

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE



INFLUENCE D'*ACACIA SENEGAL* (L.) Willd SUR LES  
PROPRIETES PHYSIQUES, CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES  
DES SOLS

Mémoire présenté et soutenu publiquement le 10 juillet 2010  
au Département de Biologie végétale pour l'obtention du

**DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES (D.E.A)  
DE BIOLOGIE VEGETALE**

Option : **Écologie**

par

**Ndiaga SAMB**

**Maître ès sciences**

<b>Président</b> : M.	Aliou	<b>GUISSE</b>	Maître de conférences	UCAD
<b>Membres</b> : M.	Léonard Elie	<b>AKPO</b>	Professeur	UCAD
	Komi	<b>ASSIGBETSE</b>	Ingénieur de Recherches	IRD
	Dominique	<b>MASSE</b>	Ingénieur de Recherches	IRD
	Fary	<b>DIOME</b>	Maître Assistant	IST/UCAD

## **DEDICACES**

**Je dédie ce travail :**

A feu mon père, ma chère mère (que la terre lui soit légère),

A mes parents pour leur investissement dans mon éducation,

Leurs conseils et soutiens inlassables. Chers

Parents Merci encore une fois.

## REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire d'Ecologie Microbienne des Sols et Agrosystèmes Tropicaux (LEMSAT) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Dakar. Au terme de ce travail, 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 M. Komi ASSIGBETSE pour m'avoir encadré tout le long de ce travail, guidé à travers la complexité de la biologie moléculaire du sol et surtout pour sa patience. Monsieur Komi ASSIGBETSE, s'est beaucoup investi dans le suivi et l'évaluation de ce travail depuis sa conception jusqu'à sa réalisation totale. Vos enseignements, votre compétence, votre rigueur scientifique, et votre disponibilité m'ont permis de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je vous remercie également pour vos conseils éclairés, et de m'avoir inculqué l'esprit et la rigueur scientifique.

J'adresse mes sincères remerciements :

A M. Léonard Elie AKPO, Professeur au département de Biologie Végétale. A travers sa personne, je remercie tous les enseignants du département de Biologie Végétale et de la faculté des Sciences et Techniques, pour leur contribution à ma formation.

J'exprime ma reconnaissance à M. Dominique MASSE (Directeur du LEMSAT), à M. Saïdou Nourou SALL, Mme Lydie CHAPUIS-LARDY, Mme NDOUR Yacine, M. Djibril DJIGAL, et M. Moussa DIENOR pour les soutiens qu'ils m'ont apportés. Je leur adresse ici mes remerciements chaleureux et ma profonde gratitude.

Je remercie M. Aliou GUISSSE, Maître de Conférences à l'UCAD et M. Fary DIOME, Maître Assistant à l'IST/UCAD d'avoir accepté de juger ce travail.

Aux camarades du DEA et Master II: Cheikh Moctar SYLLA, Pape Youssoupha GUEYE, Ahmadou GUEYE, Michel Norbert KOR, Sidy DIAKHATE, Isseu CISS, Ndiémé FALL et aux aînés thésards : Ndèye Hélène DIALLO, Thernio SOW et Abdoulaye BADIANE, je dis un grand merci pour leur amitié, leur complicité, leur sympathie et leurs conseils précieux.

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble du personnel du LEMSAT pour leur précieuse collaboration et sans qui cette expérience n'aurait jamais été pareille: Amadou Lamine DIENG, Mariama GUEYE, Amadou DIOP, Lamine SAGNA, Mme Pourmera GASSAMA, Maïmouna MBOUP SEYE, Moustapha SANE, Omar BA, Omar FAYE, Mahécor DIOUF, Mme Fatou GUEYE Saliou FAYE. Pour la joie et la bonne humeur permanente qui régnaient dans l'enceinte des locaux du centre IRD de Bel Air, je tiens également à remercier le personnel du LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques).

Enfin, que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail trouvent ici l'expression de mes remerciements chaleureux.

Ce travail a bénéficié de l'appui financier et matériel de l'Union Européenne dans le cadre du projet ACACIAGUM 032233.

# TABLES DES MATIERES

DEDICACES .....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	v
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	vii
Tableaux.....	viii
LISTE DES ANNEXES.....	viii
ABSTRACT:.....	ix
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>Chapitre1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	3
1.1 LE SOL.....	3
1.1.1 La phase solide.....	3
1.1.1.1 La fraction minérale.....	3
1.1.1.2 La fraction organique .....	3
1.1.1.2.1 La fraction organique inerte.....	3
1.1.1.2.2 La fraction organique vivante.....	4
a. Les microorganismes du sol .....	4
- Les bactéries.....	4
- Les champignons .....	5
b. La faune du sol.....	5
1.1.2 La phase liquide .....	5
1.1.3 La phase gazeuse.....	6
1.1.4 L'organisation du sol.....	6
1.1.4.1. La texture .....	6
1.1.4.2 structure .....	7
1.1.4.3 La porosité .....	8
1.1.5 Le fonctionnement du sol .....	8
1.1.5.1 Le cycle de l'azote.....	9
1.1.5.1.1 Fixation non symbiotique de l'azote moléculaire.....	9
1.1.5.1.2 L'ammonification .....	9
1.1.5.1.3 La nitrification .....	10
1.1.5.1.4 La dénitrification .....	10
1.1.6 Activités biologiques du sol.....	11
1.1.7 Structure génétique des communautés microbiennes.....	12
1.2 ACACIA SENEGAL .....	12
1.2.1. Introduction.....	12
1.2.2. Description botanique.....	13
1.2.3. Répartition et Habitat.....	14
1.2.4. Utilisations .....	14
<b>Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES</b> .....	15
2.1 MATERIEL .....	15
2.1.1 Présentation du site d'étude.....	15
2.1.2 Dispositif expérimental et échantillonnage .....	16
2.2 METHODES .....	16
2.2.1 Propriétés physiques du sol : La granulométrie.....	16
2.2.2 Propriétés chimiques du sol.....	17
2.2.2.1 pH du sol .....	17

2.2.2.2 Dosage du phosphore total.....	17
2.2.2.3 Dosage du carbone total et de l'azote total.....	17
2.2.2.4 Extraction des cations échangeables .....	17
2.2.3 Densité et activité microbiologique .....	18
2.2.3.1 Biomasse microbienne.....	18
2.2.3.2 Minéralisation du carbone .....	18
2.2.4 Structure génétique des communautés bactériennes totales et spécifiques.....	18
2.2.4.1 Extraction de l'ADN du sol.....	19
2.2.4.2 Etude de la structure des communautés bactérienne totale et fonctionnelles .....	19
2.2.4.2.1 La technique PCR (Polymerase Chain Reaction).....	19
a. Structure de la communauté bactérienne totale .....	21
b. Structure de la communauté bactérienne dénitrifiante.....	22
c. Structure de la communauté bactérienne nitrifiante.....	23
d. Structure des communautés diazotrophes .....	24
2.2.4.2.2. La DGGE (Gel Electrophorèse en Gradient de Dénaturation).....	26
2.2.5 Analyses statistiques .....	27
<b>Chapitre 3 RESULTATS.....</b>	<b>28</b>
3.1 PROPRIETE PHYSIQUE : la granulométrie.....	28
3.2 IMPACT D'A. SENEGAL SUR LES PROPRIETES CHIMIQUES DU SOL .....	28
3.2.1 pH du sol .....	29
3.2.2 Taux de carbone total et azote total.....	29
3.2.3 Taux de phosphore total (Pt).....	30
3.2.4 Capacité d'échanges cationiques (CEC) .....	31
3.3 DENSITE ET ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE .....	32
3.3.1 Densité microbienne .....	32
3.3.2. Minéralisation du carbone .....	33
3.4 STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNE SOUS LES PROVENANCES D'A. SENEGAL.....	34
3.4.1 Structure des communautés bactériennes totales .....	34
3.4.2 Etude de la structure des communautés bactériennes fonctionnelles .....	35
3.4.2.1 Structure des communautés bactériennes dénitrifiantes .....	35
3.4.2.2 Structure des communautés nitrifiantes .....	37
3.4.2.3 Structure des communautés bactériennes diazotrophes .....	38
<b>Chapitre 4 DISCUSSION.....</b>	<b>40</b>
4.1 EFFET DES PROVENANCES D'A. SENEGAL SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL .....	40
4.2 EFFET DES PROVENANCES D'A. SENEGAL SUR LES PROPRIETES MICROBIOLOGIQUES DU SOL .....	41
4.3 EFFET DES PROVENANCES D'A. SENEGAL SUR LA STRUCTURE GENETIQUES DES COMMUNAUTES BACTERIENNES.....	42
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>46</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>x</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**ADNr**: Acide Désoxyribonucléique ribosomique  
**BET**: Bromure d'éthidium  
**BSA**: Bovine Serum Albumin  
**cm** : centimètre  
**C**: Carbone  
**CO<sub>2</sub>**: dioxyde de Carbone  
**CEC**: Capacité d'Echange Cationique  
**CNRF** : Centre National de Recherches Forestières  
**CTAB**: Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide  
**DGGE**: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
**dNTP**: désoxynucléoside triphosphate  
**EDTA** : Ethylène Diamine-Tetra acetic Acid  
**g** : gramme  
**h** : heure  
**HC** : Hors-couvert  
**ISRA** : Institut Sénégalaise de Recherches Agricoles  
**J** : jour  
**KAc** : Acétate de potassium  
**mg** : milligramme  
**mM** : millimolaire  
**min** : minute  
**ml** : millilitre  
**mm** : millimètre  
**N** : azote  
**ng** : nanogramme  
**NH<sub>4</sub>Ac** : Acétate d'ammonium  
**nm** : nanomètre  
**pb**: paires de bases  
**PCR**: Polymerase Chain Reaction  
**PEG**: PolyEthylene Glycol  
**Pt** : phosphore total

