche 4), graminée vivace, reconnue pour ces propriétés améliorantes (Bulgen et Dieng, 1997) des sols cultivés. De plus, elle peut générer jusqu'à 2,7 tonnes de matière organique au sol chaque année (Bulgen et Dieng, 1997).

- *Acacia holosericea* (planche 3), légumineuse à croissance rapide utilisée au Sénégal pour restaurer les sols et fertiliser les jachères. Elle a la capacité de fixer l'azote dans les sols.

II - METHODES

Pour chaque technique appliquée et pour chaque situation étudiée, nous avons utilisé trois répétitions d'échantillonnage. Nous avons procédé de la manière décrite par la figure 3.

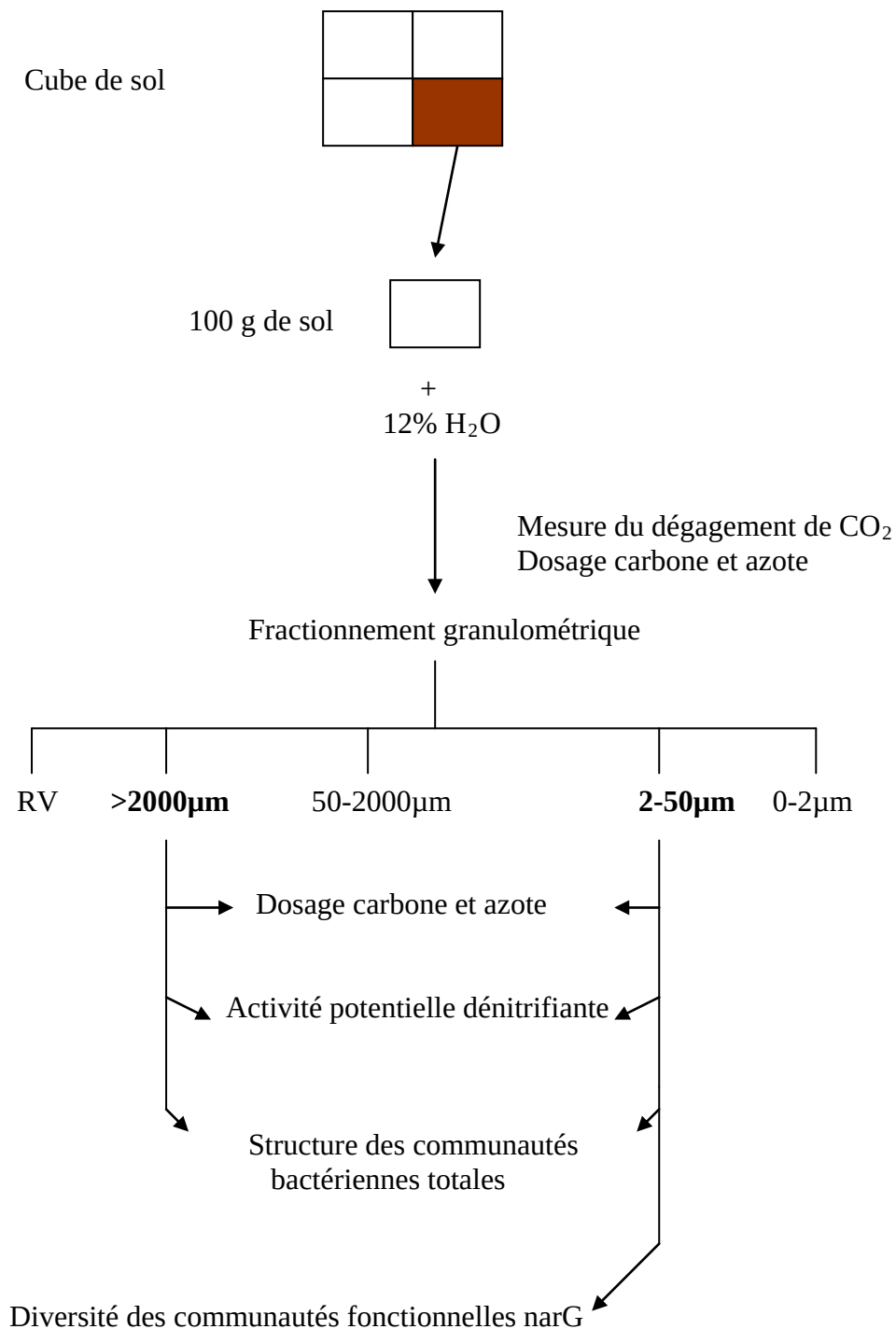


Figure 4 : Procédure d'étude

2.1 - Minéralisation du carbone

La minéralisation du carbone est basée sur la mesure du dégagement de CO₂ par rapport au volume total d'air en fonction du temps. Les échantillons de sol total (cubes) sont pesés et humectés à 100% de leur capacité de rétention (12 g H₂O / 100 g sol). Ils sont ensuite enfermés hermétiquement dans des flacons de 1100 ml munis de bouchons.

Au temps T₀, les flacons sont dégazés à l'air comprimé puis incubés à 28°C pendant 7 jours. Le flux de CO₂ est mesuré tous les jours par injection directe dans un chromatographe à phase gazeuse de type SRA (Analytical Instruments, MTI P200, Microsensor Technology Inc.), équipé d'un détecteur de conductibilité thermique TCD et d'une colonne Poraplot.

Les flacons sont dégazés à l'air comprimé durant toute la manipulation.

2.2 - Fractionnement physique du sol en classes d'habitats

Après la période d'incubation et mesure du dégagement de CO₂, les habitats microbiens sont isolés par fractionnement granulométrique (Fig. 4) (Chotte et *al.*, 1994).

Le sol est d'abord immergé dans de l'eau distillée (à 4°C) durant vingt quatre heures en chambre froide afin de séparer les structures les plus faiblement liés. Les racines et la fraction >2000 µm sont récupérées sur un tamis après dissection manuelle du sol et rinçage sous jet de pissette jusqu'à ce que l'eau qui s'écoule du tamis soit claire. La fraction 50 à 2000 µm est obtenue par tamisage. Les fractions de 2 à 50 µm et 0 à 2 µm sont séparés par centrifugation. Le culot constituant la fraction 2-50 µm est redispersé puis à nouveau centrifugé (6 min à 90g) jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide (8 rinçages). La fraction 0-2 µm contenue dans les surnageants, est floculée par centrifugation (10 min à 2700g). Chaque fraction est récupérée dans un bécher préalablement taré et l'eau résiduelle est éliminée par succion capillaire avec du papier filtre. Les fractions débarrassées de l'eau libre sont conservées humides au froid (4°C).

2.3 - Dosage du carbone total et azote total

Les taux de carbone et d'azote sont mesurés au laboratoire LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques) de l'IRD/Bel-Air

Les dosages sont effectués par oxydation catalytique à l'aide d'un analyseur élémentaire CHN EA1112 Thermofinnigan Series.

Les échantillons de sol (60 mg) sont mis à l'étuve (environ 105°C) une nuit avant l'analyse, pour y être séchés. Puis on les laisse refroidir 1 heure dans le dessiccateur. Ensuite

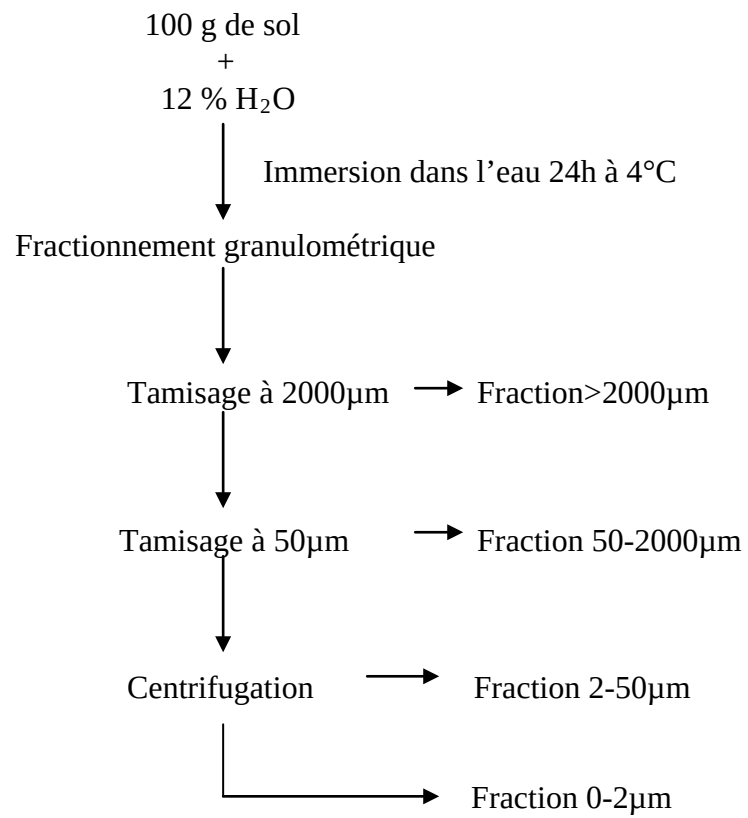


Figure 5 : Schéma du protocole de fractionnement granulométrique

on les analyse grâce à l'appareil CHN où l'élimination des matières organiques est assurée par un brûleur et des nacelles en étain à une température de 1800°C. Cette combustion permet d'obtenir du carbone et de l'azote. Ces deux composés passent successivement dans le catalyseur d'oxydation (900°C) et 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. Les quantités de carbone et d'azote sont obtenues grâce au logiciel EAGER 300 for EA 1112.

2.4 - Dosage de l'activité potentielle de dénitrification

L'activité potentielle de dénitrification est mesurée selon la méthode développée par Lensi et *al.* (1995). Les échantillons de sol sec sont mis à incuber en présence d'une solution qui permet l'activité métabolique des bactéries. Cette solution contient du glucose (100 µg de C-glucose par g de sol), de l'acide glutamique (100 µg de C-acide glutamique par g de sol), de nitrate de potassium (100 µg de N-nitrate de potassium par g de sol) et de chloramphénicol (2.5 mg par g de sol).

Le nitrate (NO₃) est transformé en oxyde nitreux (N₂O) par les bactéries dénitrifiantes. L'oxyde nitreux réductase de ces dernières est inhibée pour bloquer la formation de N₂ et le N₂O ainsi formé est mesuré. L'atmosphère d'incubation est donc remplacée par un mélange d'hélium (anaérobiose) et d'acétylène (pour le blocage de l'enzyme oxyde nitreux réductase).

Ainsi 10 g d'échantillon de sol sec, tamisé à 2 mm est introduit dans un flacon de 25 ml fermé hermétiquement. Le vide est réalisé dans chaque flacon puis on fait barboter de l'hélium pendant 30 secondes. A l'aide de seringues, 10% de l'hélium du volume du flacon sont prélevés et remplacés par le même volume en acétylène. Il est ensuite ajouté 3 ml de la solution après avoir retiré 3 ml du mélange de gaz (hélium-acétylène).

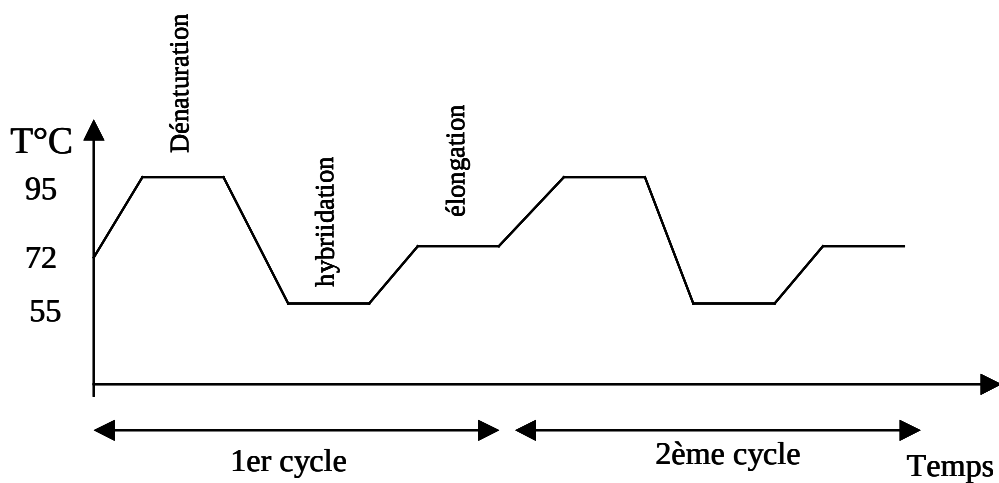
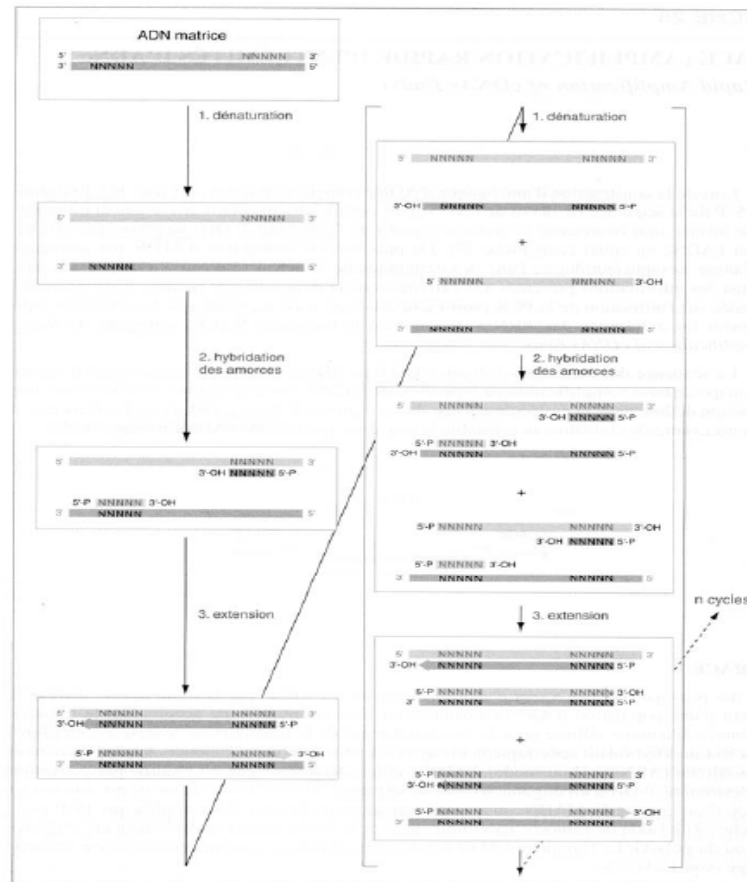
L'ajout de la solution constitue le temps T₀ de l'activité dénitrifiante. Les flacons sont ensuite incubés à 28°C et les mesures d'activité effectuées au bout de 24 h grâce au même chromatographe à phase gazeuse.