**qsp**: quantité suffisante pour

**rpm** : rotations par minute

**sec** : seconde

**TAE** : Tris Acétate EDTA

**TBE** : Tris Borate EDTA

**U** : Unité enzymatique

**UV** : ultra-violet

**V** : Volt

**10 X** : concentré 10 fois

**µm** : micromètre

**µl** : microlitre

**µg** : microgramme

**%** : pourcentage

**°C** : degré Celcius

**&** : et

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Figures

<b>Figure 1</b> : Cycle de l'azote dans le sol.....	9
<b>Figure 2</b> : Différentes étapes de la nitrification.....	10
<b>Figure 3</b> : Différentes étapes de la dénitrification.....	11
<b>Figure 4</b> : Photo d' <i>A. senegal</i> .....	13
<b>Figure 5</b> : Situation géographique du site de l'expérimentation.....	15
<b>Figure 6</b> : Schéma de la réaction en chaîne par polymérisation (PCR).....	21
<b>Figure 7</b> : Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène ADNr16S.....	22
<b>Figure 8</b> : Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène nirK (nitrite réductase).....	23
<b>Figure 9</b> : Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène amoA.....	24
<b>Figure 10</b> : Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène nirH.....	25
<b>Figure 11</b> : Description schématique de l'électrophorèse en gradient de gel de dénaturation (DGGE).....	27
<b>Figure 12</b> : pH du sol sous <i>A. senegal</i> de différentes provenances.....	29
<b>Figure 13</b> : Teneur en carbone total des sols sous <i>A. senegal</i> et hors-couvert d' <i>A. senegal</i> .....	30
<b>Figure 14</b> : Teneur en azote total des sols sous <i>A. senegal</i> et hors-couvert d' <i>A. senegal</i> .....	30
<b>Figure 15</b> : Teneur en phosphore total des sols d' <i>A. senegal</i> et hors-couvert d' <i>A. senegal</i> .....	31
<b>Figure 16</b> : Capacité échangeables cationiques sous et hors-couvert d' <i>A. senegal</i> .....	31
<b>Figure 17</b> : Biomasse microbienne totale dans les sols sous et hors-couvert d' <i>A. senegal</i> .....	33
<b>Figure 18</b> : Quantités de CO <sub>2</sub> libéré en µg C/g sol dans les sols sous et hors-couvert d' <i>A. senegal</i> .....	33
<b>Figure 19</b> : Profil DGGE de l'amplifiât d'une partie du gène 16SrDNA de la communauté bactérienne totale des sols des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	34
<b>Figure 20</b> : Dendrogramme de similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE-16S des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	35
<b>Figure 21</b> : Structure génétique de la communauté bactérienne dénitrifiante des sols des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	36
<b>Figure 22</b> : Dendrogramme de similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE-nirK des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	37
<b>Figure 23</b> : Structure génétique de la communauté bactérienne ammonifiante des sols des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	37
<b>Figure 24</b> : Dendrogramme de similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE-amoA.....	

des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	38
<b>Figure 25</b> : Structure génétique de la communauté bactérienne diazotrophe des sols des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	38
<b>Figure 26</b> : Dendrogramme de similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE-nifH des provenances d' <i>A. senegal</i> .....	39
<b>Tableaux</b>	
<b>Tableau 1</b> : Liste des provenances d' <i>A. senegal</i> et pays d'origine.....	16
<b>Tableau 2</b> : Séquence des amorces et des gènes cibles des communautés microbiennes étudiées.....	26
<b>Tableau 3</b> : Texture des sols sous <i>A. senegal</i> de différentes provenances.....	28
<b>Tableau 4</b> : Valeur de la concentration de carbone, azote en mg/g sol, de phosphore total en mg/kg sol et pH obtenues sous <i>A. senegal</i> de différentes provenances.....	28
<b>Tableau 5</b> : Quantité de CO <sub>2</sub> -C et biomasse microbienne totale dans les sols sous <i>A. senegal</i> et hors-couvert d' <i>A. senegal</i> .....	32

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Préparation des solutions d'extraction d'ADN .....	x
ANNEXE 2 : Extraction d'ADN du sol.....	xi
ANNEXE 3 : Compositions des autres solutions utilisées .....	xii
ANNEXE 4: Electrophorèse sur gel en gradient de dénaturant (DGGE).....	xiii

**ABSTRACT: Impact of *Acacia senegal* (L.) Willd on soil proprieties physical-chemical and biological.**

The structure and functional diversity of microbial communities in the soil is tightly related to plant species composition above-ground, thus providing an important link between above and below-ground processes in terrestrial ecosystems.

Some studies have shown that individual plant species can greatly influence the size and activity of the microbial biomass, and that these effects are often closely related to various plant ecophysiological traits. It has also been suggested that exotic plants could interact with soil microbial communities and disrupt mutualistic associations between existing ecological associations within native communities

The objectives of this study were to assess the soil properties and functioning responses to *A. senegal* trees from different provenances in Senegal.

The experimental design consists of 17 *A. senegal* from different provenances from 9 countries. Soil chemical properties pH, C, N & P, microbial biomass, C mineralization and genetic structure of total and functional microbial communities by PCR-DGGE were studied.

The results indicated that the soils with provenances Ngane (Senegal) and those from Burkina (Bissiga & Burkina) have displayed the highest C, N and P contents. Soils supporting the Burkina provenances showed also the highest C mineralization rates contrary to Ngane soil. The results showed that *A. senegal* provenances has modified the total bacterial structure compared to the control soil.

The *nifH* profiles showed very few similarities among the N<sub>2</sub> fixing bacterial communities structure suggesting that the *nifH* pool is variable in relation to the *A. senegal* provenances. The genetic structure by *nirK* profiles suggested that the denitrifiers communities are also too variable in relation to the *A. senegal* provenances.

We showed that some provenances have positively impacted on soil quality and have selected the functional bacterial community which in term will participated to a specific biogeochemical process in soil leading to soil fertility and yield improvement.

**Key words:** *A. senegal* provenances, soil, bacterial communities structure, PCR-DGGE, *amoA* gene, *nirK* gene, *nifH* gene.

# INTRODUCTION

Les pays sahéliens sont confrontés depuis plusieurs années à la forte variabilité aussi bien temporelle, spatiale que quantitative des précipitations. Ce phénomène combiné aux facteurs anthropiques, ont sérieusement affecté les grands équilibres écologiques et entraîné une dégradation des ressources naturelles, des sols et des agro-écosystèmes.

Cette situation a rendu les systèmes de production agricole vulnérables (baisse de la production agricole) et a fortement limité les possibilités d'intensification, constituant de ce fait la contrainte majeure à l'atteinte des OMD (Objectifs du Millénaire pour le Développement) que se sont fixés les pays sahéliens. La lutte contre la déforestation et la désertification doublée de la diversification des cultures ouvrant des perspectives à la promotion de nouvelles filières agricoles capables d'accroître les revenus des paysans, ont été toujours considérées comme des solutions entre autres à privilégier dans ces pays.

Dans ce contexte, certains pays dont le Sénégal ont mis en place des programmes de développement basés sur les plantations d'espèces végétales à croissance rapide, à usage multiple, parfaitement adaptées au climat aride et surtout qui présentent divers avantages pour le développement rural (génération de revenus, contrôle de l'érosion, réduction de la déforestation par la fourniture de bois dans les zones rurales, promotion de la femme etc.). C'est ainsi que des plantations d'espèces végétales présentant une haute valeur ajoutée économiquement et qui sont écologiquement utiles telles *Balanites aegyptiaca*, *Azadirachta indica*, *Anacardium occidentale*, *Ziziphus mauritiana*, *Acacia senegal*, ont été mises en place dans différentes localités du Sénégal. Parmi ces espèces végétales, *A. senegal* connaît un essor considérable reconnu car au-delà des avantages environnementaux des plantations d'*A. senegal* comme, la protection des sols contre l'érosion, l'amélioration de la fertilité des sols (Dommergues *et al.*, 1994) et la réduction du taux de déforestation, cette plante présente un intérêt économique certain par sa production de gomme.

En effet, *A. senegal* est un arbre typique du Sahel caractéristique des zones sèches situées au sud du Sahara, depuis les côtes mauritaniennes et sénégalaises jusqu'aux côtes de l'Ethiopie et de la Somalie. En Mauritanie et au Sénégal, le bois lourd d'*A. senegal* est préféré en tant que combustible au bois d'autres espèces ligneuses. Les feuilles et les gousses sont riches en protéines digestibles (10-13%) et constituent une source importante de fourrage en saison des pluies et au début de la saison sèche (Maydell, 1983). *A. senegal* est surtout utilisé pour les projets de revégétalisation et pour la fixation des dunes. Au Soudan, *A. senegal* est utilisé dans des systèmes agroforestiers, en combinaison avec des cultures maraîchères, des plantes fourragères annuelles et des céréales comme le mil (Anderson & Sinclair, 1993). Outre ces caractéristiques, *A. senegal* est la principale espèce productrice de gomme. Il fournit plus de 90% de la gomme arabique mise sur le marché mondial. C'est la seule gomme d'acacia alimentaire, car elle ne contient aucun produit toxique (Maydell, 1983).

Les peuplements économiquement intéressants se situent en Mauritanie, au Mali, au Niger au Tchad et au Soudan (Sall, 1997). Au Soudan, *A. senegal* a toujours contribué de façon significative à l'augmentation des recettes d'exportation du pays.

Afin d'augmenter la production de gomme au Sénégal, il a été envisagé l'introduction et les plantations des *A. senegal* originaires d'autres zones géographiques (Provenances) où la production de gomme arabique est élevée.

Pour ce faire, des essais d'adaptation et de production de gomme des plantes des différentes provenances ont été mis en place par le CNRF (Centre National de Recherches Forestières). Cependant, aucune étude scientifique n'avait jamais été menée pour étudier l'impact que pourrait avoir l'introduction et la plantation de ces provenances d'*A. senegal* sur le fonctionnement biologique des sols au Sénégal.