2.5 - Analyse moléculaire des communautés microbiennes

2.5.1. - Extraction de l'ADN du sol

L'ADN est extrait par une méthode de lyse physique décrite par Porteous et *al.*, (1997) avec quelques modifications (Annexe 1). Un échantillon de 0,5 g de sol broyé et tamisé à 0,2

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)



Cycles thermiques de la réaction d'amplification d'ADN

Figure 6 : Principe de la PCR

µm est mis en présence de billes de zirconium stériles et 1ml de tampon de lyse (NaCl 0,25 M et EDTA 0,1M pH 8) filtré et stérilisé. La dispersion physique des cellules est assurée par une agitation au moyen d'un appareil le "beadbeater". L'ADN est extrait par du chloroforme et successivement précipité par du polyéthylène glycol 40% et de l'isopropanol. Il est ensuite lavé à l'éthanol et conservé dans du TE 1X (Annexe 1). L'ADN brut obtenu à la fin de l'extraction est purifié à l'aide du Kit de purification Wizard^R DNA Clean-Up System (Promega, USA). L'ADN est ensuite quantifié sur gel d'agarose à l'aide des gammes étalons (Annexe 1) puis il est conservé à -20°C.

L'ADN extrait a servi aux études portant sur :

1 - la structure des communautés bactériennes totales dans le sol en évaluant la variabilité des séquences d'une partie plus ou moins conservée du génome présente chez toutes les bactéries (région V₃ de l'ADNr 16S).

2 - la diversité des communautés fonctionnelles dénitrifiantes en ciblant le gène fonctionnel narG.

2.5.2. - Etude de la structure des communautés bactériennes totales

La structure des communautés bactériennes totales a été étudiée par la méthode PCR – DGGE (*Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

La PCR-DGGE permet de séparer, par électrophorèse en conditions dénaturantes, des fragments d'ADN amplifiés de même longueur mais de séquences différentes. Ainsi, en amplifiant par PCR un échantillon environnemental où plusieurs espèces différentes sont présentes et en le soumettant à la DGGE, nous obtenons un profil électrophorétique.

2.5.2.1. - La PCR

La PCR (Mullis et Faloona, 1987) consiste en une amplification enzymatique in vitro d'un segment d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires des séquences en 5' et 3' du segment à amplifier. Ce segment d'ADN est recopié en plusieurs millions d'exemplaires par une série de réactions successives (figure 6).

La réaction d'amplification

Le mélange réactionnel de 25 µl contient 10 ng d'ADN, la Taq Polymérase Ready -To-Go (Amersham-Biosciences, France) (Annexe 2) et 1µM de chaque oligonucléotide ou amorce. Les oligonucléotides utilisées EUB338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') muni d'un GC « clamp » (Muyzer et al., 1993) et UNIV518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Ovrias, 1997) permettent de cibler la région variable V₃ de l'ADNr 16S.

La réaction d'amplification réalisée sur le thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) consiste en une « touchdown PCR » qui débute par un premier cycle de dénaturation de l'ADN pendant 5 min à 94°C. Suivent ensuite 20 cycles comprenant :

- 30 sec à 94°C (dénaturation de l'ADN)
- 30 sec de 65°C à 55°C (touchdown : la température d'appariement diminue de 0.5°C à chaque cycle jusqu'à atteindre 55°C)
- 1 min à 72°C (élongation de l'ADN)

Puis viennent enfin 10 cycles additionnels composés de :

- 30 sec à 94°C
- 30 sec à 55°C
- 1 min à 72°C

La PCR se termine par un dernier cycle d'élongation de 10 min à 72°C. Les fragments d'ADN amplifiés sont contrôlés sur un gel d'agarose à 1%. Ils migrent parallèlement à un marqueur de taille (annexe 5). A la fin de la migration le gel est coloré au bromure d'éthidium (1mg.l^{-1}) (annexe 2) puis photographié sous lampe UV.

2.5.2.2. - La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Les fragments amplifiés sont séparés sur un gel à 8% d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5 :1) contenant un gradient dénaturant de 45 à 70% (Annexe 2). La migration est effectuée dans un tampon TAE 1X (Annexe 2) à 60°C pendant 17 h. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium (1mg.l^{-1}) pendant 30 minutes, rincé à l'eau déminéralisée pendant 10 minutes et enfin photographié sous table UV (Ets Vilber Lourmat).

2.5.3. - Etude de la diversité des communautés fonctionnelles dénitrifiantes

L'étude de la communauté dénitrifiante a été réalisée en ciblant le gène *narG* (gène de la nitrate réductase) qui est impliqué dans la réaction de transformation du NO_3^- en NO_2^- . Nous avons développé une approche moléculaire basée sur la construction de banque de clones du gène *narG* pour étudier la diversité des communautés bactériennes fonctionnelles au sein de nos échantillons. Cette construction de banques se déroule en plusieurs étapes :

5.3.1. - Amplification du gène *narG*

Le gène *narG* a été amplifié à l'aide du couple d'amorces dégénérées *narG*1960f (5'-TAC/TGTC/GGGC/GCAA/GGAA/GAA-3') et *narG*2650r (5'-TTC/TTCA/GTACCAC/G/TGTC/G/TGC-3') (Philipot et al., 2002). Le mélange réactionnel d'amplification (25 μl)

contient 2 μ M de chaque amorce, 2.5 unités de Taq polymérase (Taq Ready-To-Go, Amersham Biosciences), et 10 ng d'ADN du sol.

La réaction d'amplification réalisée sur le thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) consiste aussi en une « touchdown PCR » qui débute par un premier cycle de dénaturation de l'ADN (5 min à 94°C). Suivent ensuite 8 premiers cycles constitués de :

- 30 sec à 94°C (dénaturation de l'ADN)
- 45 sec de 59°C à 55°C (hybridation des amorces)
- 1 min à 72°C (élongation de l'ADN)

Puis viennent 33 cycles additionnels composés de :

- 30 sec à 94°C
- 45 sec à 55°C
- 1 min à 72°C

La PCR se termine par un dernier cycle d'élongation de 10 min à 72°C.

Les fragments d'ADN amplifiés sont contrôlés sur un gel d'agarose à 1% coloré au bromure d'éthidium (1mg.l^{-1}) puis photographié sous lampe UV.

Le gène narG étant amplifié avec des amorces dégénérées, des fragments non spécifiques sont également amplifiés d'où la nécessité d'isoler et de purifier le fragment d'intérêt narG qui fait 650 paires de bases.

5.3.2. - Purification du fragment narG

Après séparation des amplifiats par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, le fragment narG de 650 pb est découpé et purifié avec le kit de purification QIAquick (Qiagen, France) (Protocole de purification en annexe 3).

5.3.3. - Construction de banques de clones du gène narG

L'identification des différentes communautés bactériennes dénitrifiantes présentes dans les échantillons des habitats 2-50 μ m est obtenue à travers le criblage par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de banques de clones (principe du clonage en figure 7) du gène narG.

a - La Ligation

Les produits PCR purifiés sont ligués dans le vecteur plasmidique pGEM-T Easy (Promega, USA) (annexe 5). Le mélange réactionnel de 10 μ l contient :

- o 5 μ l de tampon 2X

- o 3U/μl de T₄ DNA ligase
- o 1μl de vecteur pGEM-T
- o 3μl d'ADN

Le mélange réactionnel est incubé une nuit à 4°C.

b - La Transformation

Des cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH5α sont transformées avec 3μl de produits de ligation puis incubées 30 minutes dans la glace. Un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes suivi d'un refroidissement de 5 min sur de la glace permet d'introduire le vecteur recombinant dans les cellules. Les cellules transformées sont reprises dans 900 μl de milieu SOC (composition en annexe 4) puis incubées pendant 1h 30 min dans une étuve à 37°C sous agitation (170 rpm). Les cellules sont étalées sur boîtes de pétri contenant le milieu solide LB-Agar (Annexe 4), de l'ampicilline (100 μg/ml), 10 μl d'IPTG (24 mg/ml H₂O), 40 μl d'X-Gal (20 mg/ml diméthyl formamide)(Annexe 2). Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies blanches (clones recombinants, ayant un insert du gène narG) sont sélectionnées alors que les clones non recombinants (colonies bleues) sont éliminées.

A l'aide d'un cure dent stérile, les colonies blanches sont repiquées sur boîtes de pétri (contenant LB-ampicilline/X-Gal/IPTG) quadrillées et numérotées.

La sélection des différents types de familles narG s'est faite par PCR suivie de RFLP sur des colonies blanches.

c - Sélection des différents types de familles narG (Criblage des banques)

La sélection des différents types de familles narG est faite par PCR suivie d'une digestion enzymatique (RFLP).

Les inserts des clones recombinants sont amplifiés à l'aide des amorces universelles plasmidique T7 (5'-AATAGGACTTATAG-3') et SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATA-3').

Le mélange réactionnel de 25 μl contient :

- o 2,5 μl tampon 10X de la Taq (Qbiogene)
- o 2.5 mM dNTP
- o 10 μM amorce SP6,
- o 10 μM amorce T7
- o 1,5 U Taq polymérase (Qbiogene)
- o cellules recombinantes

La PCR est réalisée par 30 cycles d'amplification après une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 min. Chaque cycle est constitué de :

- o 45 sec à 94°C
- o 45 sec à 55°C
- o 1 min à 72°C

Un cycle d'élongation de 7 min à 72°C termine la PCR.

Les amplifiats sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les clones qui présentent la taille de fragment attendue (750 pb : taille du fragment +100 nucléotides situés autour des amorces T7/SP6) sont retenus pour déterminer les différents types phylogénétiques (phylotypes) au sein de chaque banque de clones.

5.3.4. - Détermination des types phylogénétiques

La détermination des différents types phylogénétiques dans chaque banque se fait par la technique RFLP. Les amplifiats (5µl) sont digérés par l'enzyme de restriction *AluI* (1,25 U) dans un mélange réactionnel (10 µl) contenant 1µl de tampon 10X avec de la BSA (10mg/ml).

Le mélange est incubé 3h à 37°C et les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel agarose à 2.5%.

L'analyse comparative des profils électrophorétiques a été effectuée à l'aide du logiciel BIOPROFIL-BIOGENE version 99 (Ets Vilber Lourmat). Elle permet de différencier les différentes familles de gène narG présentes dans les sols.

2.6. - Analyses statistiques

Nous avons utilisé les méthodes de comparaison de moyenne (Test de Fisher ; $p < 0.05$) et d'analyse de variance superANOVA (Version 1.01) pour estimer la variation des paramètres physico-chimiques étudiés dans les différentes situations.

Pour estimer la diversité des phylotypes (narG) dans les différents sols, des analyses statistiques de raréfaction ont été faites. Les calculs de raréfaction ont été effectués à l'aide du logiciel Analytic Rarefaction (version 2.1, University of Georgia).

Ensuite les indices de diversité de Shannon (H) et de Simpson (D) ont été calculés pour chaque échantillon.

L'indice de Shannon est un indice de richesse et il est donné par l'équation :

$$H = -\sum p_i \ln p_i \text{ avec } p_i = n_i/N$$

Plus il y a d'espèce dans l'échantillon plus l'indice est élevé.

L'indice de Simpson est déterminée par l'équation suivante :

$$D = \sum P_i^2$$

avec $P_i = n_i/N$, n_i étant égal au nombre de clones dans une famille RFLP et N étant le nombre total de clones de la répétition (Simpson, 1949). Cet indice indique la probabilité qu'ont deux clones pris au hasard dans l'échantillon d'appartenir à la même famille. Son inverse $1/D$ permet d'estimer le nombre de familles dominantes dans les échantillons.

CHAPITRE III

RESULTATS

1. - MINÉRALISATION DU CARBONE

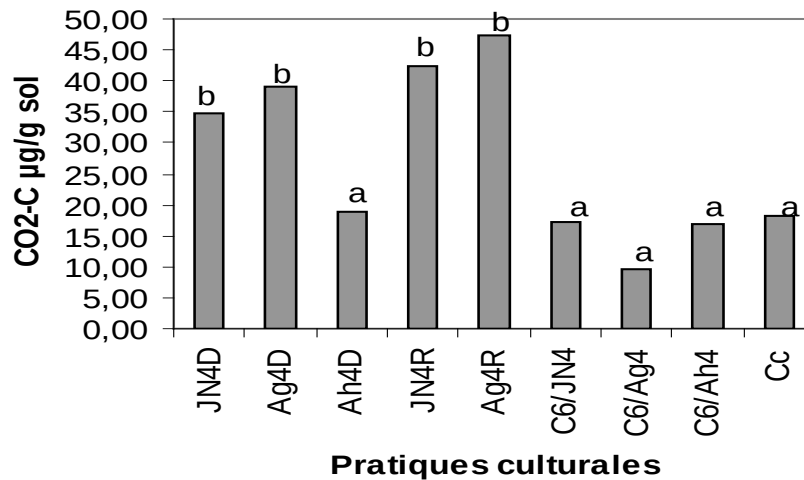


Figure 8 : Quantité de CO₂ libéré en µg CO₂-C/g sol au bout de 7 jours d'incubation par les différentes situations. Les valeurs sont les moyennes des répétitions. Les barres qui portent les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P < 0.05)

La figure 8 montre les quantités totales de CO₂-C dégagé par les échantillons des différentes situations.

A la fin de la période d'incubation les quantités de CO₂ enregistrées sur les sols de jachère naturelle et à *Andropogon gayanus* défrichés sont similaires (respectivement 34,9 µg/g et 38,92 µg/g de sol). Elles sont significativement plus élevées que celle obtenue sur la jachère à *Acacia holosericea* qui est de 18,85 µg/g de sol. On observe une augmentation non significative des quantités de CO₂ dégagé sur les JN4R et Ag4R après la première récolte. La première remise en culture n'a pas eu d'effet sur cette minéralisation du carbone. Le dégagement de CO₂ sur Ah4R n'a pas été déterminé.

Pour les échantillons de sol soumis à la culture depuis 6 ans il est noté des valeurs plus faibles comparées aux sols de jachère et de première récolte. Mais aucune différence significative n'est observée entre les quantités totales de CO₂ produites par les sols cultivés depuis 6 ans mais aussi entre ces derniers et le sol de culture continue. Les résultats montrent que la durée des cultures réduit la minéralisation du carbone et par conséquent l'activité microbienne dans les sols quel que soit l'antécédent jachère.

2. - DISTRIBUTION PONDERALE DES FRACTIONS GRANULOMETRIQUES

La figure 9 montre la distribution pondérale des fractions isolées des différentes situations de sol étudiées.