De nombreux auteurs ont montré que l'introduction des espèces végétales « exotiques » dans un autre milieu pouvait entraîner des modifications des propriétés chimiques des sols et de leur statut microbiologique (Kourtev *et al.*, 2003 ; Kisa *et al.*, 2007). De plus, l'influence des plantes sur les processus biologiques se manifeste à travers les effets sur les microorganismes du sol dont les variations constituent par conséquent de bons indicateurs de l'effet des plantes (Turner *et al.*, 1993; Bauhus *et al.*, 1998; Priha *et al.*, 2001). Les plantes, par la quantité et la qualité des ressources organiques qu'elles produisent au sol, influencent l'activité, la structure et la diversité de la biomasse microbienne du sol (Wardle and Nicholson, 1996; Bardgett and Shine, 1999 ; Wardle *et al.*, 1999 ; Wardle, 2002). Par conséquent, selon Wardle *et al.*, (1998), ces effets sur les propriétés biologiques et microbiologiques des sols sont étroitement liés aux caractères écophysologiques des plantes.

L'objectif de notre travail est donc d'évaluer l'impact d'*A. senegal* de différentes provenances sur les propriétés chimiques, biologiques et microbiologiques des sols au Sénégal.

Les plantations de différentes provenances d'*A. senegal* mises en place à Bambey nous permettront de tester les hypothèses suivantes :

- l'introduction au Sénégal des provenances d'*A. senegal* modifie les propriétés chimiques et l'activité biologique des sols par rapport à hors-couvert d'*A. senegal*.

- la structure des communautés bactériennes totales du sol et celle des communautés liées au cycle de l'azote sont modifiées par les *A. senegal* de différentes provenances.

Ce mémoire s'articule autour de 4 chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique. Dans le deuxième chapitre, nous présenterons le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre sera consacré aux résultats obtenus et le dernier chapitre réservé à la discussion.

# Chapitre 1: **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1.1 LE SOL

Le sol est la zone meuble plus ou moins épaisse parcourue par les racines des plantes. Il est issu d'une transformation de la roche mère sous-jacente. Des processus physiques, chimiques et biologiques désagrègent et altèrent les roches mères dont les minéraux sont plus ou moins transformés. Simultanément, les végétaux et la faune qui se développent sur ces minéraux produisent de la matière organique fraîche (feuilles, fruits, cadavres d'animaux et excréments) qui est décomposée par divers bactéries et champignons. Au cours de la transformation de la matière organique, des minéraux solubles et gazeux sont libérés et peuvent réagir avec d'autres molécules organiques pour former l'humus, matière organique brune à l'état de colloïdes. Dans le sol, on retrouve une phase solide formée d'éléments minéraux et organiques, une phase liquide formée d'eau et de substances dissoutes et une phase gazeuse.

### 1.1.1 La phase solide

La phase solide du sol est constituée de la fraction minérale et de la fraction organique.

#### 1.1.1.1 La fraction minérale

Elle représente, en général 95 à 99% de la fraction solide du sol. Sa composition dépend de la nature de la roche mère. Ces éléments minéraux peuvent avoir différentes tailles granulométriques :

- Sable ( $50 < \varnothing < 2000 \mu\text{m}$ )
- Limon ( $2 < \varnothing < 50 \mu\text{m}$ )
- Argile ( $\varnothing < 2 \mu\text{m}$ )

Selon les proportions de ces trois fractions granulométriques, la texture du sol peut être qualifiée de sableuse à argileuse. La capacité du sol à remplir ses fonctions dépend de la nature de la roche mère et de sa texture.

#### 1.1.1.2 La fraction organique

La fraction organique comprend l'ensemble des substances biologiques d'origine animale et végétale que l'on retrouve dans le sol. On peut distinguer deux fractions : une fraction organique vivante et une fraction organique inerte (Theng, 1987).

##### 1.1.1.2.1 La fraction organique inerte

La matière organique morte représente à elle seule 80% de la matière organique (MO) du sol. Ce compartiment est défini par divers stades de décomposition de la matière organique. Elle est constituée de tissus végétaux (feuilles et rameaux morts) et de résidus d'organismes (excréments, cadavres etc.). Elle subit de nombreuses transformations dans le sol. Ces transformations se font en deux phases : une phase de minéralisation et une phase d'humification. Les débris qui représentent une source importante de matière organique sont plus ou moins rapidement décomposés dès leur retour au sol sous l'influence de l'activité biologique. Parmi ces débris, la litière constitue une importante masse végétale qui recouvre le sol minéral. Dans les premières étapes de sa décomposition, la litière donne naissance d'une part, à des éléments solubles ou gazeux, tels que,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  etc. (c'est la minéralisation).

D'autre part, cette litière donne des composés amorphes (fraction organo-argileuse) qui peuvent contracter des liaisons avec la fraction minérale chimiquement active du sol (argiles) pour former le complexe argilo-humique. Cette matière organique dont la minéralisation est plus lente constitue l'humus. L'humus est relativement plus stable et plus résistant à la biodégradation que la matière organique fraîche. L'humification désigne l'ensemble des processus de transformation de la matière organique fraîche en humus.

#### **1.1.1.2.2 La fraction organique vivante**

Le sol héberge une grande diversité de microorganismes (bactéries, champignons etc.) 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 microorganismes du sol sont composés principalement par les bactéries et les champignons. Ces microorganismes sont les principaux responsables de la transformation de la MO. Ils participent aussi à l'humification notamment par l'excrétion d'enzymes dans le sol ainsi qu'à la formation des complexes organo-minéraux.

##### **- Les bactéries**

Ce sont des organismes procaryotes unicellulaires à paroi souple et de diverses formes. L'un des aspects écologiques les plus saillants chez les bactéries est leur caractère ubiquiste (Horner-Devine *et al.*, 2003). Les bactéries sont présentes dans le sol en proportions variables. Elles apprécient en général les milieux à pH neutre ou alcalin, riches en azote et à une température variant entre 20 et 40°C (bactéries mésophiles). Cependant, *Thermus aquaticus*, une bactérie des eaux thermales reconnue pour sa contribution à la Taq polymérase en biologie moléculaire, a son optimum de croissance à une température variant entre 70 et 79°C, une gamme de température létale pour les plantes et les animaux (Brock & Freeze, 1969).

Les bactéries sont abondantes dans la rhizosphère des graminées et des légumineuses et possèdent une grande diversité spécifique et fonctionnelle. Certaines sont capables d'utiliser le carbone sous forme minérale CO<sub>2</sub> comme substrat énergétique. Ce sont les bactéries autotrophes. D'autres ont besoin d'une source de carbone organique pour leur métabolisme énergétique et leur croissance. Ce sont les bactéries hétérotrophes. On trouve également parmi les bactéries, des organismes saprophytes qui vivent aux dépens de la nécromasse. Les hétérotrophes et les saprophytes sont les plus nombreuses dans le sol.

Certains groupes de bactéries du genre *Rhizobium* sont capables d'entrer en symbiose avec les plantes de la superfamille des Légumineuses pour la fixation biologique de l'azote. Cette symbiose est d'une importance agronomique considérable car elle permet d'apporter aux plantes de la nutrition azotée (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

D'autres groupes bactériens comme les actinomycètes (Eubactéries gram +, High G-C) possèdent des filaments ramifiés et émettent des conidies (Davet, 1996). Ils sont proches de certains champignons avec lesquels ils partagent quelques caractères (filaments et conidies). Cependant leur filament ramifié présente un diamètre plus petit que celui des champignons (0,5 à 1 µm). Les actinomycètes participent activement à l'humification en s'attaquant à la lignine (composée biochimique récalcitrant). Mais surtout, ils sont capables de s'attaquer aux humus

pour qu'ils libèrent à la fois l'azote qu'ils contiennent, mais aussi les éléments échangeables qu'ils avaient fortement adsorbés.

Des genres comme *Streptomyces* et *Nocardia* sont aussi fréquemment rencontrés dans le sol et sont particulièrement aptes à décomposer les composés récalcitrants.

Par ailleurs, les bactéries participent à la structuration du sol par la sécrétion de polysaccharides qui lient les particules minérales et contribuent à la stabilité des micro-agrégats.

#### **- Les champignons**

Les champignons sont de natures ubiquistes et hétérotrophes. Ils constituent environ 85-90% de la biomasse du sol. Les champignons saprophytes sont des décomposeurs et vivent dans de la matière organique morte. Ils jouent un rôle important dans le recyclage des nutriments. Les champignons se distinguent des bactéries par leur taille et leur structure qui est de type eucaryote. Les champignons peuvent constituer une association mutualiste avec les algues ou les cyanobactéries mais ils peuvent aussi être bénéfiques à la croissance des végétaux en formant des associations symbiotiques avec des racines qu'on appelle mycorhizes. Il existe de nombreux types d'associations mycorhiziennes. Différents types de mycorhizes sont ubiquistes sur la plupart des plantes herbacées et des espèces arborées, et ceci, dans une vaste gamme d'habitats, dont les systèmes agricoles.

#### **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 & 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 et dans les litières (500 000 espèces ; Hawkswoth, 1991). Ils peuvent être saprophages, phytophages, bactériophages (Djigal *et al.*, 2003) ou fongivores.

- la macrofaune très dense et diversifiée est dominée par les termites, les vers de terre et les fourmis. Ils 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.

#### **1.1.2 La phase liquide**

L'eau et les substances dissoutes du sol ont une importance considérable sur la nutrition des plantes. Elles interviennent directement en tant que véhicules des éléments nutritifs dissouts. Ce sont les principaux facteurs dans le processus de la pédogenèse. Les sources principales de l'eau du sol sont : l'eau de gravité et l'eau de rétention.