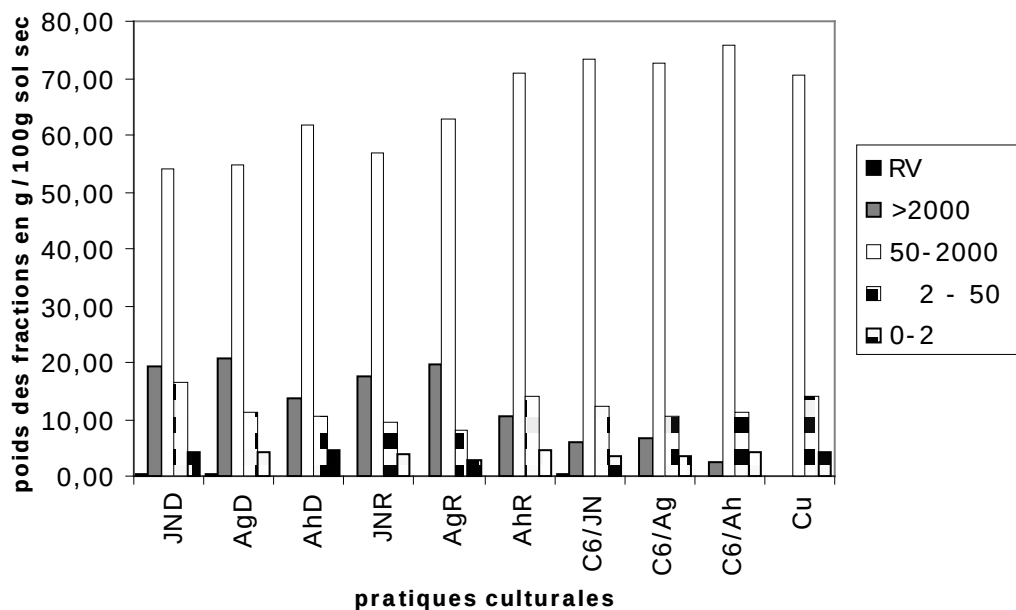


Figure 9 : Distribution pondérale des fractions granulométriques des différentes situations

La fraction 50-2000 μm est la plus abondante dans toutes les situations. Elle représente 54 % du poids du sol total pour les situations JN4D et Ag4D et 61 % pour Ah4D. Ces pourcentages croient avec les cultures. Les résidus végétaux (RV) isolés des différents échantillons sont très peu abondants ($< 1\%$ du poids du sol total). La fraction $>2000\mu\text{m}$ représente respectivement 19,22 %, 20,82 % et 13,80 % pour les situations de jachère JN4D, Ag4D, Ah4D. La remise en culture affecte la fraction $>2000\mu\text{m}$. En effet leur abondance diminue entre la défriche et les cultures suivantes. Cette variation devient très significative au bout de 6 ans et cette fraction disparaît sur le sol de culture continue. Quant aux fractions 2-50 μm et 0-2 μm elles varient entre les différentes situations mais de manière non significative.

Il est important de souligner qu'il n'existe aucun gravier de taille $> 2000\mu\text{m}$ dans le sol ferrugineux étudié. La fraction $> 2000\mu\text{m}$ est donc constituée de particules organiques et minérales de taille inférieure agrégées.

Tableau I : concentrations de carbone et d'azote en mg/g de sol obtenues sur les différentes situations

situations	N mg/g sol			C mg/g sol		
	>2000	2-50	sol total	>2000	2-50	sol total
JN4D	0,37 a b c	0,86 b c	0,44 a b c	5,45 a b	12,82 a b	5,68 a
Ag4D	0,46 b c	0,63 a b	0,37 a b	6,78 a b	9,89 a b	5,48 a
Ah4D	0,35 a b	0,87 b c	0,39 a b	5,77 a b	13,73 a b	5,84 a
JN4R	0,47 c d	0,75 a b c	0,57 b c	6,89 a b	11,15 a b	5,68 a b
Ag4R	0,41 a b c d	0,78 a b c	0,41 a b	6,23 a b	11,68 a b	5,56 a
Ah4R	0,3 a	0,35 a	0,33 a	5,77 a b	6,94 a b	6,41 a b
C6/JN4	0,49 d	0,35 a b c	0,64 c	7,31 b	11,66 a b	9,28 b
C6/Ag4	0,35 a b	0,35 a b	0,34 a	5,66 a b	8,32 a	5,12 a
C6/Ah4	0,39 a b c d	0,35 a b c	0,38 a b	5,42 a	12,41 a b	5,52 a
Cc		0,35 c	0,52 a b c		16,57 b	7,05 a

Tableau II : Valeurs C/N obtenues sur les différents situations

situations	C/N		
	>2000	2-50	sol total
JN4D	14,75	14,91	12,73
Ag4D	14,74	15,53	14,82
Ah4D	16,50	15,79	14,86
JN4R	14,56	14,87	9,92
Ag4R	15,07	14,91	13,46
Ah4R	19,23	19,83	19,42
C6/JN4	14,72	15,02	14,44
C6/Ag4	15,89	15,81	14,79
C6/Ah4	13,91	15,65	14,41
Cc		14,63	13,39

3. - DOSAGE CARBONE TOTAL ET AZOTE TOTAL

Les figures 10 et 11 montrent les teneurs en carbone et azote dosées sur les habitats >2000 μm et 2-50 μm des différentes situations de sol.

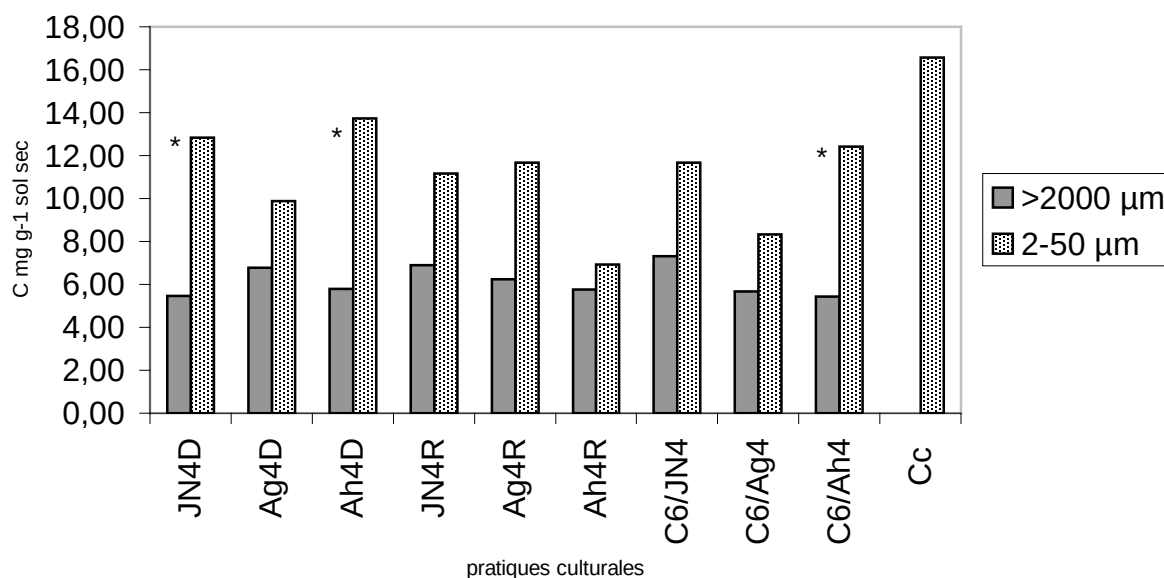


Figure 10 : Variations des concentrations de carbone total des fractions >2000 μm et 2-50 μm des différentes situations. * indique une différence significative entre fractions de même situation.

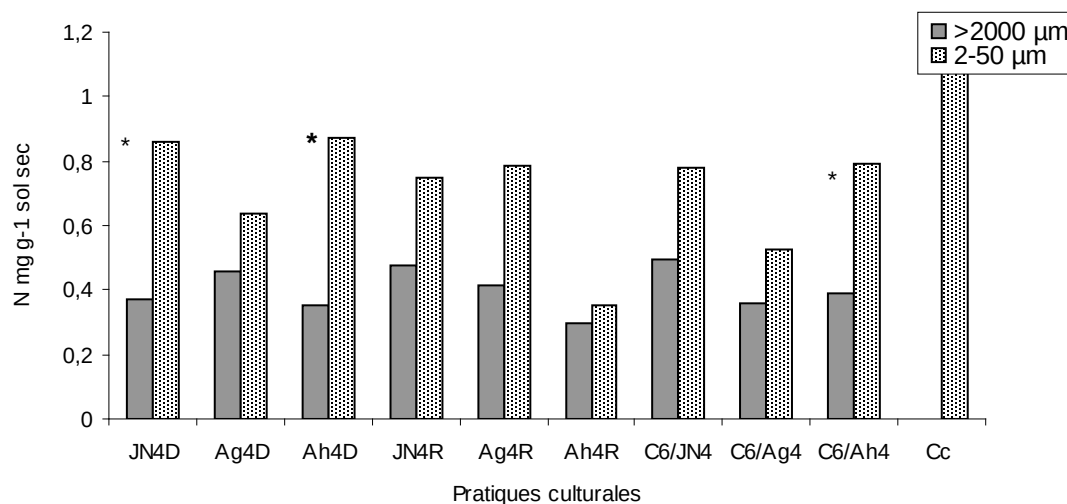


Figure 11 : Variations des concentrations d'azote total des fractions >2000 μm et 2-50 μm des différentes situations. * indique une différence significative entre fractions de même situation

Les teneurs en carbone et en azote sont plus élevées au niveau des fractions 2-50 μm . Cette variation n'est cependant significative que pour les situations JN4D, Ah4D et C6/Ah4.

La jachère à *Andropogon gayanus* enregistre les plus faibles valeurs de carbone et azote pour les situations de jachère. On remarque que la fraction 2-50 μm de la culture continue enregistre la quantité la plus élevée de carbone et d'azote. Pour une même fraction les valeurs de carbone et d'azote enregistrées sur les diverses situations ne sont pas significativement différentes. Les valeurs C/N ne varient pas de manière significative dans les différentes parcelles (Tableau II et III).

4. - ACTIVITE POTENTIELLE DES BACTERIES DENITRIFIANTES

La figure 12 montrent les résultats de l'activité potentielle de dénitrification dans les habitats $>2000 \mu\text{m}$ et 2-50 μm des différents sols.

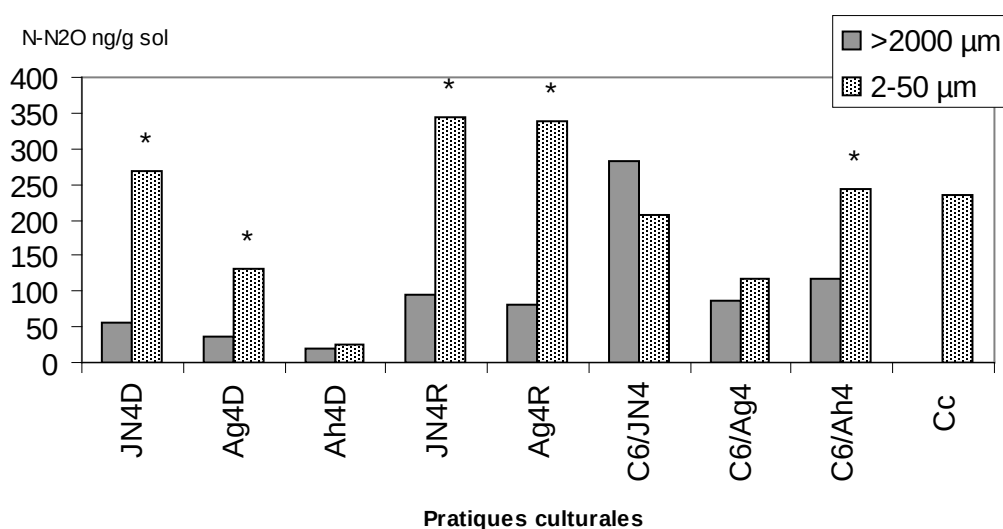


Figure 12 : Activité (ng N-N₂O/g sol sec) potentielle de dénitrification au seins des fractions $>2000 \mu\text{m}$ et 2-50 μm des différentes situations. * indique une différence significative entre fractions de même situation

Les résultats révèlent que pour les trois types de jachère la Ah4D enregistre la plus faible activité. L'activité dénitrifiante est plus importante au niveau de la fraction fine 2-50 μm comparée à la fraction grossière $>2000\mu\text{m}$ pour toutes les situations exceptée la C6/JN4 où la différence n'est pas significative. La remise en culture a un effet sur l'activité dénitrifiante. Les valeurs enregistrées au niveau des agrégats des sols cultivés sont plus élevées que celles des sols de jachère. L'activité dénitrifiante sur la Ah4R n'est pas déterminée.

5. - ETUDE DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES TOTALES

L'amplification de la région V₃ de l'ADNr 16S a donné des amplifiats de 200 paires de bases utilisés pour la DGGE (Fig. 13).

La Figure 13 présente les profils DGGE représentatifs de la diversité des fragments d'ADN amplifiés. Ces profils DGGE indiquent la structure des communautés bactériennes totales dans les habitats >2000 µm et 2-50 µm différentes situations de sol étudiées.

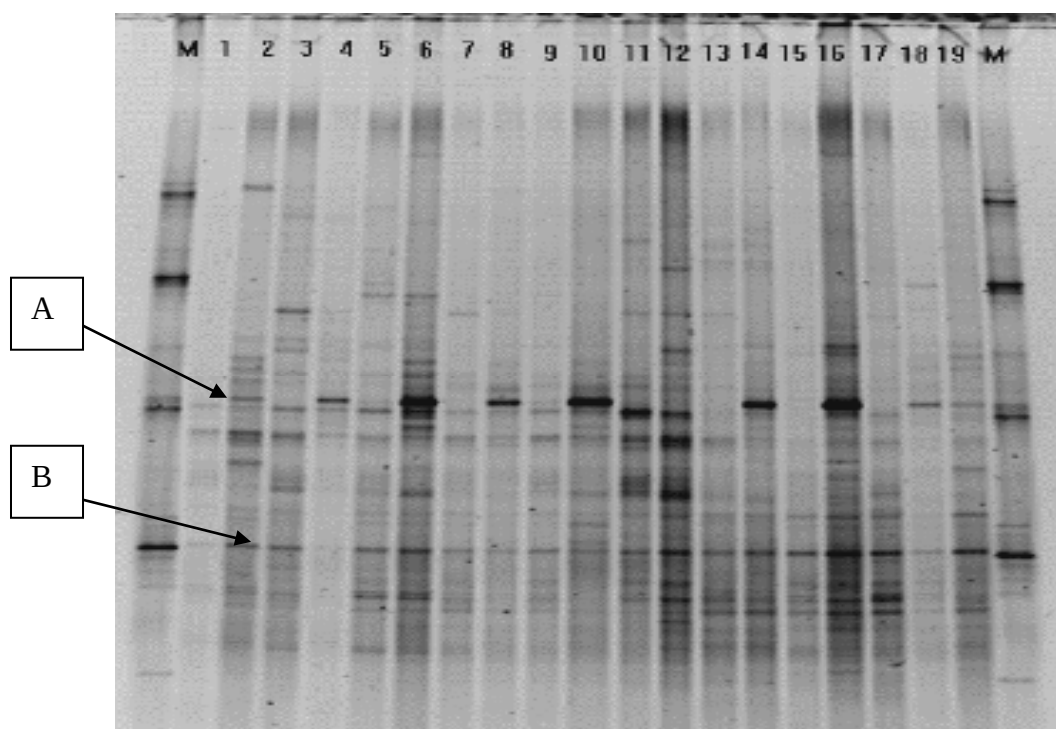


Figure 13 : Profils DGGE de l'ampliat d'une partie du gène 16S rDNA de la communauté bactérienne totale de 2 types d'agrégats d'un sol soumis à différentes pratiques culturales. **1** : JN4D > 2000 µm ; **2** : JN4D, 2 – 50µm ; **3** : Ag4D > 2000 ; **4** : Ag4D, 2 – 50µm ; **5** : Ah4D > 2000 µm ; **6** : Ah4D, 2 – 50µm ; **7** : JN4R > 2000 ; **8** : JN4R, 2 – 50µm ; **9** : Ag4R, > 2000µm ; **10** : Ag4R, 2 – 50µm ; **11** : Ah4R > 2000µm ; **12** : Ah4R, 2 – 50µm ; **13** : C6/JN4 > 2000µm ; **14** : C6/JN4, 2 – 50µm ; **15** : C6/Ag4 > 2000 ; **16** : C6/Ag4, 2 – 50µm ; **17** : C6/Ah4 > 2000µm ; **18** : C6/Ah4, 2 – 50µm ; **19** : CC, 2 – 50µm. **M** : marqueur.