- L'eau de gravité est représentée par l'eau qui circule dans les pores grossiers et moyens ( $> 10 \mu\text{m}$ ). Elle est entraînée par la pesanteur, et circule le plus souvent verticalement ou obliquement dans les sols peu perméables.
- L'eau de rétention est l'eau retenue par le sol au cours de l'infiltration des pluies. Elle occupe les pores fins et très fins ( $< 10 \mu\text{m}$ ). L'eau retenue se subdivise en deux parties :
  - L'eau capillaire dont une partie est retenue sous forme de film assez épais autour des particules de sol ou dans la microporosité. Elle constitue la réserve utile qui est l'eau facilement disponible pour les plantes et les microorganismes. Les mouvements de l'eau capillaire se font en direction des zones d'évaporation soit par remontée vers la surface (évaporation), soit par les mouvements vers les racines (évaporation-transpiration des plantes).
  - L'eau liée appelée aussi eau d'absorption qui forme une fine pellicule à la surface des particules du sol (pores très fins, diamètre  $< 0,2 \mu\text{m}$ ), et qui retenue très énergiquement, n'est pas absorbable par les racines.

Il est important de noter que les argiles sont le principal « support » de l'eau dans le sol. Ce sont des phyllo silicates  $(\text{Si}_4\text{O}_{10})^+$ , c'est-à-dire des minéraux à base de silice qui, comme les micas, présentent une structure en feuillets. Cette capacité de fixation des molécules d'eau est une composante de la capacité d'échange cationique (CEC). C'est cette même propriété qui explique la fixation du calcium sur l'argile pour créer un pont calcique avec l'humus et former ainsi le complexe argilo-humique.

### 1.1.3 La phase gazeuse

La phase gazeuse du sol, appelée atmosphère du sol, est plus enrichie en  $\text{CO}_2$  que l'atmosphère proprement dite et moins riche en  $\text{O}_2$  ( $< 21\%$ ). Ceci pour deux raisons :

- L'oxygène est consommé par toute une série de phénomènes se déroulant dans le sol : respiration des végétaux supérieurs, métabolismes des microorganismes aérobies, minéralisation de la matière organique
- le renouvellement de l'oxygène à partir de celui de l'atmosphère est lent, le cheminement suivi par les gaz peut être tortueux, ralenti, bloqué par le fait que certains pores sont occupés par de l'eau. Les caractéristiques de la porosité du sol (son importance et son organisation), en particulier dans ses horizons superficiels, jouent donc un grand rôle sur les teneurs en  $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère du sol.

### 1.1.4 L'organisation du sol

L'organisation des constituants du sol est fonction de la taille des particules minérales et organiques et des contraintes physiques subies par le sol. Trois principaux éléments sont habituellement retenus pour décrire les propriétés physiques d'un sol. Il s'agit de la texture, de la structure et de la porosité.

#### 1.1.4.1. La texture

La texture d'un sol ou sa composition granulométrique est la caractéristique qui fait référence à la taille des éléments minéraux qui la compose. La texture peut être définie par la proportion de chaque classe de grosseur des particules minérales élémentaires du sol. Les éléments constitutifs intervenant dans la définition de la texture d'un sol sont les sables, les

limons, et les argiles. La proportion relative de chacun de ces trois éléments permet de définir la nature du sol.

La texture est définie par un nom lorsqu'un seul des éléments est nettement dominant. On parle dans ce cas de texture argileuse, limoneuse, ou sableuse. La texture peut être définie par deux noms quand un élément ne domine pas de façon très nette; elle est ainsi nommée par les deux éléments les plus importants. Dans ce cas, on parle par exemple de texture argilo-limoneux, argilo-sableux, limono-sableux etc. Le premier constituant nommé indique le caractère le plus marqué.

La texture peut avoir une influence importante sur l'agrégation du sol. Dans les sols à texture sableuse, le contenu en carbone organique du sol influence la structure, puisque le sable n'est pas une fraction chimiquement active. Contrairement aux sols sableux, les sols argileux en particulier le type d'argile jouent un rôle très important dans la formation des agrégats. Les propriétés et la nature des argiles en font un élément important de la structure du sol (Oades, 1993). Les argiles ont une grande propriété électrostatique et une capacité de se gonfler en présence d'eau. Cette plasticité des particules d'argiles leur confère une capacité de rétention d'eau élevée. Leur charge négative leur permet de nouer des liaisons chimiques avec les cations comme les ions magnésium, fer, calcium, etc. Ils peuvent constituer par là une réserve importante en éléments minéraux en assurant la régulation et l'approvisionnement de la phase liquide du sol. Une augmentation de la concentration en argile est souvent associée à une augmentation de la stabilité du carbone organique du sol.

#### **1.1.4.2 structure**

La structure et la porosité, contrairement à la texture qui ne se modifie pas facilement, sont des éléments dynamiques des propriétés physiques d'un sol. La structure traduit le mode d'assemblage des particules solides (sables et limons) avec les agents liants organiques ou minéraux (humus et argiles).

La structure d'un sol fait référence à la taille, à la forme et à l'arrangement des particules minérales élémentaires, à la continuité des vides ou pores, à la capacité à retenir et à transmettre les substances organiques et inorganiques, et à supporter la vigueur et le développement des racines (Lal *et al.*, 1991). Les substances humiques peuvent se lier à la fraction minérale du sol pour former des complexes et des agrégats qui caractérisent la structure du sol. Les agrégats constituent les éléments structuraux de base du sol. Ils résultent de l'association entre les particules de sables et des limons avec les ciments minéraux et les liants organiques. L'agrégation des particules du sol ainsi que l'incorporation de la matière organique résultent à la fois de phénomènes biotiques et physico-chimiques. Des facteurs biotiques comme les exsudats des racines, l'action des vers de terres, ou les hyphes des champignons jouent un rôle prépondérant dans la structuration du sol en particulier dans la formation des agrégats. Ainsi la formation de la structure d'un sol est due principalement à l'agrégation des particules par les vers de terres et la création de pores par les réseaux formés par les racines et les hyphes des champignons. Ces agrégats ont une certaine résistance physique aux agressions mécaniques naturelles (érosion, gouttes de pluies etc.) ou artificielles (actions anthropiques comme les pratiques agricoles). La capacité d'un sol à résister à ces agressions constitue la stabilité structurale. Cette stabilité des agrégats est importante sur les processus qui maintiennent une agriculture durable par la formation de réservoirs de nutriments. Une bonne structure d'un sol traduit une porosité élevée et des agrégats grumeleux, ce qui améliore les réserves en eau, l'aération et la perméabilité,

l'enracinement et la résistance aux agressions. La structure peut être un indicateur de l'état de santé d'un sol. La détérioration de la structure est un symptôme de dégradation d'un sol. La stabilité des agrégats est souvent utilisée comme un indicateur de la structure du sol (Six *et al.*, 2000). Les pratiques agricoles inadaptées et la baisse du stock de matière organique suite à une minéralisation accrue sont à l'origine de la déstructuration des sols.

#### **1.1.4.3 La porosité**

La porosité est la quantité de vides qui résulte de l'empilement des particules de sol dans les agrégats, et celui des agrégats dans le sol. C'est la fraction du volume de sol qui n'est pas occupé par la matière solide. Elle dépend du mode d'arrangement des constituants solides du sol et de leur nature. La porosité est une propriété physique très importante. Elle contrôle la circulation des fluides et des gaz dans le sol et exerce ainsi une influence sur l'activité biologique.

L'organisation des espaces vides dans le sol définit des pores de diamètre différent qui peuvent être répartis en trois groupes. Les macropores dont le diamètre est compris entre 200  $\mu\text{m}$  et 6  $\mu\text{m}$ ), les micropores de diamètre compris entre 6  $\mu\text{m}$  et 0,2  $\mu\text{m}$ , et la porosité matricielle formée de pores très fins de diamètre inférieur à 0,2  $\mu\text{m}$  (Callot *et al.*, 1982).

La macroporosité caractérise les pores les plus gros dans lesquels l'eau circule librement sous l'effet de la gravité. Elle résulte de l'activité biologique et des mouvements internes liés au gonflement et à la dessiccation du sol. Elle ne retient pas l'eau sauf dans le cas des sols hydromorphes et permet les échanges gazeux. Contrairement à la macroporosité, la microporosité retient l'essentiel de la réserve en eau utilisable par les plantes. Ses pores sont accessibles aux bactéries et peuvent permettre la pénétration des poils absorbants. La phase liquide retenue dans la microporosité contient l'essentiel des solutés provenant des phénomènes de dissolution ou d'échanges avec les éléments de la phase solide environnante. La porosité matricielle est difficilement exploitable par les racines. Dans ce cas, l'extraction de l'eau ne peut se faire que par succions inférieures à -15 bars (Callot *et al.*, 1982).

#### **1.1.5 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, faune et microorganismes) y jouent des rôles importants. Les plantes influencent le fonctionnement du sol en synthétisant à partir du  $\text{CO}_2$  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 & Stotsky, 1983). Ils transforment la majorité des déchets organiques, contrôlent les cycles des bio-éléments en particulier ceux du carbone, de l'azote, du phosphore, du soufre (Alexander, 1977). Parmi ces microorganismes, les bactéries accomplissent un rôle important puisque d'elles dépendent 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, entre autres, dans des processus biogéochimiques (cycle des nutriments Carbone, Azote et Phosphore par exemple) privant ou mettant à la disposition des plantes

certaines éléments nécessaires à leur croissance. L'azote étant parmi ces éléments le facteur le plus important pour le développement des plantes.

### 1.1.5.1 Le cycle de l'azote

Le recyclage de l'azote présent dans la matière organique joue un rôle essentiel dans la vie sur terre. Une partie de l'azote 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, qui constituent le cycle de l'azote. Les caractéristiques principales de ce cycle sont donc le passage de la phase minérale à la phase organique et le transfert biosphère/atmosphère où s'inscrivent les processus de nitrification et dénitrification (Figure 1).

#### 1.1.5.1.1 Fixation non symbiotique de l'azote moléculaire

Ce phénomène, réalisé par des microorganismes spécifiques, consiste en une fixation biochimique de l'azote moléculaire sous forme de  $\text{NH}_3$ , lequel se trouve ensuite intégré dans des composés organiques préformés.

Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux groupes d'organismes :

- les bactéries hétérotrophes : aérobies ou anaérobies
- Les organismes photosynthétiques : bactéries photosynthétiques, cyanophycées.

Le mécanisme du processus biochimique de la fixation met en œuvre :

- des substances réductrices du métabolisme cellulaire général, et, en particulier, l'acide pyruvique ( $\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$ ) ;
- des systèmes oxydo-réducteurs intermédiaires,
- une source d'énergie représentée par l'ATP,
- un complexe enzymatique comprenant : un système donneur d'hydrogène ; une nitrogénase, contenant du molybdène, qui catalyse la réduction  $\text{N} \rightarrow \text{NH}_3$ ,
- des molécules organiques carbonées sur lesquelles se fixe  $\text{NH}_3$ .

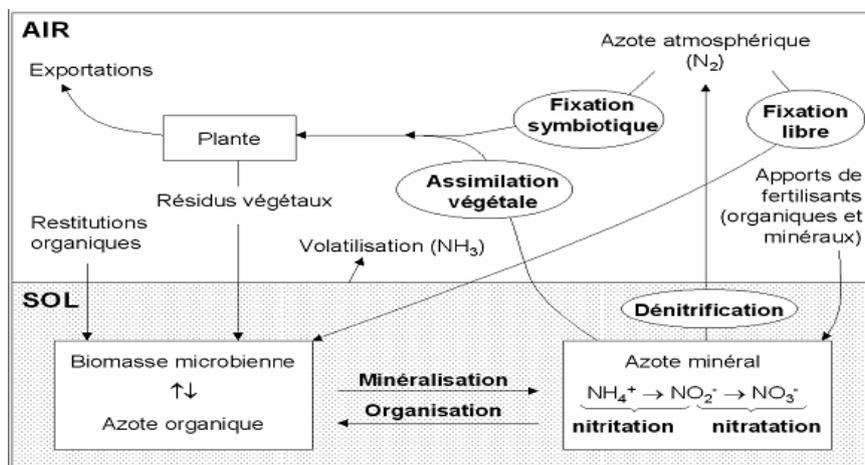


Figure 1: Cycle de l'azote dans le sol. D'après Recous *et al.*, (1995).

#### 1.1.5.1.2 L'ammonification

L'ammonification est le processus de transformation de l'azote de la matière organique (protéines, sucres aminés, bases puriques et pyrimidiques) en azote ammoniacal. Le processus d'ammonification est dirigé essentiellement par des peptidases et des protéases (Stevenson, 1986). En fonction du pH du milieu, l'ammoniaque peut être ionisé ( $\text{NH}_4^+$ ) ou non ionisé ( $\text{NH}_3$ ). L'azote ammoniacal n'est qu'un état transitoire entre l'azote organique et l'azote nitrique.

L'organisation ou l'immobilisation se produit lorsque les bactéries utilisent l'azote disponible du sol pour décomposer du matériel riche en carbone ( $> 40 \text{ C/N}$ ). Il est important de noter que l'immobilisation sous-entend une multiplication bactérienne et donc, que les conditions doivent être adéquates, notamment quant à la température et l'humidité du sol.

### 1.1.5.1.3 La nitrification

La nitrification est un phénomène biologique par lequel la forme ammoniacale de l'azote est transformée en forme nitrique. Phénomène général dans tous les sols normalement aérés, il est complémentaire des processus de minéralisation. La nitrification se déroule en deux étapes successives : l'oxydation de l'ammonium (plus précisément de l'ammoniac) en nitrite et l'oxydation du nitrite selon le schéma suivant :



**Figure 2:** Différentes étapes de la nitrification

La première étape, appelée nitritation, est principalement réalisée par les bactéries du genre *Nitrosomas* et est catalysée par les enzymes ammoniac-mono-oxygénase (AMO) et hydroxylamine oxydoréductase (HAO).

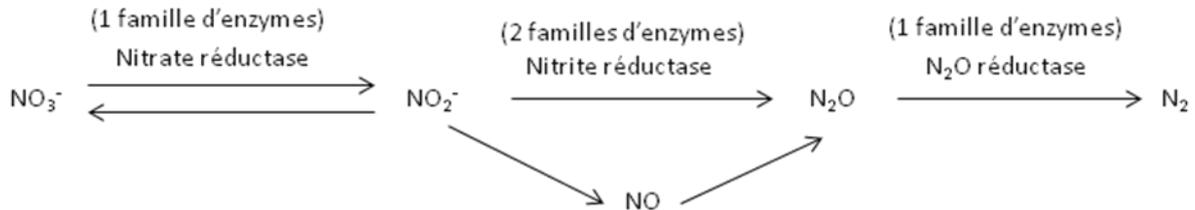
La seconde étape, nommée nitratation, est effectuée par les *Nitrobacters* et est catalysée par l'enzyme nitrite oxydoréductase (NOR). Les *Nitrosomas* et les *Nitrobacters* sont des organismes autotrophes, aérobies, qui utilisent le  $\text{CO}_2$  comme source de carbone et obtient leur énergie à partir de l'oxydation respectivement de l'hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) et du nitrite  $\text{NO}_2^-$  (Colliver & Stephenson, 2000). Certains organismes hétérotrophes, qui utilisent les composés organiques au lieu du  $\text{CO}_2$ , peuvent aussi participer au processus de nitrification même s'ils sont considérés comme quantitativement moins importants que les bactéries autotrophes (Bremner & Blackmer, 1981).

En conditions sub-optimales d'oxygène, l'oxydation est incomplète et une partie du  $\text{NH}_4^+$  contribue à la formation de  $\text{NO}$  et  $\text{N}_2\text{O}$  (Poth & Focht, 1985). Certains résultats expérimentaux (Bremner & Blackmer, 1981) montrent pourtant, que même dans des sols sous conditions nitrifiantes (sols bien aérés), la production d'une quantité importante de  $\text{N}_2\text{O}$  peut avoir lieu, indépendamment de la concentration en nitrate et de façon croissante avec l'augmentation de  $\text{NH}_4^+$ . La nitrification peut donc être responsable de la production et de la libération dans l'atmosphère de quantités importantes de  $\text{N}_2\text{O}$  (Jaffe, 1992).

Les principaux facteurs affectant la nitrification dans le sol sont la population bactérienne nitrifiante, la température, l'humidité, le pH et les substrats  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ ,  $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$  (Montagnini, *et al.*, 1989). Les conditions de nitrification sont optimales à des températures comprises entre 25 et 35°C, à pH légèrement acide et en condition d'humidité du sol intermédiaire (Bertsch, 1998).

### 1.1.5.1.4 La dénitrification

La nitrification peut être suivie de la dénitrification qui permettra de boucler le cycle de l'azote avec la production d'azote moléculaire lorsque le milieu devient anoxique. La dénitrification est une réduction anaérobie du nitrate en  $N_2O$  et  $N_2$ , réalisée par l'intermédiaire de bactéries anaérobies facultatives qui transforment la matière organique, selon les étapes suivantes :



**Figure 3:** Les différentes étapes de la dénitrification (Hénault et Germon, 1995)

Les trois enzymes impliquées dans le processus de dénitrification sont la  $NO_3^-$  réductase, la  $NO_2^-$  réductase et la  $N_2O$  réductase. Les sources d'énergie des dénitrifiants incluent trois classes connues : organique (organotrophes), inorganique (lithotrophes) et lumineuse (phototrophes). Le substrat organique est la source d'énergie la plus commune. Outre les dénitrifiantes, certaines bactéries hétérotrophes, les  $NO_3^-$  réducteurs d'après Tiedje (1988) sont capables de réaliser la première étape de dénitrification, c'est-à-dire la réduction de  $NO_3^-$  en  $NO_2^-$ .

Le taux de dénitrification est déterminé par 5 principaux facteurs :

- la présence de micro-organismes dénitrifiants,
- le taux d' $O_2$  du sol. Il a d'ailleurs été montré que la dénitrification, longtemps considérée comme exclusivement anaérobie, pouvait avoir lieu en condition aérobie (Bell *et al.*, 1990).
- la présence de nitrate comme accepteur d'électrons même si certaines bactéries dénitrifiantes ont aussi la capacité d'utiliser  $NO_2^-$  et/ou  $N_2O$  comme accepteurs d'électrons en absence d' $O_2$ .
- la quantité de carbone assimilable (qui est le donneur d'électrons).
- le pH qui serait favorable aux activités microbiennes dénitrifiantes à une valeur neutre et pourrait inhiber la  $N_2O$  réductase à pH inférieur à 5 (Knowles, 1982).

La quantité de  $N_2O$  libérée par dénitrification dépend non seulement du taux de dénitrification, mais aussi du rapport entre les volumes de  $N_2O$  et de  $N_2$  produits. La proportion de  $N_2$  produit par rapport à celle de  $N_2O$  dépend dans le sol des espèces de bactéries dénitrifiantes impliquées, du degré d'anaérobiose, de la quantité de carbone, du contenu en nitrate et du pH (Skiba & Smith, 2000).

### 1.1.6 Activités biologiques du sol

Les microorganismes 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).

De nombreuses études ont montré que les plantations d'arbres peuvent entraîner des modifications des propriétés chimiques du sol (Priha *et al.*, 1999 ; Marschner *et al.*, 2005), des activités biologiques notamment la minéralisation du C et du N du sol (Chaussod, 1996, Marschner *et al.* 2005 ; Berg *et al.*, 2008, Ndour *et al.*, 2001 ; Duponnois *et al.*, 2001 ; Kourtev *et al.*, 2002 ; Ehrenfeld *et al.*, 2001), des structures génétiques des communautés microbiennes (Kourtev *et al.*, 2003 ; Priha *et al.*, 1999).

La respiration du sol, encore appelée minéralisation du C, est l'oxydation biologique de la matière organique en CO<sub>2</sub>. Cette analyse permet d'évaluer l'activité métabolique des microorganismes.