L'analyse de la PCR-DGGE a mis en évidence un fragment d'ADN (Fig 13, bande A) présent uniquement dans les agrégats 2-50 µm montrant ainsi la spécificité des certaines communautés bactériennes dans cet habitat microbien.

Ces profils DGGE montrent également de nombreux fragments communs à tous les sols (Fig 13, bande B). Ce résultat indique qu'il existe néanmoins des communautés bactériennes stables c'est à dire présentes dans les sols quels que soient l'agrégat et le type de pratiques culturales (bande B).

Les résultats indiquent aussi que la PCR-DGGE du 16S rDNA sur ces sols a généré des profils complexes reflétant des changements dans la structure des communautés bactériennes sous les différentes situations de sol.

En effet, l'analyse des profils DGGE a montré que :

- dans les situations de jachère :

les sols de jachères Naturelle (JN4D) et d'*Acacia holosericea* (Ah4D), présentent une diversité des communautés bactériennes totales plus élevée dans les agrégats 2-50 μm (en terme de nombre de bandes DGGE) que dans les agrégats $> 2000 \mu\text{m}$ (Fig 13). Alors que dans le sol de jachère à *Andropogon gayanus* (Ag4D), c'est dans les agrégats $> 2000 \mu\text{m}$ que cette diversité des communautés bactériennes totales est la plus élevée.

- dans les situations de la 1^{ère} Remise en Culture :

les agrégats 2-50 μm de tous les sols révèlent une plus grande diversité des communautés bactériennes totales par rapport aux agrégats $> 2000 \mu\text{m}$.

- dans les situations de 6 ans de culture :

ce sont les agrégats 2-50 μm (comparés aux agrégats $>2000 \mu\text{m}$) des sols ayant connu les jachères Naturelle (C6/JN4) et d'*Andropogon gayanus* (C6/Ag4) qui présentent une diversité plus élevée comparés aux $>2000 \mu\text{m}$ des communautés bactériennes totales (en terme de nombre de bandes DGGE), contrairement au sol de jachère à *Acacia holosericea* (C6/Ah4), dans laquelle la diversité bactérienne est plus élevée dans la fraction de sol $> 2000 \mu\text{m}$.

Il ressort de cette analyse des profils DGGE que l'évolution de la diversité des communautés bactériennes n'est pas identique dans les différentes fractions de sol suivant le mode de gestion du sol.

En effet, une analyse de l'impact du précédent jachère sur l'effet "remise en culture" montre que :

- dans les situations de jachère Naturelle :

les remises en culture ont fait augmenter la diversité des communautés bactériennes (diversité C6/JN4 $>$ JN4R $>$ JN4D) dans les fractions $> 2000 \mu\text{m}$ des sols contrairement aux fractions 2-50 μm dans lesquelles cette diversité a été réduite.

- dans les situations de jachère à *Andropogon gayanus* :

les remises en culture ont provoqué une augmentation de la diversité des communautés bactériennes totales (diversité C6/JN4 $>$ JN4R $>$ JN4D) dans les fractions 2-50 μm . Cette diversité qui était élevée dans les fractions $>2000 \mu\text{m}$ sous la jachère (Ag4D) a été considérablement réduite par les remises en culture.

- dans les situations de jachère à *Acacia holosericea* :

la diversité des communautés bactériennes dans les 2 fractions (> 2000 et 2-50 µm) est restée assez élevée aussi bien dans la jachère qu'à la 1^{ère} remise en culture. Les résultats ont ensuite montré que les 6 années de cultures ont considérablement réduit cette diversité des bactéries de ces sols.

Quant au sol de la culture continue Cc, la structure des communautés est similaire à celle identifiée dans les fractions 2-50 µm des sols C6/JN4, C6/Ag4, C6/Ah4.

6. - DIVERSITE DES COMMUNAUTES FONCTIONNELLES NARG

6.1. - L'amplification du gène fonctionnel *narG*

La figure 14 montre les résultats de l'amplification du gène *narG* d'une taille d'environ 650 pb après purification. Tous les échantillons (habitats >2000 µm et 2-50 µm) ont donné des amplifiats de cette taille montrant la présence de communautés bactériennes dénitrifiantes dans les sols des différents agrosystèmes étudiés.

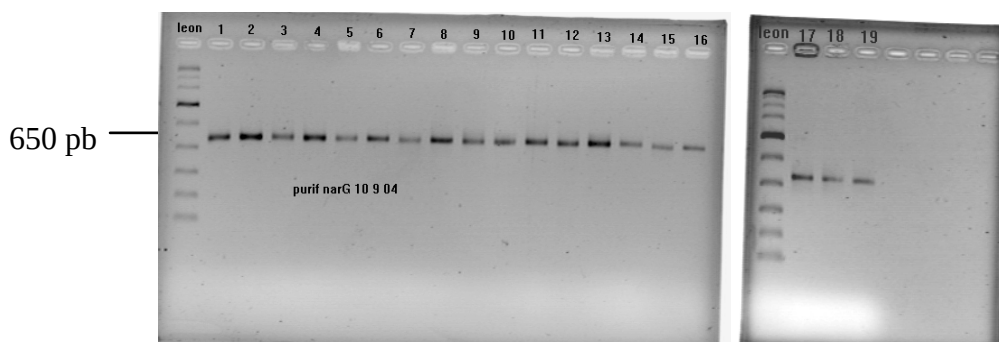


Figure 14 : Amplification PCR du gène *narG* des communautés dénitrifiantes présentes dans les deux types d'agrégats (>2000 µm et 2-50 µm) des différents agrosystèmes étudiés. M : marqueur LEON.

6.2. - Diversité des communautés dénitrifiantes *narG* associées à l'habitat 2-50 µm

Pour chacun des dix sols étudiés, environ 100 clones (995 clones au total) ont été caractérisés par RFLP.

6.2.1. - Caractérisation des profils RFLP

Le criblage des banques de clones a permis l'identification de 135 profils de restriction ou phylotypes ou familles RFLP. La figure 15 et le tableau II présentent respectivement un exemple de profils de restriction et le nombre de phylotypes obtenus dans chaque situation de sol (agrosystème).

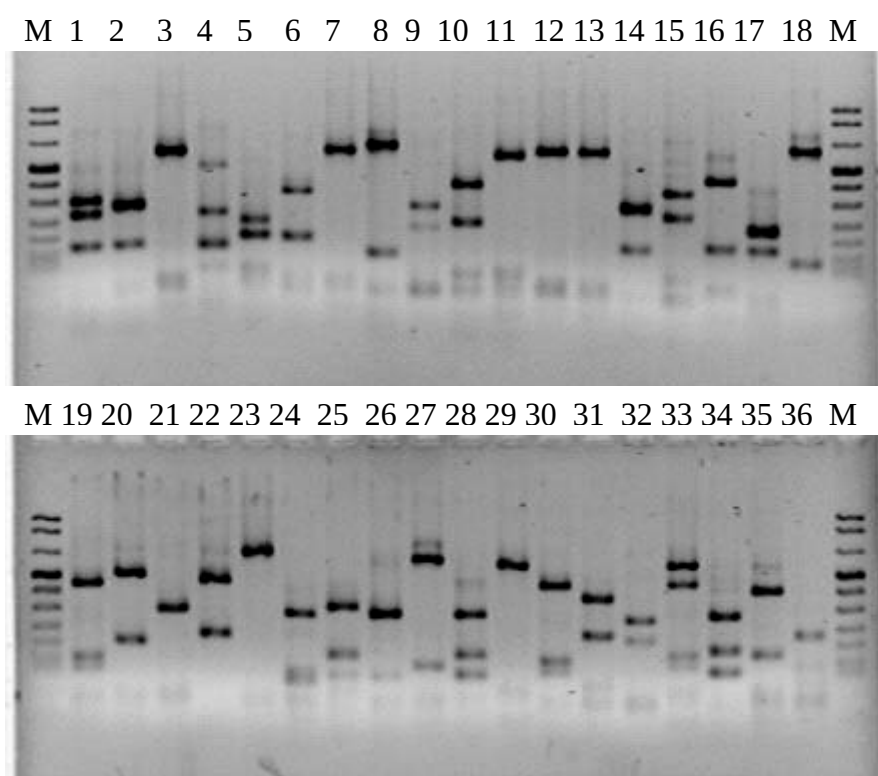


Figure 15 : Gel agarose montrant différents profils RFLP (Types RFLP, Phylotypes) obtenus par digestion *Alu* I du gène *narG* chez les bactéries dénitrifiantes. Il s'agit ici des types RFLP obtenus sur 36 clones "narG" de l'agrégat 2-50 µm du sol Ah4R. Marqueur : VIII.

Tableau IIIV : Nombre de familles RFLP ou phylotypes obtenus dans les différents agrosystèmes.

Situations de sol	Nombre de familles RFLP
JN4D	25
Ag4D	40
Ah4D	31
JN4R	34
Ag4R	42
Ah4R	37
C6/JN4	40
C6/Ag4	40
C6/Ah4	56
Cc	41

6.2.2. Distribution des phylotypes

Les figures 16, 17 et 18 montrent la distribution des phylotypes narG dans les habitats 2-50 µm des différents agrosystèmes.

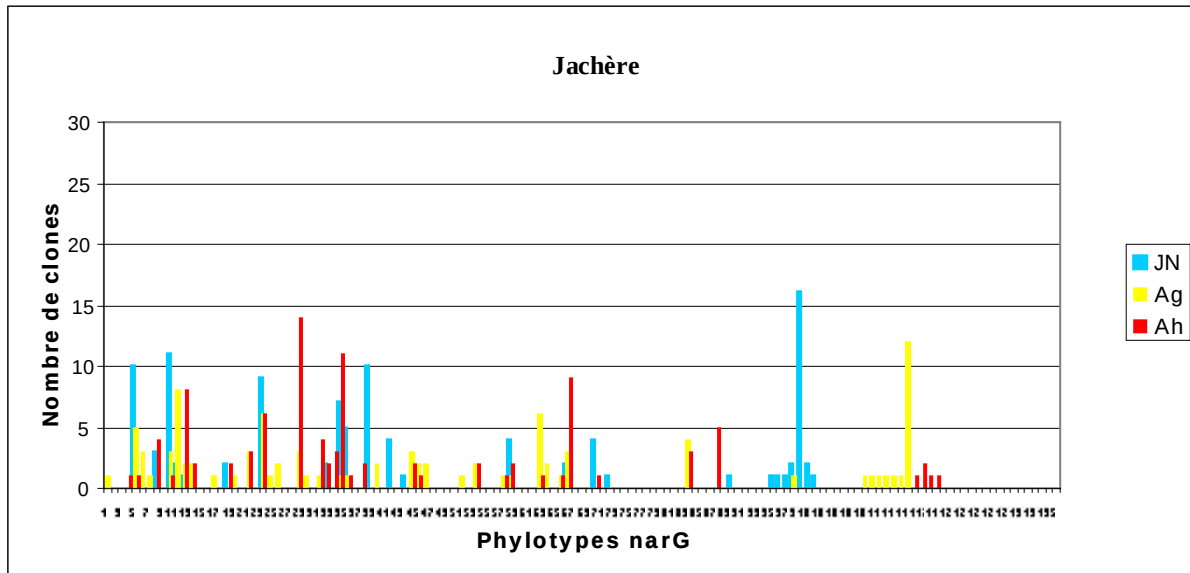


Figure 16 : Histogramme de la distribution des profils narG sur sols de jachère

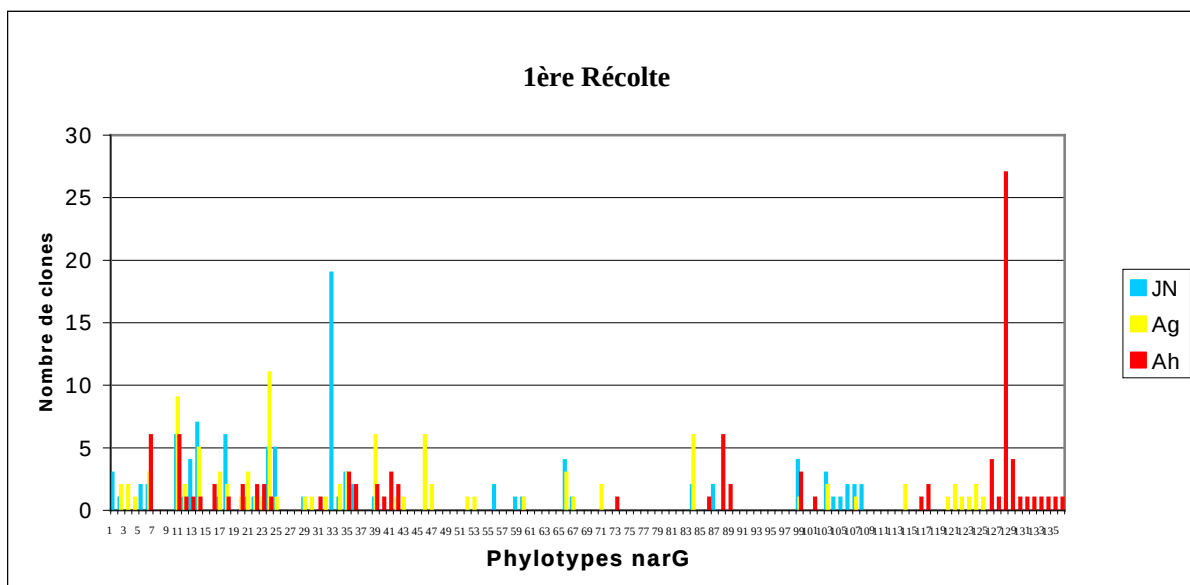


Figure 17 : Histogramme de la distribution des profils narG sur sols de jachère 1^{ère} récolte

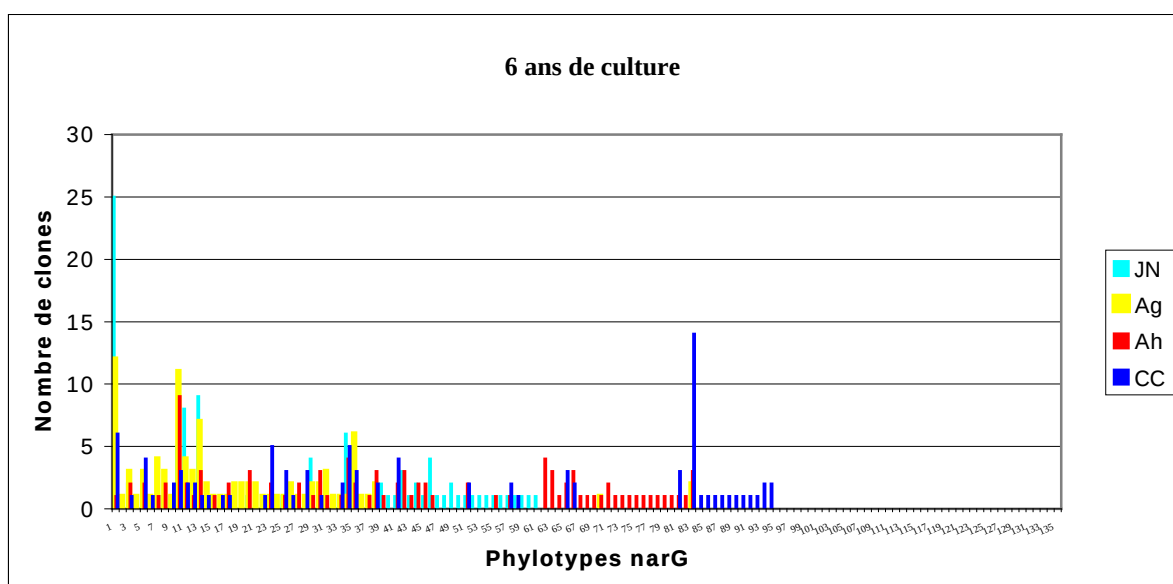


Figure 18 : Histogramme de la distribution des profils narG sur sols cultivés depuis 6 ans

L'analyse des résultats montre que 95 % des phylotypes sont représentés par plus de 2 clones et 5% par 1 seul clone.

L'analyse des résultats du criblage des banques a montré que :

- les sols de jachère sont dominés par les phylotypes 5, 10, 38 et 99 pour JN4D (45,5 %), 11, 23, 62 et 114 pour Ag4D (32,6%) et 12, 28, 34 et 66 pour Ah4D (43 % des clones).

- dès la première récolte, le sol JNR (antécédent cultural = Jachère naturelle) présente des phylotypes dominants 13, 17, et 32 regroupant 32% des clones alors que le sol AgR (antécédent cultural = jachère *Andropogon gayanus*) est dominé par les phylotypes 23, 38, 45 et 83 (38% des clones). Quant au sol AhR (antécédent cultural = jachère *Acacia holosericeae*) seuls les phylotypes dominants 6, 87 et 127 représentant 45 % des clones analysés ont été mis en évidence.

- à la fin des 6 années de culture, d'autres phylotypes dominants sont apparus dans les différentes situations de sol : Il s'agit des phylotypes 1, 11 et 13 (48 %) dans le sol C6/JN4, des phylotypes 1, 10, 13 et 35 (36 %) dans le sol C6/Ag4, puis enfin un seul phylotype dominant 10 (9%) dans le sol C6/Ah4.

- Sur la situation de culture continue, seuls 2 phylotypes dominants 1 et 83 (20 %) ont été notés.

Il ressort également de ces analyses que plusieurs phylotypes ne sont présents que dans une seule banque.

Pour estimer la diversité du gène narG au sein de chaque banque de clones construite, des analyses statistiques ont été faites.

6.2.3. - Analyse de raréfaction

La figure 19 montre les résultats de l'évolution des courbes de raréfaction permettant d'estimer la diversité des clones narG dans les banques. Toutes les courbes tendent vers un plateau asymptotique c'est -à -dire la saturation de clones échantillonnés dans les banques exceptée celle représentant la banque de sol C6/Ah4.

Le fait que le criblage des clones du sol C6/Ah4 n'ayant pas permis d'atteindre le plateau asymptotique (Fig.19) indique la forte diversité des communautés dénitrifiantes narG dans cette banque. Ce résultat est en concordance avec le grand nombre de phylotypes mis en évidence dans ce sol.

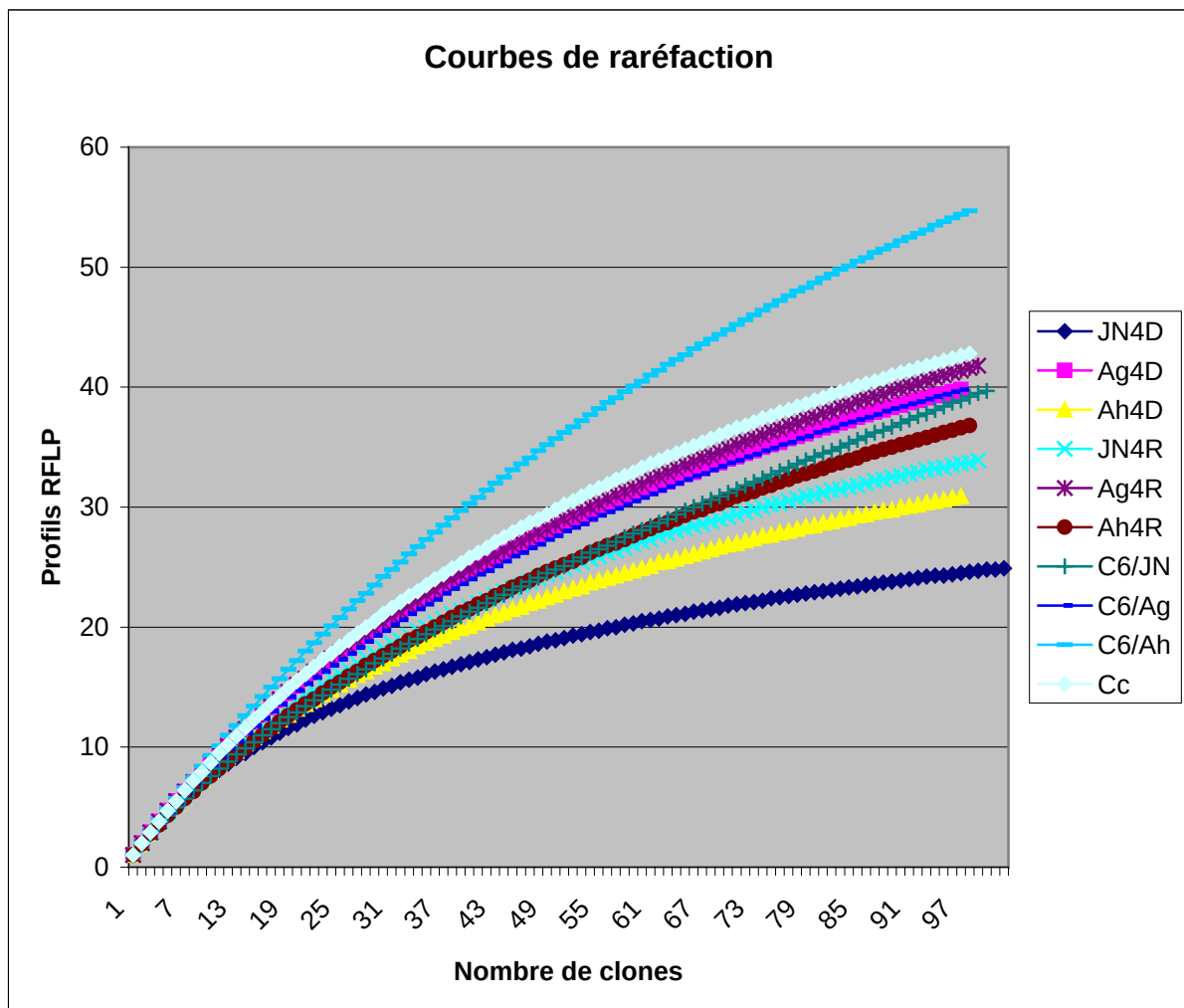


Figure 19 : Courbes de raréfaction

6.2.4. - Indice de diversité

Le tableau III montre les valeurs des indices de diversité Shannon-Weaver et Simpson obtenus.

Tableau V : Indices de diversité

Type d'agrosystèmes	Shannon's Index H	Simpson D	1/D
JN4D	2.64	0.077	12.98
Ag4D	3.4	0.046	21.7
Ah4D	3	0.065	15.38
JN4R	3	0.066	15.15
Ag4R	3.4	0.044	22.72
Ah4R	3	0.097	10.3
C6/JN4	3	0.09	11.11
C6/Ag4	3.3	0.05	20
C6/Ah4	3.8	0.028	35.71
Cc	3.5	0.044	22.72

Les résultats du tableau III indiquent que le sol de C6/Ah4 ($H = 3.8$, $D = 35.71$) présente une diversité plus élevée en communautés dénitrifiantes (narG) que les autres situations de sol. En effet, cette banque de clones C6/Ah4 présente les indices de Shannon-Wiener et de Simpson les plus élevés ($H = 3.8$, $D = 35.71$). Ce résultat confirme les données de la courbe de raréfaction.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'utilisation agricole du sol, organisée en systèmes de culture, entraîne des modifications de ses propriétés physiques et chimiques et influence le développement des organismes présents dans le sol (microorganismes, faune). Ainsi la jachère est d'abord un processus actif de restauration suite aux perturbations induites par la mise en culture des sols.

1. - Effets des pratiques culturales sur l'agrégation

La culture en continue de plantes peut conduire à une dégradation des propriétés physiques du sol (Hart et *al*, 1988). Ainsi, la quantité de macro-agrégats stables à l'eau est plus faible sous culture continue que sous des prairies de graminées ou de légumineuses (Baldock et Kay, 1987 ; Angers et Mehuys, 1988). Nos résultats montrent que la remise en culture entraîne une réduction considérable des agrégats >2000 µm dont *Acacia holosericea* constitue la plantation la moins favorable à sa formation. Il n'existe aucun gravier de cette taille sur le sol étudié. Par conséquent cet habitat est constitué de particules minérales et organiques agrégées de taille inférieure. La quantité d'agréats stables à l'eau est plus élevée pour les sols de jachère que pour les sols cultivés, ce qui confirme l'effet délétère de la culture continue sur la structure, et en particulier sur la macro-agrégation. Ainsi ces macro-agrégats sont moins stables que les autres face à des contraintes telles que la sécheresse, les pluies, les cycles de dessiccation/réhydratation, ou les cultures (Oades, 1992 ; Beare et *al.*, 1994). Ceci est dû à la nature des liaisons impliquées dans la structuration et la stabilisation de ces macro-agrégats (Beare et *al.*, 1994). La fraction >2000 µm représente donc un habitat instable pour les microorganismes. Sa déstructuration s'accompagne d'une réduction des activités microbiennes et d'une modification de la diversité (Ndour, 2003). De la taille des limons l'habitat 2-50 µm semble représenter un site privilégié pour les microorganismes. Il a la particularité de concentrer plus de la moitié des bactéries cellulolytiques du sol (Chastrusse, 1998) et renferme des composés organiques stables à faible turn-over (Elliot, 1986 ; Oades, 1988).

2. - Effets des pratiques culturales sur la matière organique

Les modifications de l'état d'agrégation du sol suite à différentes pratiques ou séquences culturales ne sont cependant pas toujours associées à des changements de la teneur en matière organique totale du sol (Baldock et Kay, 1987). La matière organique d'un sol est constituée 1) des résidus de plantes et d'animaux à différents stades de décomposition, en proportions variables, 2) des cellules et des tissus d'organismes vivant dans le sol et 3) des composés sécrétés par ces organismes. Si, par une intervention extérieure la quantité ou la qualité des

intrants (résidus) est modifiée, l'activité microbienne du sol est affectée, et par la même, les cinétiques de minéralisation de la matière organique (Linden et *al.* 1992; Gunapala et *al.*, 1998). Ceci, finalement, a une répercussion sur les quantités de carbone et d'azote organiques (Ladd et *al.*, 1985; Powers, 1989). Il existe en effet une étroite relation entre le ratio C/N de la matière organique et l'activité microbienne des sols. Plus la valeur du ratio C/N est élevée, plus l'activité microbienne est limitée par la quantité d'azote inorganique disponible dans l'écosystème édaphique. Nos résultats montrent que le rapport C/N varie entre 12,67 et 19,42 pour les sols totaux, entre 13,91 et 19,23 pour les fractions >2000 µm et entre 14,62 et 19,82 pour les fractions 2-50 µm. C'est la situation Ah4R qui enregistre les plus élevés rapports C/N aussi bien au niveau du sol total que des fractions. Les activités mesurées sur le sol total et les fractions montrent des niveaux d'activités plus élevées sur les sols de jachère sous végétation naturelle et à *Andropogon gayanus* comparées à celle enregistrées sous *Acacia holosericea*. La faible activité minéralisatrice enregistrée sous jachère à *Acacia holosericea* est liée à la qualité de sa litière. En effet cette dernière est riche en polyphénols. Certains auteurs ont souligné que la teneur en polyphénols ralentit la minéralisation du carbone (Sall et *al.*, 2003). Il a été par ailleurs montré que les composés phénoliques pourraient inhiber l'activité et la croissance microbienne (Boufalis et Pellissier, 1994). Ainsi la présence de ces métabolites secondaires peut limiter la disponibilité d'un substrat de haute qualité (Heal et Dighton, 1985).