### 1.1.7 Structure génétique des communautés microbiennes

Le développement récent de nouvelles méthodes de type « empreinte moléculaire » appliquées directement à partir de l'ADN extrait du sol a été à l'origine de nouvelles approches. Ces approches ont permis de caractériser toute la diversité des communautés microbiennes dans les sols tout en s'affranchissant des biais dus aux techniques de cultures (Ranjard *et al.*, 2000).

L'avènement des outils de biologie moléculaire a permis de contourner cet obstacle de culture et a permis de caractériser toute la diversité microbienne dans les sols. L'approche utilisée consiste à extraire les acides nucléiques (ADN ou ARN) directement à partir des échantillons environnementaux, puis à évaluer la variabilité des séquences d'une partie plus ou moins conservée du génome présente chez toutes les bactéries (par exemple la région V3 de l'ADNr 16S pour l'étude de la communauté bactérienne totale).

La technique PCR-DGGE « Polymerase Chain Reaction & Denaturing Gradient Gel Electrophoresis » décrite par Muyzer *et al.*, (1993) a été utilisée en écologie microbienne pour caractériser cette diversité des communautés microbiennes. D'après ces auteurs, la DGGE permet d'appréhender toutes les populations bactériennes représentant au moins 1% des effectifs totaux. L'utilisation de la DGGE pour l'analyse de la diversité génétique des communautés permet de suivre la distribution et l'abondance relative des espèces dominantes.

Les microorganismes interviennent de manière très importante dans les cycles biogéochimiques des éléments majeurs (C, N, P, S) et des oligoéléments. Ils sont impliqués dans les différentes fonctions du sol entre les différents compartiments qui structurent le système sol-plante-atmosphère. La structure des communautés fonctionnelles (notamment fixatrices libres d'azote, nitrification et dénitrification) dans les sols a pu également être caractérisée grâce aux outils moléculaires en ciblant des gènes fonctionnels impliqués dans ces processus du sol. Webster *et al.*, 2002, Enwall *et al.*, 2007 en ciblant le gène amoA 16S rRNA a montré la diversité des communautés nitrifiantes dans les sols sous différents amendements organiques. Les travaux de Diallo *et al.*, (2007) ont montré l'impact d'*Acacia tortilis* ssp. *raddiana* et de *Balanites aegyptiaca* sur la diversité des communautés diazotrophes dans les sols en ciblant le gène fonctionnel nifH. Braker *et al.* (1998) et Bremer *et al.*, (2007) ont utilisé le gène nirK pour étudier l'impact de différentes espèces de plantes sur la structure des communautés dénitrifiantes dans les sols de forêt.

## 1.2 ACACIA SENEGAL

### 1.2.1. Introduction

*Acacia senegal* encore appelé gommier blanc est une espèce d'arbre ou d'arbuste originaire d'Afrique. Selon la classification, il appartient :

Règne : *Plantae* ;

Sous-règne : *Tracheobionta* ;

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida* ;

Sous-classe : *Rosidea* ;

Ordre : *Fabales* ;

Famille : *Mimosaceae* ;

Sous-famille : *Mimosoideae* ;

Genre : *Acacia*

### 1.2.2. Description botanique

*Acacia senegal* (figure 4) est un arbre ou arbuste épineux, de 2 à 6 m (rarement 8 m) avec couronne en parasol. Très rameuses, les branches sont très ramifiées, les rameaux supérieurs sont divergents et ascendants. L'écorce est gris clair à brun clair et lisse sur les jeunes rameaux. La tranche est marbrée rouge et blanche. Les épines sont par trois et les griffes acérées, les deux latéraux sont courbés vers le haut et la médiane vers le bas. Les feuilles, petites vert gris sont bipennées avec 3 à 6 paires de pinnules ayant 10 à 20 paires de foliolules ovales de 3 à 6 mm de long et 1 à 2 mm de large. Les fleurs sont situées sur les épis de 3 à 8 cm, blancs, pédonculés, insérés par 2 ou 3 par fascicules axillaires. Les gousses de 7 à 10 cm de long, de 2 cm de large, sont aplaties finement pubescentes, grisâtres, et contenant 3 à 6 graines aplaties, rondes, brun clair. La période de floraison se situe avant les premières pluies, mais parfois aussi en fin de saison de pluies.



**Figure 4:** Photo d'*Acacia senegal* (source K. Assigbetsé) à Dahra, 2009.

### 1.2.3. Répartition et Habitat

*Acacia senegal* est un arbre typique du sahel, il est caractéristique des zones sèches situées au sud du Sahara, depuis les côtes mauritaniennes et sénégalaise jusqu'à la Somalie. Il est également présent en Afrique du Sud et orientale avec différentes variétés. C'est une espèce très résistante au sec, poussant sous 100 à 800 mm des pluies, de préférence avec 300 à 400 mm et une période de sécheresse de 8 à 11 mois. *A. senegal* préfère les sols sableux et les dunes rouges. Il prospère aussi sur les sols limoneux légers, les sols bruns argileux, sur les grès argileux et mêmes sur les lithosols. L'espèce ne pousse qu'exceptionnellement sur des sols argileux lourds avec 800 mm de pluie par an. Les peuplements économiquement intéressants se situent en Mauritanie, au Mali, au Niger au Tchad et au Soudan (Sall, 2007).

### 1.2.4. Utilisations

*A. senegal* fournit 90 % de la gomme arabique mise sur le marché international. Il surpasse en qualité tous les autres Acacias. La gomme est un produit d'exportation très important. Les quantités vendues dépendent beaucoup du climat. Le rendement varie beaucoup d'un arbre à l'autre et d'une année à l'autre et oscille entre 100 et 1000 g (jusqu'à 10 kg au Soudan), mais avec une moyenne de 250 g au moins dans un bon peuplement (au Cordofan 500 à 2000 pieds par ha).

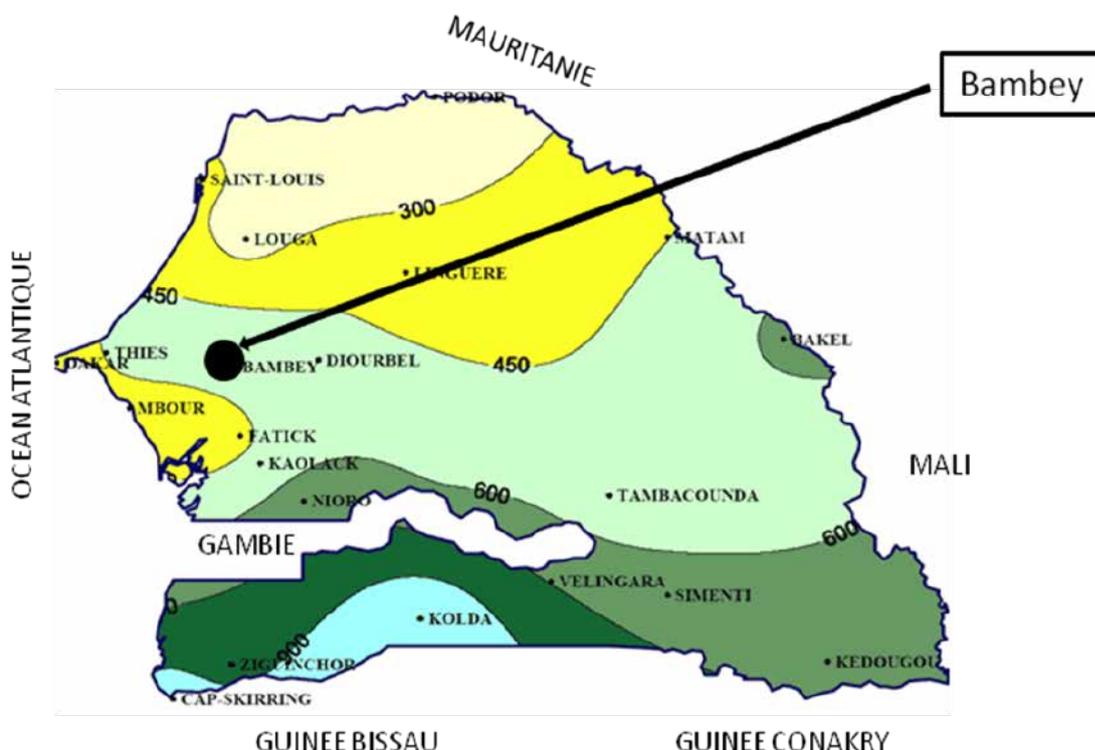
La population locale consomme des quantités importantes pour la préparation des plats spéciaux et pour la médecine humaine ou vétérinaire, ainsi que pour des cosmétiques et des œuvres d'art. La gomme arabique est particulièrement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire, dans le domaine du textile, elle est aussi utilisée comme émulsifiant pour les huiles d'agrumes, dans l'industrie du papier (collage des étiquettes, enveloppes). *A. senegal* convient particulièrement dans les projets de revégétalisation et pour la fixation des dunes (agroforesterie), pour l'amélioration des sols par l'apport de litière organique et par la fixation de l'azote. Au Soudan, *A. senegal* a toujours contribué de façon significative à l'augmentation des recettes d'exportation du pays (Sall, 2007).

# Chapitre 2 : **MATERIEL ET METHODES**

## 2.1 MATERIEL

### 2.1.1 Présentation du site d'étude

Le site de notre dispositif d'étude est situé dans la station expérimentale de l'ISRA (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles) de la ville de Bambey. La ville de Bambey est située dans la région de Diourbel, au centre-ouest du pays dans l'ancien bassin arachidier sénégalais. Bambey est situé sur une longitude 16°46' O et une latitude 14°71'N. Les habitants sont pour la plupart des Sérères, des Wolofs, des Laobés, et des Peuls, avec une densité de 187 hbts/km<sup>2</sup>. L'agriculture est la principale activité locale, avec la culture du mil, d'arachide, de maïs et de la canne à sucre. Ensuite, viennent comme activités secondaires l'élevage extensif, l'artisanat et le commerce.