3. - Effets des pratiques culturales sur l'activité potentielle dénitrification

La localisation des microorganismes dans la matrice sol peut affecter aussi bien leurs métabolismes que leurs activités (Marshall, 1971). Sexstone et *al.* (1985) et Lensi et *al.* (1991) ont observé que l'activité n'était pas retrouvée dans toutes les fractions du sol. En comparant des agrégats à un sol non fractionné, Sexstone et *al.* (1988) suggèrent que la distribution spatiale du carbone et des bactéries (nitrifiantes et dénitrifiantes) constitue le principal facteur limitant de la dénitrification au sein des agrégats. Aussi les travaux de Seech et Beauchamp (1988) démontrent que la macroagrégation affecte la dénitrification. Nos résultats montrent que la localisation des microorganismes et la remise en culture jouent un rôle sur l'activité microbienne. Ainsi les agrégats 2-50 µm se révèlent plus propices à l'activité dénitrifiante. On note que les sols de jachère sont moins favorables à la dénitrification. Ceci peut être lié à la structure de ces sols notamment la présence des macro-pores permettant une bonne circulation de l'oxygène. La forte réduction au niveau de la jachère à *Acacia holosericea* peut s'expliquer par le fait que les polyphénols agissent sur les molécules azotées en les complexant. Ils les

rendent ainsi inaccessibles aux microorganismes pour une éventuelle minéralisation. Ce phénomène entraîne une diminution de la disponibilité des nitrates pour les dénitrifiantes. Ainsi la teneur en oxygène et la disponibilité des nitrates sont les deux principaux facteurs susceptibles de limiter l'expression de la dénitrification (Bijay-Singh et *al.*, 1989 cité par Abbadie et Lensi, 1990). Par ailleurs nos résultats sont en accord avec ceux de Bijay-Singh et *al.* (1989) qui ont montré que la remise en culture augmente l'activité dénitrifiante. Ceci peut être lié à la dégradation structurale et au compactage des sols sous culture.

4. - Effets des pratiques culturales sur la diversité microbienne

L'analyse des ADN microbiens extraits à partir des échantillons de sol est considérée comme une stratégie nouvelle pour étudier la diversité des microorganismes du sol (Torsvik et *al.*, 1994 ; Duarte et *al.*, 1998). Cette méthode permet de s'affranchir des problèmes liés à la mise en culture. Cependant il est important de noter que certaines étapes de l'analyse (extraction d'ADN, PCR) peuvent constituer une source potentielle de biais susceptibles d'influencer la composition et la richesse de la communauté bactérienne étudiée. Nous avons donc travaillé comme de nombreux auteurs en supposant que ces biais, s'ils existent, se font de façon équivalente dans les échantillons (Bruns et *al.*, 1999 ; Duineveld et *al.*, 1998 ; Nusslein et Tiedje, 1999).

L'approche moléculaire (DGGE) utilisée fournit un profil de la diversité (structure) basé sur la séparation électrophorétique des séquences du gène 16S rDNA amplifié. Ce gène ribosomal présente des motifs conservés et d'autres très variables entre les espèces. Rapide et sensible (Muyzer et Smalla, 1998), la technique DGGE permet une étude comparative des communautés lors de modifications environnementales (Ranjard et *al.*, 2000). Elle ne semble pas cependant appropriée pour une estimation de la diversité des microorganismes en termes de richesse et d'abondance. En effet plusieurs séquences sont certainement contenues dans une bande unique du profil électrophorétique et inversement, un organisme unique peut être représenté par plusieurs bandes (Jensen et *al.*, 1993). De telles observations nous ont amenés à limiter notre étude à une analyse comparative de la structure génétique de la communauté bactérienne totale.

Les différences entre la présence et l'absence de bandes au niveau de la structure résultent des différences dans la composition des communautés. La comparaison des communautés entre les fractions >2000 µm et 2-50 µm montre des bandes qui ne sont présentes qu'au niveau de la fraction 2-50 µm. Aussi à l'exception de la Ag4D, quelle que soit la pratique culturale (jachère ou culture) ou le type de végétation de jachère la fraction fine

2-50µm comporte le plus grand nombre de bandes. Ceci suggère une localisation préférentielle des populations. Des travaux précédents sur les bactéries ont indiqué des observations semblables en comparant la proportion de groupes (fonctionnels ou taxonomiques) dans les fractions du sol. Ces travaux ont montré que la fraction 2-50 µm constitue un microhabitat privilégié pour les microorganismes, 40 à 70% de la population totale y sont préférentiellement localisés (Hattori, 1988 ; Kabir et *al.*, 1994 ; Lensi et *al.*, 1995 ; Ranjard et *al.*, 1997). On peut également remarquer que la structure des communautés change avec la remise en culture. Ces modifications ou réponses sont différentes suivant l'antécédent cultural (type de jachère) et la fraction considérés.

Aussi bien l'activité plus élevée que la structure des bactéries (totales) plus denses dans les fractions 2-50 µm nous ont poussées à étudier la structure génétique des communautés bactériennes dénitrifiantes associées à ladite fraction de différents sols de jachère et de culture. Nous avons établi des profils RFLP du gène *narG*. L'utilisation du gène *narG* a un intérêt spécial car sa phylogénie est très proche de l'ADNr 16S. Nos résultats ont montré des différences dans la composition des communautés des différentes situations de jachère. Aussi la culture a un effet immédiat sur les bactéries dénitrifiantes. Elle entraîne une réduction voire une disparition des familles dominantes des sols de jachère. Cet effet est plus ressenti sur les sols à antécédents jachère naturelle et jachère à *Acacia holosericea*. Cependant il est important de noter que la culture augmente le nombre de phylotypes voire de familles. Ceci suggère une augmentation de la diversité des bactéries dénitrifiantes dont l'hyperactivité limite la nutrition des plantes (nitrates) et provoque un accroissement du dégagement d'oxyde nitreux polluant l'atmosphère. On peut faire une corrélation avec les mesures d'activité potentielle dénitrifiante effectuées. En effet ces dernières montrent aussi que ce sont les sols sous culture qui enregistrent les valeurs les plus élevées. D'où les modifications d'activité observées ne résultent ni de l'état physiologique des cellules, ni de l'expression enzymatique mais plutôt du déséquilibre dans la population fonctionnelle (bactéries dénitrifiantes).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les techniques développées dans le cadre de ce travail nous ont permis de mettre en évidence les effets des modifications environnementales sur la diversité et l'activité des communautés bactériennes selon les environnements considérés (sol, fractions de sol). La réponse des bactéries dépend aussi bien du type de litière que de l'habitat dans lequel elles résident. Ces travaux montrent que, contrairement aux stocks organiques, le fonctionnement microbiologique des sols ferrugineux sableux est sensible aux pratiques agricoles. Il est donc essentiel d'appliquer des usages qui puissent favoriser l'expression de leur potentiel biologique

L'effet bénéfique de la plantation à *Andropogon gayanus* dans les jeunes jachères par rapport à *Acacia holosericea* est aussi vérifié. En dépit des quantités de matière organique faible enregistrées, la plantation à *Andropogon* présente une forte activité minéralisatrice et une plus grande résistance aux contraintes environnementales.

Plusieurs perspectives sont à envisager suite à ce travail. Tout d'abord la suite et fin du séquençage des clones appartenant aux familles RFLP. De plus il serait intéressant de poursuivre cette étude en essayant de déterminer quand et comment les gènes de la dénitrification sont exprimés dans ces communautés (étude des ARNm et/ou des protéines).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbadie L. and Lensi R. (1990). Carbon and Nitrogen mineralization and denitrification in a humid savanna of West Africa. *Acta Oecologica* 11, 717-728.
- Agbogba, C. & Roy-Noel, M. (1982). L'attaque des arbres par les termites dans la presqu'île du Cap-Vert (Sénégal). III. Cas du parc forestier de Dakar-Hann sur sables ogoliens, Bulletin de l'IFAN, n° 44 : pp. 342-364.
- Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Angers, D.A. & Mehuys, G.R. (1988). Effects of cropping on macro-aggregation of a marine clay soil. *Can.J. Soil Sci.* **68** : 723-732.
- Arpin, P., Kilbertus, G., Ponge, J. F. & Vannier, G. (1980). Importance de la microflore et de la microfaune en milieu forestier. In : « Actualités d'écologie forestière. Sol, flore, faune » P. Pesson *ed.*, Gauthier Villars, Paris : 87-150.
- Atlas R.M., Horowitz A., Krichevsky M., Bej A.K. (1991). Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb Ecol* 22 : 249-256.
- Babich, H. and Stotzky, G. (1983). Developing standards for environmental toxicants : the need to consider abiotic environmental factors and microbe-mediated ecologic processes. *Environ. Health Persp.* 49 : 247-260.
- Baldock, J.A. & Kay, B.D. (1987). Influence of cropping history and chemical treatments on the water-stable aggregation of a silt loam soil. *Can. J. Soil Sci.* **67** : 501-511.
- Bardgett, R.D. & Griffiths, B. S. (1997). Ecology and Biology of soil Protozoa, Nematodes, and Microarthropods. In : Van Elsas J.D., Trevors J.T. & Wellington E.M.H. (eds) *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 129-163.
- Beare, M. H., Coleman, D. C., Crossley D.R., Hendrix P.F. & Odum, E.P. (1995). A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biochemical cycling , p 5-22. In H.P. Collins, G.P. Roberston and M.J. Klug (Eds), *The significance and regulation of soil biodiversity*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Beare, M. h., Hendrix, P.F., & Coleman, D.C. (1994). Water-stable aggregates and organic matter fractions in conventional and no-tillage soils. *Soil Science Society of American Journal* **58** : 777-786.
- Becker, M. ; Johnson, D.E. ; Segda, Z. 1996. The role of legume fallows in intensified upland rice-based cropping systems. *Dans Proceedings, 7th International Conference of the African Association of Biological Nitrogen Fixation*, 2-7 Sept 1996, Yamoussokro, Côte d'Ivoire.
- Berger, A. (1992). Le climat de la terre : un passé pour quel avenir ?. De Boeck-Wesmael (ed.), Bruxelles.

- Bertrand, R., (1972). Morphopédologie et orientations culturelles des régions soudanaises du Sine-Saloum. Cartes (1/100.000). L'agronomie tropicale. 27 : 1116-1119.
- Bijay-Singh, J.C., Ryden, J.C., Whitehead, D.C. (1989). Denitrification potential and actual rates of denitrification in soils under long-term grassland and arable cropping. *Soil Biology & Biochemistry* 21(7), 897-901.
- Bloem J., Ruiter P.C.D., Koopman G.J., Lebbink G., Brussaard L. (1992). Microbial numbers and activity in dried and rewetted arable soil under integrated and conventional management. *Soil Biol. Biochem.* 24 : 655-665.
- Bossio D.A., Scow K. M., Gunapala N., Graham K.J. (1998). Determinants of soil microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 : 4043-4050.
- Bothe, H., Jost, G., Schlöter, M., Ward, B.B. & Witzel, K.P. (2000). Molecular analysis of Ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 673-690.
- Boufalas, A. and Pellissier, F., 1994.- Allelopathic effects of phenolic mixtures on the respiration of two spruce mycorrhizal fungi. *J. Chem. Ecol.*, 20, 9, 2283-2289.
- Bouwman, A.F. (1990). Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere, In : Soils and the greenhouse effect. A. F. Bouwman, éd. Wiley, Chichester, England. pp. 61-127.
- Broughton, L.C. & Gross, K.L. (2000). Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia* 125 : 420-427.
- Bruns, M.A., Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Prosser, J.I., and Paul, E.A. (1999). Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 2994-3000.
- Buckley, D.H., Schmidt, T.M. (2001). The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* 42, 1, 11-21.
- Bulgen & Dieng, A. (1997). *Andropogon gayanus* var. *bisquamulatus*- une culture fourragère pour les régions tropicales. Presses Agronomiques de Gembloux, pp. 171.
- Cellier, P., Germon, J.C., Hérault, C. & Genermont, S. (1997). Les émissions d'ammoniac (NH₃) et d'oxydes d'azotes (NO et N₂O) par les sols cultivés : mécanismes de production et quantification des flux. Maîtrise de l'azote dans les agrosystèmes. Reims (France). INRA (ed.). Les colloques, n° 23 : 19-20.
- Charreau C. et Nicou R., 1971- L'amélioration du profil cultural dans les sols sableux et sablo-argileux de la zone tropicale sèche ouest-africaine et ses incidences agronomiques. *Agron. Trop.*, 2, 9-11
- Chastrusse, C. (1998). Localisation et diversité des bactéries cellulolytiques lors d'un cycle de dessiccation/réhumectation. *DEA, UCBL*, 25p.

- Cheneby, D., Phillipot, L., Hartmann, A., Hérault, C. & Germon, J.C. (2000). 16S rDNA analysis for characterisation of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbial. Ecol.* **34**, 121-128.
- Chopart, J.L. 1984. Soil erosion and control methods for upland rice cropping systems: some West African examples. *Dans* International Rice Research Institute (dir.), An overview of upland rice research: proceedings of an upland rice workshop, 1982, Bouaké, Côte d'Ivoire. International Rice Research Institute, Los Banos (Philippines). p. 479-491.
- Chotte, J. L., Villemin, G., Guilloire, P. & Monrozier, L. J. (1994). Morphological aspects of microorganism habitats in a vertisol. In *Soil Micromorphology : Studies in Management and Genesis*, A. J. Ringrose-Voase and G. S. Humphreys (Eds), Proc. IX Int. Working Meeting on Soil Micromorphology, Townsville, Australia, July 1992. *Developpement in Soil Science* 22, Elsevier, Amsterdam, pp 395-403.
- Chotte, J.L., Ladd, J.N. and Amato, M. (1998). Sites of microbial assimilation and turnover of ¹⁴C soluble and particulate substrates decomposing in a clay soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 2, 205-218.
- Chotte, J.L., Masse, D., Pontanier, R. & Berlier, G. (1997). « Transformation, durant la jachère, de l'horizon superficiel (0-10cm) d'un sol ferrugineux du bassin arachidier sénégalais (Thyssé Kaymor) » in Floret & Pontanier (éd., 1997) : pp. 41-46.
- Colotelo, N. (1973). *Can. J. Microbiol.*, 19 (1), 73-79.
- Darbyshire, J.F., Chapman, S.J., Cheshire, M.V., Gauld, J.H., Mac Hardy, W.J., Paterson, E. and Vaughan, D. (1993). Methods for the study of interrelationships between microorganisms and soil structure. *Geoderma* 56, 3-23.
- Davet, P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. Mieux comprendre, INRA, Paris. 383 p.
- Diatta, M. (1994). Mise en défens et techniques agroforestières au Sine Saloum (Sénégal). Effet sur la conservation de l'eau, du sol et sur la production primaire. *Thèse de doctorat. Université de Strasbourg I*. 202 pages.
- Dickinson, R.E. and Cicerone, R.J. (1996). Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* **319**, 109-115.
- Diem, H.G., (1973). Recherches sur la phyllosphère de l'orge. *Thèse de doctorat d'état, Université de Nancy I*, 142 p.
- Djigal, D. (2003). Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effets sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. *Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop*. Dakar. 131 p.
- Dommergues, Y. ; Ganry, F. 1991. Comment accroître l'apport d'azote par fixation biologique. *Dans* Savanes d'Afrique, terres fertiles ? Comment produire plus et de