**Figure 5** : Situation géographique du site de l'expérimentation.

Le climat est de type sahélo-soudanien tropical, plutôt sec, avec deux saisons:

- une saison sèche très longue qui va de Novembre à Mai,
- une saison pluvieuse de Juin à Octobre.

La pluviométrie est faible, en moyenne 400 à 500 mm par an et les températures extrêmes sont comprises entre 19°C et 40°C. Bambey est situé sur un sol plat presque sans relief. Le sol est ferrugineux tropical peu lessivé, de type sableux avec 3,86% d'argile, 5,52% de limon et 24,9% de sable. Ce sol réagit de façon spectaculaire au chaulage.

La végétation est formée d'espèces ligneuses dominées par des épineuses comme *Acacia albida*, *Balanites aegyptica* et *Adansonia digitata*. La verdure est très marquée pendant la saison des pluies.

### 2.1.2 Dispositif expérimental et échantillonnage

Les études ont été réalisées sur des plantations d'*A. senegal* de différentes provenances mises en place en 1994 par le CNRF (Centre National de Recherches Forestières). L'essai est un dispositif en 3 blocs complètement randomisés avec 16 traitements. Les traitements correspondent aux provenances d'*A. senegal* originaires de 9 pays (Tableau 1).

Les blocs sont divisés en parcelles et sur chaque parcelle on a planté 25 individus d'une seule provenance d'*A. senegal*. Sur chaque parcelle, les prélèvements de sol ont été effectués sous 5 arbres avec 3 points de prélèvements de sol autour de chaque arbre. Les sols sont ensuite mélangés pour en faire un échantillon composite. Les sols sont prélevés dans l'horizon 0 – 25 cm en 2008.

**Tableau 1:** Liste des Provenances d'*A. senegal* et pays d'origine

Provenances	Pays d'origine
Bissiga	Burkina Faso
Burkina	
Sodéra	Ethiopie
Djigueri	Mauritanie
Kankossa	
Karofane	Niger
Diaménar	Sénégal
Kidira	
Ngane	
Daiba	
Aité	Mali
Kirane	
Somo	
Tchad	Tchad
Soudane	Soudane
Pakistan	Pakistan

## 2.2 METHODES

Pour chaque technique appliquée, nous avons utilisé 3 répétitions d'échantillonnage.

### 2.2.1 Propriétés physiques du sol : la granulométrie

Les particules minérales d'un sol peuvent être isolées, triées et classées suivant leur taille, c'est le principe de l'analyse granulométrique. Cette analyse est effectuée au LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques) de l'IRD/Bel-Air. Dix grammes de sol tamisés à 2 mm sont mis dans

un erlen de 250 ml, humectés avec un peu d'eau déminéralisée, et sont attaqués par 50 ml d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diluée (30%) pour la destruction de la matière organique. L'extrait est transvasé dans un flacon rempli au trois quarts avec de l'eau déminéralisée. Vingt cinq ml de pyrophosphate de sodium à 65 g/l sont ajoutés. La solution obtenue est transvasée dans une allonge ; puis ajustée à un litre et bouchée. Les argiles (limons grossiers et les limons fins) sont obtenues par prélèvement, tandis que les sables par tamisage ( $\phi$  200  $\mu$ m et 50  $\mu$ m).

### **2.2.2 Propriétés chimiques du sol**

Le carbone total, l'azote total et le phosphore total, ainsi que le pH du sol et la capacité d'échange cationique (CEC) ont été étudiés au Laboratoire LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques) de l'IRD/Bel-Air certifié Iso 9001-2008.

#### **2.2.2.1 pH du sol**

La mesure du pH d'un sol permet de définir son état d'acidité ou d'alcalinité (ou son statut acido-basique). Le pH du sol a été mesuré selon le ratio 1:2,5 (poids : volume) avec de l'eau ou du KCl 2 M. Ainsi, on détermine le pH dans la suspension formée à l'aide d'une électrode combinée à un pH-mètre (Mettler Toledo 320).

#### **2.2.2.2 Dosage du phosphore total**

Le phosphore total a été déterminé par colorimétrie selon la méthode de Murphey & Riley (1962). Un gramme (1 g) de sol est versé dans 10 ml d'acide nitrique concentré et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré à ébullition pendant 5 heures. Le phosphore total est dosé par colorimétrie automatique avec formation d'un complexe jaune de phosphomolybdate qui est réduit par l'acide ascorbique et prend une couleur brune.

#### **2.2.2.3 Dosage du carbone total et de l'azote total**

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

Les échantillons de sol (40 à 60 mg) broyés et tamisés (0,2 mm) sont mis à l'étuve (environ 105°C) une nuit pour y être séchés. Ils sont ensuite mis à refroidir 1 h dans un dessiccateur. Le dosage s'effectue à l'aide de l'appareil CHN où l'élimination des matières organiques est assurée par un brûleur atteignant une température de 900°C, accentuée par l'utilisation de nacelles en étain (la température atteint alors 1800°C). Cette combustion permet d'obtenir du carbone et de l'azote. Ces deux composés passent ensuite dans un catalyseur d'oxydation (900°C) où le carbone est transformé en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>). Ce CO<sub>2</sub> et l'azote sont transférés dans une colonne de réduction chauffée à 750°C dans laquelle le monoxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) va être transformé en N<sub>2</sub>.

La séparation des deux composés est faite par chromatographie en phase gazeuse utilisant l'hélium comme gaz vecteur qui accélère l'extraction des gaz (CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>). Dans le chromatographe, les différents constituants gazeux sont séparés par le détecteur à conductibilité thermique. Les quantités de carbone et d'azote sont calculées avec le logiciel EAGER 300 for EA 1112.

#### **2.2.2.4 Extraction des cations échangeables**

La capacité d'échange d'un sol correspond à la quantité totale de cations que le complexe d'échange du sol peut fixer. Les cations échangeables (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) du sol sont déplacés

par percolation avec une solution normale d'acétate d'ammonium à pH 7. Les cations extraits sont dosés au spectrophotomètre par absorption atomique.

### **2.2.3 Densité et activité microbiologique**

#### **2.2.3.1 Biomasse microbienne**

La biomasse microbienne est l'ensemble des micro-organismes du sol. Ces micro-organismes participent notamment à la dégradation de la matière organique en éléments minéraux assimilables par la plante. Elle a été déterminée par la méthode fumigation extraction (Amato et Ladd, 1988). Cette méthode repose sur le dosage colorimétrique de l'azote  $\alpha$ -aminé des parois bactériennes. Le dosage est effectué à T0 et après une incubation de 10 jours (T10) d'un échantillon de sol humide dans un milieu saturé en chloroforme (fumigation). La différence entre le T0 et le T10 représente l'azote  $\alpha$ -aminé apparu au cours de la fumigation et provenant de la lyse des micro-organismes du sol par le chloroforme. Cet azote  $\alpha$ -aminé est fonction de la quantité de micro-organismes présents dans le sol avant la fumigation. La réaction est basée sur la formation d'un composé de couleur pourpre qui apparaît lorsque l'azote est mis en présence de réactif à la ninhydrine. La lecture de la densité optique se fait à la longueur d'onde de 570 nm à pH 5,5. La quantité de carbone présent dans la biomasse est calculée en multipliant le gain d'azote  $\alpha$ -aminé libéré lors de l'incubation par le facteur 21 (Amato et Ladd, 1988). Les résultats sont exprimés en mg C/g de sol.

#### **2.2.3.2 Minéralisation du carbone**

La minéralisation du carbone est l'oxydation biologique de la matière organique en CO<sub>2</sub>. Elle permet d'évaluer l'activité biologique des micro-organismes du sol, et est basée sur la mesure du dégagement du CO<sub>2</sub> par rapport au volume total d'air en fonction du temps. Les échantillons de sol sont pesés (25 g/ flacon) et humidifiés à 5 % de la capacité au champ (1,25 ml d'eau pour 25 g de sol). Ils sont ensuite enfermés hermétiquement dans des flacons en verre de 120 ml munis de bouchons étanches.

Au temps T0, les flacons sont dégazés (flush) à l'air comprimé puis incubés à l'étuve à 28°C pendant 15 jours. Le flux de CO<sub>2</sub> est mesuré tous les jours par injection directe dans un chromatographe à phase gazeuse de type SRA (Analytical Instruments, MTI P200, Microsensor Technology Inc.), couplé à un ordinateur, piloté par un logiciel EZCHROM 200/400. Les résultats exprimés en % du volume du flacon sont calculés en tenant compte des valeurs de T0.

### **2.2.4 Structure génétique des communautés bactériennes totales et spécifiques**

L'étude de la structure des communautés bactériennes permet de connaître la diversité structurale de ces communautés en terme de présence ou d'absence. La diversité de la communauté bactérienne totale a été étudiée par la technique PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) appliquée au gène ribosomal 16S (16S rDNA PCR-DGGE). Les communautés dites fonctionnelles nitrite réductase, ammonium-mono-oxygénase et diazotrophes ont été caractérisées respectivement par la PCR-DGGE en ciblant les gènes *nirK*, *amoA* et *nifH*. Cette caractérisation de la diversité structurale des communautés microbiennes se fait en plusieurs étapes : extraction de l'ADN du sol suivie de la PCR puis de la DGGE.

#### 2.2.4.1 Extraction de l'ADN du sol

Le principe de l'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) total du sol repose sur une lyse physique des cellules directement dans la matrice du sol, suivie d'une élimination partielle des principaux contaminants (protéines, polysaccharides, acides humiques). Ce premier extrait d'ADN est alors concentré puis purifié une deuxième fois par l'usage d'un kit commercial. La méthode utilisée ici a été initialement développée par Porteous *et al.*, (1997) et modifiée (Assigbetsé *et al.*, 2005) (annexe 1).

Pour un échantillon de sol donné, 3 extractions indépendantes ont été réalisées puis les 3 extraits ont été poolés.