- façon durable en zone de savanes au sud du Sahara. Actes des rencontres internationales, 10–14 décembre 1990, Montpellier (France).
- Duarte G.F., Rosado A.S., Seldin L., Keijzer-Wolters A.C., Van Elsas J.D. (1998). Extraction of ribosome and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *J Microbiol Methods*, 32 : 21-29.
- Duchaufour, PH. (1991). Sol, végétation, environnement. *Abrégé de pédologie, Paris, Masson*, 3^{ème} édition : 35-101.
- Duineveld, B.M., Rosado, A.S., van Elsas, J.D., and van Veen, J.A. (1998). Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Appl. Environ. Microbial.* **64** : 4950-4957.
- Elliot, E.T. (1986). Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorus in native and cultivated soils. *Soil Science Society of American Journal*. 50 : 627-633.
- Elliot, E.T., Coleman, D.C., (1988). Let the soil work for us. *Ecol. Bull.*, **39** : 23-32.
- Feller C., Lavelle P., Albrecht A. et Nicolardot B., 1993 – La jachère et le fonctionnement des sols tropicaux : rôle de l'activité biologique et des matières organiques. Quelques éléments de réflexion. Dans : C. Floret et G. Serpantié (Eds), *La jachère en Afrique de l'Ouest*, Collection Colloques et Séminaires. ORSTOM, 15-32, Paris.
- Ferguson, S. J., (1994). Denitrification and its control. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **66**, 89-110.
- Floret, C., Pontanier, R., Serpantié, G., (1993). La jachère en Afrique Tropicale. Dossier MAB n° 16, UNESCO, Paris, France, 86 p.
- Foster, R.C., (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of soils* **6**, 189-203.
- Foster, R.C., (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* **6**, 189-203.
- Gillier P., 1960- La reconstitution et le maintien de la fertilité des sols du Sénégal et le problème des jachères. *Oléagineux*, 15 (8-9), 637-643 et 15 (10), 699-704.
- Gobat, J. M., Aragno M. & Matthey, W. (1998). Le sol vivant. Press polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, Suisse.
- Gregorich, E.G., Kachanoski, R.G., & Voroney, R.P. (1989). Carbon mineralization in soil size fractions after various amounts of aggregate disruption. *Journal of Soil Science* **40** : 649-659.
- Griffiths, B.S., Welschen, R., Van Arendonk, J.J.C.M. & Lambers, H. (1992). The effect of nitrate-nitrogen supply on bacteria and bacterial-feeding fauna in the rhizosphere of different grass species. *Oecologia* **91**, 251-259.
- Grouzis, M., Alberger, J., 1989- Du risque climatique à la contrainte écologique : incidence de la sécheresse sur les productions végétales et le milieu au Burkina Faso. In *Le risque*

- en agriculture, M. Eldin, P. Milleville *éds*, Orstom Paris, Coll. A travers champs, 243-254
- Gunapala, N., Venette, R. C., Ferris, H., and Scow, K. M. 1998. Effects of soil management history on the rate of organic matter decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1917-1927.
- Hart, P.B.S., August, J.A., Row, C.W. and Julian, J.F. (1988). Some biochemical and physical properties of Tokomaru silt loam under pasture and after 10 years of cereal cropping. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **31**, 77-86.
- Hattori, T. (1988). Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Biology and Fertility of soils.* 6 : 189-203.
- Hauck, R.D. (1981). Nitrogen fertilizer effects in nitrogen cycle process. In : Terrestrial nitrogen cycles. F.E. Clarkland, T. Roswal (ed). *Ecol. Bull.* 33. Swedish Natural Science Research Council, Stockholm. pp. 551-562.
- Hauck, R.D. (1988). A human ecosphere perspectives of agricultural nitrogen cycling. In : Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems. J.R. Wilson, Ed. *C.A.B International*, Oxon, G.B. pp.3-19.
- Hawksworth, D.L. & Mound, (1991). Biodiversity databases : the crucial significance of collections. In Hawksworth D.L. (ed) The biodiversity of microorganisms and invertebrates : its role in sustainable agriculture. CAB International. Wallington, UK. 17-29.
- Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res* 95, 641-655.
- Heal, O.W. & Dighton, J. 1985. Resource quality and trophic structure in soil system. In: A.H. Fitter ed., *Ecological Interactions in Soil*, Blackwell Scientific Publ. pp. 339-354.
- Henin, S., (1976). Cours de physique du sol. Volume 1 : Texture-Structure-Aération. Orstom, n°28.
- Hien V., Sedogo M.P. et Lompo F., 1993- Etude des effets des jachères de courte durée sur la production et l'évolution des sols dans différents systèmes de culture au Burkina Faso. Dans : C. Floret et G. Serpantié (Eds), *La jachère en Afrique de l'Ouest*, Collection Colloques et Séminaires. ORSTOM, Paris, 221-232.
- Hien, V. ; Sedogo, P.M. ; Lompo, F. 1993. Étude des effets de jachères de courte durée sur la production et l'évolution des sols dans différents systèmes de culture du Burkina Faso. Dans Floret, C. ; Serpantié, G. (dir.), *La jachère en Afrique de l'Ouest*. Éditions de l'Orstom, Paris (France). Colloques et séminaires. p. 171–178.
- Hoefsloot H., Van der Pol F. & Roeleveld L. (1993). *Jachères améliorées. Options pour le développement des systèmes de production en Afrique de l'ouest*, Amsterdam (The Netherlands), Kit Press, Bulletin 333, 87 p.
- Hooper, D.U., Bignell, D.E., Brown, V.K., Brussaard, L., Dangerfield, J.M., Wall, D.H., Wardle, D.A., Coleman, D.C., Giller, K.E., P. Lavelle, P., van der Putten, W.H., de

- Ruiter, P.C., Rusek, J., Silver, W., Tiedje, J.M. and Wolters, V. (2000). Interactions between above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Patterns, mechanisms, and feedbacks. *BioScience* 50 : 1049-1061.
- Jensen M, Webster J, and Strauss N (1993). Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 945–952.
- Kabir, M.D.M, Chotte, J.L., Rahma, M., Bally, R. & Jocteur Monrozier, L. (1994). Distribution of soil fraction and location of soil bacteria in a vertisol under cultivation and perennial grass. *Plant and Soil*, 163 : 243-255.
- Kilbertus, G., Proth, J. & Mangenot, F. (1979b). Variations saisonnières de la microflore d'un sol forestier. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **130 B** : 63-77.
- Ladd, J. N., Amato, N., and Butler, J. H. 1985. Decomposition of plant material in Australian soils. I. The effect of quantity added on decomposition and on residual microbial biomass. *Aust. J. Soil. Res* 21: 563-570.
- Ladd, J.N., Jocteur Monrozier, L., Amato, M. (1992). Carbon turnover and nitrogen transformations in an Alfisol and Vertisol amended with (U-¹⁴C) glucose and (¹⁵N) ammonium sulfate. *Soil Biology and Biochemistry*, 24 : 359-371.
- Lavelle, P. & Spain, A.V. (2001). *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 654 p.
- Lavelle, P., Blanchard, E., Martin, A., Spain, A. & Martin, S. (1992). Impact of soil fauna on the properties of soils in the humid tropic. In : *Myths and Science of Soil of the Tropics*, R. Lal and P.A. Sanchez (Ed). SSSA Special Publication n° 29.
- Lensi, R., Clays-Josserand, A. and Jocteur Monrozier, L. (1995). Denitrifiers and denitrifying in size fractions of a mollisol under permanent pasture or continuous cultivation. *Soil Biology and Biochemistry* 27 : 61-69.
- Lensi, R., Lescure, C., Clays-Josserand, A. and Gourbière, F. (1991). Spatial distribution of nitrification and denitrification in an acid forest soil. *Forest Ecology and Management* **44**, 29-40.
- Linden, B., Lyngstad, I., Sippola, J., Soegaard, K., and Kjellerup, V. 1992. Nitrogen mineralization during the growing season. 2. Influence of soil organic matter content, and effect on optimum nitrogen fertilization of spring barley. *Swedish Journal of Agricultural Research* 22: 49-60.
- Mahne, I. & Tiedje, J.M., (1995). Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1110-1115.
- Manlay, R. & Masse, D. (1994). Influence du temps de jachère sur la caractérisation physico-chimique de la matière organique du sol (Sénégal). Rapport scientifique. Raccourcissement du temps de jachère, biodiversité et développement durable en Afrique Centrale (Cameroun) et en Afrique de l'Ouest (Sénégal, Mali). ORSTOM. 17-22.

- Manlay, R., Masse, D., Diatta, M., Kaïré, M., (1997). Ressources organiques et gestion de la fertilité du sol sur un terroir agro-pastoral de Casamance (Sénégal). Actes de l'atelier « Jachère et maintien de la fertilité », Bamako, Mali, ORSTOM, pp 1-16.
- Marshall, K.C. (1971). Sorptive interactions between soil particles and microorganisms. In *Soil Biochemistry 2* (A.D. McLaren and J. Skujins, Eds). pp. 409-445. Dekker, New-York.
- Masse, D., Cadet, P., Chotte, J.L., Diatta, M., Floret, Chr., Ndiaye-Faye, N., Pate, E., Pontanier, R., Thioulouse, J., Villenave, C. (1998). « L'exploitation des jachères naturelles : un facteur compromettant son influence sur la restauration de la fertilité du milieu semi-aride au Sénégal », *Agriculture et Développement*, n°18 : pp. 31-38.
- Monnier, G. & Bui Huu Tri, (1971). Une méthode d'excavation de la taille des éléments structuraux du sol. *Sciences du sol*, 2 : 17-27.
- Monrozier, L. J., Ladd, J.N., Fitzpatrick, R.W., Foster, R.C. & Raupach, M. (1991). Components and microbial content of size fractions in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* **49** : 37-62
- Mosier, A.R., Duxbury, J.M., Freney, J.R., Heinemeyer, B. & Minami, K. (1996). Nitrous oxides from agricultural field : assessment, measurement and mitigation. *Plant Soil* **181**, 95-108.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 : 335-350.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **73**, 127-141.
- Muyzer, G., Waal, E.C.D., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S Rrna. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Ndour, N.Y.B. (2003). Caractérisation des habitats microbiens d'un sol ferrugineux tropical (Sénégal) : Effets des modes de gestion de la jachère et de la culture. *Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop*. Dakar.
- Nusslein, K. and Tiedje, J.M. (1999). Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbial.* **65** : 3622-3626.
- Oades, J.M. (1992). The role of biology in the formation, stabilisation and degradation of soil structure. *Geoderma* 56 : 377-400.
- Oades, J.M., (1988). The retention of organicmatter in soil. *Biogeochemistry*. 5 : 35-70.

- Otte, S., Grobбен, N.G., Robertson, L.A., Jetten, M.S. M. & Kuenen, J.G. (1996). Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2421-2426.
- Ouattara, B., Serpantié, G., Ouattara, K., Hien, V., Lompo, T. & Bilgo, A. (1997). « Etats physico-chimiques des sols cultivables en zone cotonnière du Burkina Faso. Effets de l'histoire culturale et du type de milieu », in Floret & Pontanier (éd., 1997).
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F.L. and 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 Rna. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3367-3373.
- Pate, E., (1999). Analyse spatio-temporelle des peuplements de nématodes du sol dans les systèmes de culture à jachères au Sénégal. *Doctorat de 3^{ème} cycle, Université de Lyon*. 210 pages.
- Paul, E.A. & Clark, F.E. (1989). Soil Microbiology and Biochemistry. *Academic Press, London*.
- Perry, D.A., Amaranthus, M.P., Borchers, J.G., Borchers, S.L. & Brainerd, R.E. (1989). Bootstrapping in ecosystems. *Bioscience* **39** (4), 230-237.
- Philippot, L., Piutti, S., Martin-Laurent, F., Hallet, S., and Germon, J.C. 2002. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** (12) : 6121-6128.
- Phillipot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA.)*, **1577** : 355-376.
- Piéri, C. (1989). Fertilité des terres de savane. Bilan de trente ans de recherche et de développement agricoles au sud du Sahara. Ministère de la coopération – CIRAD-IRAT, Paris. 444p.
- Porteous, L.A., Seidler, R.J. & Watrud, L.S. (1997). An improved method for purifying DNA from soil for PCR amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology* **6**, 787-791.
- Powers, R. F. 1989. Maintaining long-term forest productivity in the Pacific Northwest: defining the issues. 3-16 in DA Perry, R Meurisse, B Thomas, R Miller, J Boyle, J Means, CR Perry and RF Powers, eds. Maintaining the long term productivity of Pacific Northwest forest ecosystems. Timber Press, Portland, Oregon.
- Prosser, J.I. (1986). Nitrification. IRL PRESS, Oxford, 217 p.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbière, F., Thioulouse, J. & Nazaret, S. (2000). Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprint approach (RISA). *Microbiol. Ecol.* **39**, 263-272.

- Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur Monrozier, L. & Nazaret, S. (1997). Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell locations. *FEMS Microbiology Ecology*. 24 : 321-331.
- Raquet, K. 1991. Production d'engrais verts à partir de jachères arbustives à croissance rapide en région montagneuse tropicale du Rwanda. Dans Kotschi, J. (dir.), *Pratiques d'agriculture écologique pour petites exploitations tropicales / GTZ. Margraf, Weikersheim (Allemagne).* 207 p.
- Reisinger, O. & Kilbertus, G. (1973). *Soil Biol. Biochem.*, 5, 187-192.
- Roose E., 1993- Capacité des jachères à restaurer la fertilité des sols pauvres en zone soudano-sahélienne d'Afrique Occidentale.
- Sall, S.N., Masse, D., Bernhard-Reversat, F., Guissé, A., Chotte, J.L. (2003). Microbial activities during the early stage of laboratory decomposition of tropical leaf litters : the effect of interactions between litter quality and exogenous inorganic nitrogen. *Biology and Fertility of Soils* 39 : 103-111.
- Sebillotte, M. (1990). Conclusion Système de culture, un concept opératoire pour les agronomes. In « Les systèmes de culture », L. Combe et D. Picard coord. INRA édit. pp.165-196
- Seech, A.G. and Beauchamp, E.G. (1988). Denitrification in soil aggregates of different sizes. *Soil Science of American Journal* 52, 1616-1621.
- Serpantié, G. & Floret, C., (1994). Un mode de gestion des ressources en Afrique tropicale : la jachère longue. Regards différenciés sur une pratique en crise. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture*. Fr., 80, n°8, pp. 73-85.
- Serpantié, G. & Somé, N.A. (1998). « Effets de la jachère longue à Andropogonées sur la structure du sol et recherches sur son raccourcissement. Premiers résultats d'essais à Bondouky », in *Actes du 2^e FRSIT*, avr. 1998, Ouagadougou, C.N.R.S.T.
- Sexstone, A.J., Parkin, T.B. and Tiedje, J.M. (1988). Denitrification response to soil wetting in aggregated and unaggregated soil. *Soil Biology & Biochemistry* 20, 767-769.
- Sexstone, A.J., Revsbech, N.P., Parkin, T., Tiedje, J.M. (1985). Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil clods. *Soil Science Society of America Journal*, 49, 645-651.
- Simpson, E.H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163 : 668
- Some, N.A., (1994). Rôle de la jachère dans l'amélioration de la fertilité des sols en zone soudanienne : dynamique de la végétation et évolution des caractères pédologiques. Résultats préliminaires. Dans : *Systèmes agraires et agriculture durable en zone sub-sahélienne*. Ed. IFS, 219-235.
- Talineau, J.C., Bonzon, B., Fillonneau, C., Hainnaux, G., Picard, D. & Sicot, M. (1976). « Quelques conséquences agronomiques de l'introduction d'une sole fourragère dans une succession culturale du milieu tropical humide de la Côte d'Ivoire », *cah. Orstom, sér. Biol.*, vol.XI, n° 4 : pp. 277-290.

- Tate, R.L. (1995). Soil microbiology. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. USA. 398 p.
- Theng, B.K.G. (1987). Clay-humic interactions and soil aggregate stability. In : *P. Rengasamy (ed), Soil structure and aggregate stability*. Seminar Proceedings. Institute of Irrigation and Salinity Research, Tatura, Australia. pp.32-73.
- Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reductase to ammonium. In : *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J.B. Zehnder (ed). John Wiley and sons, Inc., New-York, N.Y., pp. 179-244.
- Torsvik V., Goksoyr J., Dall F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbial.*, 56 : 782-787.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L., Sørheim, R., Michalsen, J., Salte, K. (1994). Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In : Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E., (Eds.) *Beyond the biomass*, Wiley, Chichester, pp.39-48.
- Valentin, C., Chevalier, P., Fritsh, E. & Janeau, J.L. (1990). « Le fonctionnement hydrodynamique aux échelles ponctuelles ». in Valentin (éd., 1990) : pp. 147-163.
- Waibel, A.E., Peter, T., Carslaw, K.S., Oelhaf, H., Wetzel, G., Crutzen, P.J., Poschl, U., Tsias, A., Reimer, E. & Fisher, H. (1999). Arctic ozone loss due to denitrification. *Science*. **283**, 2064-2069.
- Watson, C.J., Jordan, C., Taggart, P.J., Laidlaw, A.S., Garret, M.K. & Steen, R.W.J. (1992). The leaky N-cycle on grazed grassland. *Asp. Appl. Biol.* **30**, 215-222.
- Wolters, V., Silver, W.L., Bignell, D.E., Coleman, D.C., Lavelle, P., van der Putten, W.H., de Ruiter, P., Rusek, J., Wall, D.H., Wardle, D.A., Brussaard, L., Dangerfield, J.M., Brown, V.K., Giller, K., Hooper, D.U., Sala, O., Tiedje, J. & van Veen, J.A. (2000). Effects of global changes on above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: implications for ecosystem functioning. *BioScience* 50:1089-1098.
- Wood, T. G. (1988). Termites and the soil environment. *Biology and Fertility of soil* 6, 228-236.
- Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**, 533-616.
- Zumft, W.G., Dreusch, A., Löchelt, S., Cuypers, H., Friedrich, B. & Schneider, B. (1992). Derived amino acid sequences of the *nosZ* gene (respiratory N₂O reductase) from *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas stutzeri* reveal potential copper-binding residues. Implications for the Cu_A site of N₂O reductase and cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.* **208**, 31-40.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Extraction d'ADN du sol

L'extraction est pratiquée sur un échantillon de sol sec broyé et tamisé à 0,2 mm.

Lyse physique : 0,5g de sol est mis en présence de billes de zirconium stériles (0,1mm) et de 1 ml de tampon de lyse (NaCl 0,25M et EDTA 0,1M, pH8) filtré et stérilisé. On alterne 2 fois 2 min de lyse physique à l'aide du beadbeater (25 tours/sec) et 2 min d'incubation au bain-marie à 65°C. L'échantillon est ensuite centrifugé 15 min à 13000g à 4°C et l'on récupère le surnageant.

Précipitation : L'ADN est précipité avec de l'acétate de potassium 5M (75µl) auquel on ajoute 250µL de PEG 8000 à 40%, qui permet d'alourdir l'ADN (les volumes indiqués sont pour 600µl de surnageant), pendant au moins 1 heure à -20°C. L'échantillon est ensuite centrifugé 15 minutes à 4°C à 13000g.

Purification CTAB : On jette le surnageant et l'on ajoute au culot 600µl de CTAB 2% (1,4M NaCl ; 0,1M EDTA ; 2% CTAB). On laisse incuber à 65°C en mélangeant toutes les deux jusqu'à ce que tout le culot soit en suspension. Le CTAB fait précipiter les polysaccharides

Extraction : On ajoute 600µl de chloroforme ; après agitation du mélange, on sépare les phases par une centrifugation à 13000g pendant 10 min et à température ambiante. Ainsi on distingue une phase aqueuse surnageante contenant les acides nucléiques en solution, une phase organique au fond du tube et à l'interface un « gâteau » de protéines précipitées. On recueille la phase aqueuse.

Précipitation : L'ADN est précipité par 600µl d'isopropanol : on mélange et on laisse incuber 15 min à -20°C. L'échantillon est ensuite centrifugé 15 min à 13000g.

Pré-purification : On jette le surnageant, le culot est remis en suspension par 450µl d'acétate d'ammonium (2,5M) , et on ajoute 1 ml d'éthanol à 95°C. On laisse précipiter 15 min à -20°C puis on centrifuge (15 min à 13000 g).

Lavage : On ajoute 0,5 ml d'éthanol à 70°C et l'on centrifuge de nouveau à 13000g pendant 5 min. On jette le surnageant et on évapore le culot sous vide .

Récupération ADN : L'ADN extrait est resuspendu dans un volume de 10 à 50 µL de tampon TE 1X suivant la taille du culot d'ADN obtenu. L'ADN est enfin conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Quantification de l'ADN

Il s'agit de connaître la concentration en ADN d'un échantillon, afin de déterminer quelle quantité apporter pour la PCR.

Sur un gel d'agarose 1%, on fait migrer 5µl d'échantillon mélangés à 3µl de bleu de charge ainsi que 10µl de chacun des gammes-étalons. Les gammes-étalons sont les suivantes :

G1 : 6,25 ng d'ADN dans 10µL

G1 : 12,5 ng d'ADN dans 10µl

G2 : 25 ng d'ADN dans 10µl

G3 : 50 ng d'ADN dans 10µl

G4 : 100 ng d'ADN dans 10µl

G5 : 200 ng d'ADN dans 10µl

La concentration en ADN de nos extraits est ensuite déterminée grâce au logiciel Molecular Analyses après coloration du gel au BET.

Préparation des solutions d'extraction d'ADN

Tampon de lyse stérile : 0,25M NaCl ; 0,1M EDTA ; pH8

Peser 1,461g de NaCl (MM= 58,44) et ajouter 20mL d'EDTA à 0,5M pH8 (ou peser 3,722g d'EDTA et ajuster le pH à 8)

Compléter à 100mL avec de l'eau déminéralisée.

Filtrer à 0,2µm et mettre à l'autoclave.

Conserver à 4°C

CTAB 2% : 1,4M NaCl ; 0,1M EDTA ; 2% CTAB

Peser 8,18g de NaCl et 3,722g d'EDTA, dissoudre

Compléter à 100mL

Filtrer à 0,2µm

Ajouter 2g de CTAB

Mettre à l'autoclave

Conserver à température ambiante.

PEG 8000 à 40%

Peser 10g de PEG

Ajouter environ 10mL d'eau très progressivement car le volume augmente quand le CTAB se dissout.

Compléter à 25mL

Conserver à 4°C.

Acétate de potassium 5M

Peser 49,07 g de KAc (MM=98,14), dissoudre

Compléter à 100mL

Filtrer à 0,2µm

Conserver à 4°C

Acétate d'ammonium 2,5M

Peser 19,27 g de NH₄Ac (MM=77,08), dissoudre

Compléter à 100mL

Filtrer à 0,2µm

Conserver à 4°C.

TE (Tris-EDTA) 1X

Tris-HCl 10mM

EDTA 1mM

Ajuster à pH 8,5

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic

PEG: PolyEthylene Glycol

CTAB: Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide

ANNEXE 2 : Composition des autres solutions utilisées

Bleu de charge 10X

Bleu de bromophénol	0.25 % (p/v)
Glycérol	30 %
EDTA	10 mM
H ₂ O	qsp
À utiliser au 1/10 ^{ème}	

Tampon TBE (Tris-borate) 10X

Tris-base	121 g
Na ₂ EDTA, H ₂ O	7,44 g
Acide borique	55 g
H ₂ O	qsp 1 litre
Filtrer, mettre à l'autoclave	

Tampon TAE 50X

Tris-base	242,2 g
Na ₂ EDTA (pH 8)	18,51 g
Acide acétique glacial	57,1 ml
H ₂ O	qsp 1 litre

Solutions pour gel à 8 % d'acrylamide/Bis-acrylamide 40 %

Réactifs	Dénaturants	
Gradients	45 %	70 %
40 % acrylamide/bis	20 ml	20 ml
TAE 50X (ml)	2 ml	2 ml
Formamide (ml)	18 ml	28 ml
Urée (g)	18,9 g	29,4 g
Glycérol	2 %	2 %
Qsp H ₂ O	100 ml	

IPTG (25 mg/ml)

IPTG	24 mg
H ₂ O qsp	1 ml
Filtrer sur membrane 0,2 µm et conserver à -20°C	
C'est un inducteur non métabolisable de l'opéron lactose.	

X-Gal

X-Gal 20 mg

Diméthylformamide qsp 1 ml

Filtrer sur membrane 0,2 µm et conserver à -20°C.

C'est un galactoside dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β galactosidase.

BET (Bromure d'éthidium)

:

Solution à utiliser à 1 mg dans 1 litre (à protéger de la lumière, à conserver à 4°C et à manipuler impérativement avec des gants).

Ce colorant (fluorochrome) a la propriété de s'insérer entre les bases et d'apparaître par fluorescence quand il est soumis aux UV.

Composition de la Taq ready-to-go pour 25µl de volume final

Taq DNA polymerase	2.5U
dNTP	200 µM
Tris-HCl	10 mM, pH 9
KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
BSA	

ANNEXE 3 : Extraction-purification d'ADN au QIAquick

- 1) Sous une lampe UV, la bande d'ADN d'intérêt est découpée au scalpel, et introduite dans un tube eppendorf pesé au préalable. Le tube plein est pesé à nouveau. La purification est ensuite effectuée grâce à un kit (QIAquick Agarose Gel Extraction Kit, QIAGEN, France)
- 2) Pour 100 mg de gel, ajouter 300µl de tampon QG
- 3) Incuber 10 minutes au bain marie à 50°C. Pour aider à dissoudre, vortexer toutes les 2 minutes
- 4) Après dissolution complète du gel, vérifier que la couleur de la mixture est jaune
- 5) Centrifuger la mixture 1 minute après l'avoir versé dans les colonnes. Jeter le surnageant
- 6) Laver le culot deux fois avec 750µl de tampon PE, afin d'éliminer les sels contaminants. Centrifuger 1 minute à 13000 rpm.
- 7) Pour éluer l'ADN, ajouter 15 µl d'EB au centre de la membrane de la colonne. Incuber 1 minute à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 13000rpm.
- 8) Recueillir le filtrat contenant l'ADN purifié dans un nouveau tube eppendorf.

ANNEXE 4 : MILIEUX DE CULTURE

Luria Bertani (LB) - Agar

Bacto-tryptone	10 g	
Extrait de levure	5 g	
NaCl		5 g
H ₂ O		qsp 1litre

Ajuster pH à 7 et ajouter 15 g d'agar-agar
Autoclaver et couler dans les boîtes de pétri en conditions stériles.

S.O.C

Pour 100 ml : Bacto-tryptone		2 g
Extrait de levure	0,5 g	
NaCl 1M	1 ml	
KCl 1M	0,25 ml	

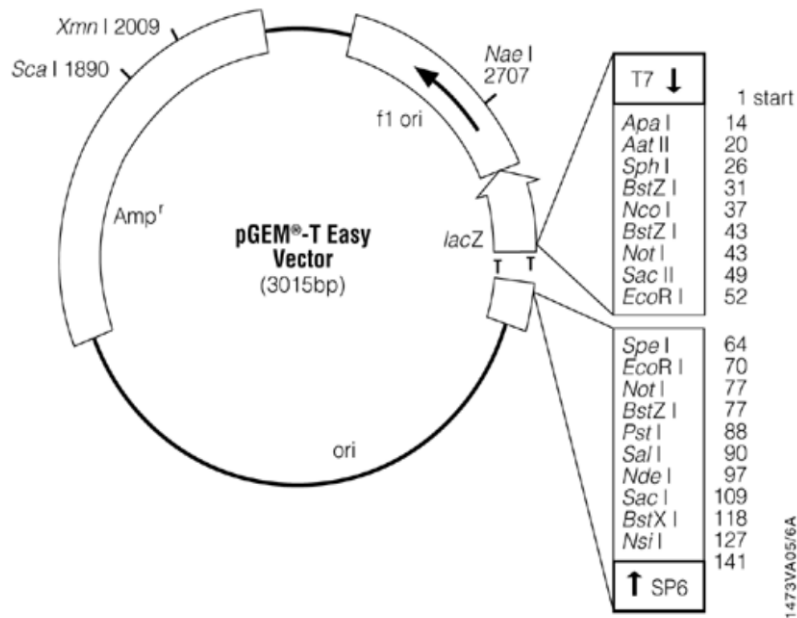
Ajuster pH:7 et après autoclavage, ajouter :

Mg ²⁺ 2M (1M MgCl ₂ -6H ₂ O +1M MgSO ₄ – 7H ₂ O, filtré)	1 ml
Glucose 2M	1 ml

Conservation à –20°C.

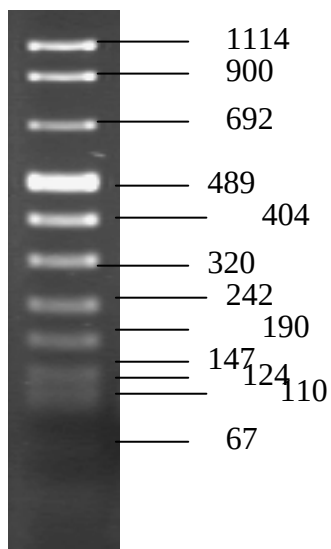
ANNEXE 5

Carte du vecteur pGEM-T Easy vector (Promega)



Marqueurs de taille

VIII



LEON