Un échantillon de 0,5 g de sol broyé et tamisé à 0,2 mm est ajouté à 0,5 g de billes de zirconium stériles (diamètre 0,1-0,75 mm) auquel on rajoute 1 ml de tampon de lyse (NaCl 0,25 M ; EDTA 0,1 M ; pH 8). Deux passages alternés, agitateur "bead-beater"-bain marie (65°C), assurent la dispersion physique et l'éclatement des cellules. Ensuite, une centrifugation (13000 g, 15 min, 4°C) permet de séparer la phase aqueuse (contenant entre autres les acides nucléiques en solution) de la phase solide (sol et débris). Cette phase aqueuse est alors récupérée par pipetage (600 µl) et les acides nucléiques précipités à l'acétate de potassium (CH<sub>3</sub>COOK) 5 M (75 µl) et au polyéthylène glycol 8000 à 40% (250 µl) pendant 2 heures à -20°C. Après centrifugation (13000 g, 15 min, 4°C), le culot d'ADN est incubé à 68°C en présence d'une solution (600 µl) de CTAB 2% (1,4 M NaCl; 0,1 M EDTA; CTAB 2%) jusqu'à dissolution complète. La purification se poursuit par agitation modérée en présence de chloroforme (600 µl), suivie d'une centrifugation à 13000 g pendant 10 min à la température ambiante. La phase supérieure qui contient l'ADN est remise dans 600 µl d'isopropanol (CH<sub>3</sub>CHOHCH<sub>3</sub>) et conservée à -20°C pendant 15 mn afin de précipiter les acides nucléiques. Après centrifugation du mélange (13000 g, 15 min, 4°C) et élimination du surnageant, le culot est lavé avec 450 µl d'acétate d'ammonium (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) 2,5 M et 1 ml d'éthanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) 95° puis précipité à -20°C pendant 15 mn. Le mélange est ensuite centrifugé à 13000 g pendant 15 min à 4°C et le culot est lavé avec de l'éthanol 70°. Enfin, le culot d'ADN récupéré après centrifugation à 13000 g pendant 5 min à 4°C est séché dans une cloche à vide partiel, puis suspendu dans un volume variant entre 10 et 50 µl de TE 1 X (Tris-HCl 10 M, EDTA 1 mM, pH 8,5). L'extrait brut obtenu est purifié à l'aide du kit commercial Wizard® DNA Clean-Up System. L'extrait d'ADN est ensuite quantifié à l'aide des gammes étalons (dilution sérielle 1/2 d'ADN de thymus de veau de 400 à 12,5 ng/10 µl) (annexe 2) afin de mesurer sa concentration dans chaque échantillon. L'ADN est conservé à -20°C jusqu'à utilisation pour les amplifications PCR.

#### 2.2.4.2 Etude de la structure des communautés bactérienne totale et fonctionnelles

L'étude de la structure des communautés bactériennes totales et fonctionnelles permet de caractériser la diversité structurale des communautés bactériennes du sol. Cette étude se fait par des méthodes de fingerprint moléculaire. Nous avons choisi la méthode de PCR-DGGE pour cette étude de structure des communautés.

##### 2.2.4.2.1 La technique PCR (Polymerase Chain Reaction)

La technique PCR décrite par Mullis *et al.*, (1985) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques

complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces.

Cette technique a pris un essor considérable avec l'introduction d'une ADN polymérase résistante à la chaleur. Cette ADN polymérase ou Taq polymérase est extraite d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*). Elle permet une automatisation des différents cycles (dans des appareils appelés thermocycleurs). Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40. Cette méthode permet d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 105 à 106. Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres: concentration en MgCl<sub>2</sub>, concentration en amorces, spécificité des amorces etc...

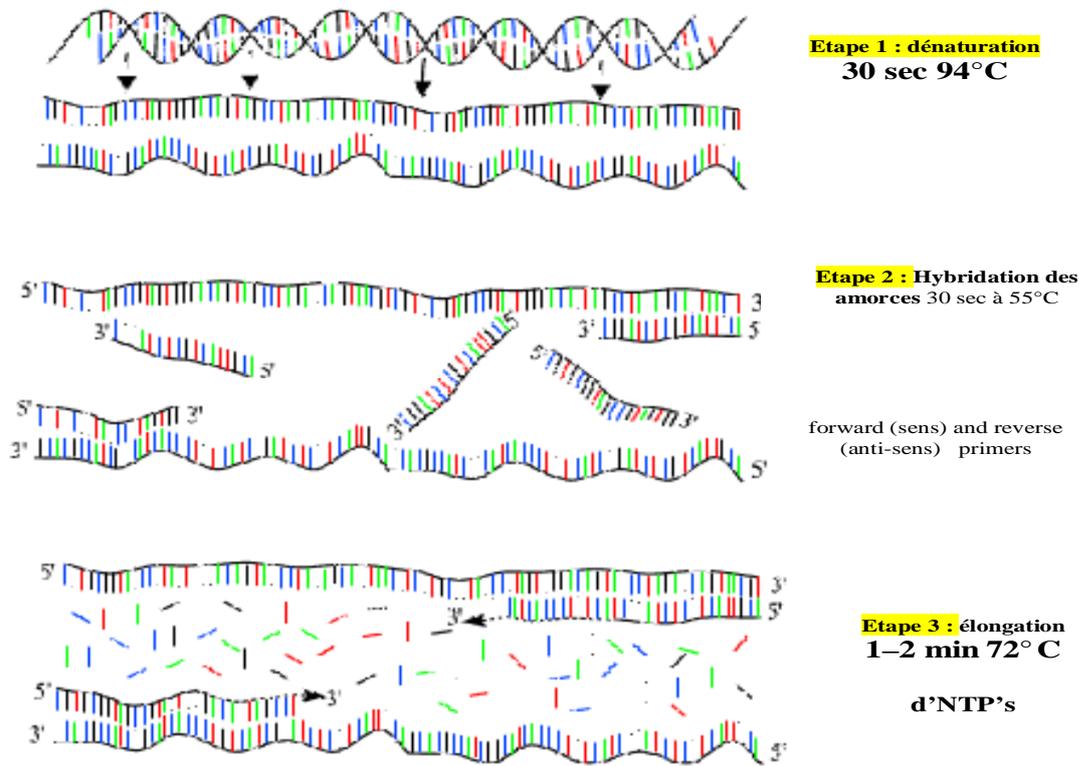
Le choix des amorces est particulièrement crucial pour obtenir des résultats satisfaisants (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques.....).

Les réactions de PCR sont constituées de plusieurs 'cycles PCR' permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Ainsi, les produits PCR obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant. L'amplification est donc dite exponentielle.

La technique PCR comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases :

- une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92-95°C) (30 sec à 1 min).
- une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55-60°C. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 sec à 1 min).
- une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70-72°C (1-2 minutes). Au cours de cette étape les brins complémentaires d'ADN sont alors synthétisés à partir des extrémités 3'OH des amorces hybridés.

## PCR: Réaction de polymérisation en Chaîne



**Figure 6:** La réaction en chaîne par polymérisation (PCR), (Vierstraete, 1999).

Toutes les réactions de PCR sont automatisées et réalisées à l'aide des thermocycleurs GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

### a. Structure de la communauté bactérienne totale

Pour l'étude de la structure de la communauté bactérienne totale, la région variable V3 de l'ADN ribosomique 16S commune à toutes les bactéries a été amplifiée en utilisant un couple d'amorces GC338f (Ovreas *et al.*, 1997) et 518r (Muyzer *et al.*, 1993).

Un mélange réactionnel de 25 µl est préparé pour la PCR. Il est composé de :

- 1,25 ng d'ADN à une concentration de 2,5 ng/µl,
- des amorces (2,5 µl/amorce) GC338f et 518r à une concentration finale de 10 µM.
- Taq Ready-to-Go (PuRe Taq Ready-To-Go™, Amersham, France) (Annexe 3)

Le cycle thermique dit « Touchdown PCR » a été utilisé pour l'amplification de l'ADNr 16S des communautés bactériennes totales. Elle comprend plusieurs cycles de température :

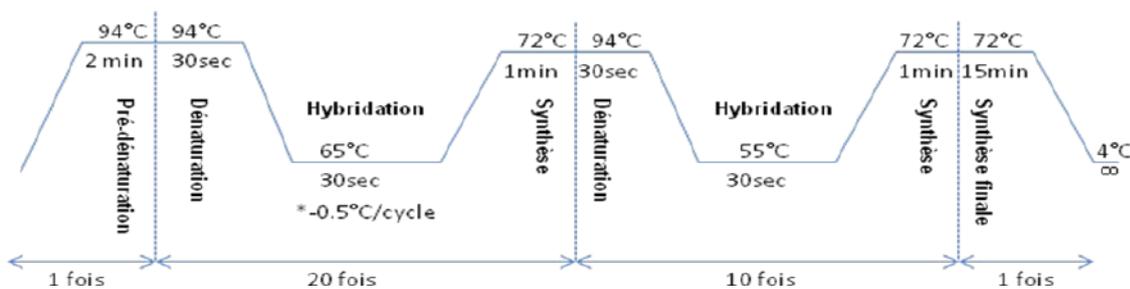
- une première étape de dénaturation de l'ADN de 2 mn à 94°C afin d'activer l'ADN polymérase du mix Taq Ready-to-Go.
- 20 premiers cycles constitués de :
  - o 30 sec à 94°C (dénaturation)
  - o 30 sec de 65°C (hybridation ; cette température d'hybridation diminue de 0,5°C à chaque cycle jusqu'à atteindre 55°C

- 1 mn à 72°C (élongation ou synthèse)
- 10 derniers cycles constitués de :
  - 30 sec à 94°C (dénaturation)
  - 30 sec à 55°C (hybridation)
  - 1 min à 72°C (synthèse)
- un dernier cycle de synthèse finale à 72°C pendant 15 mn.

Toutes les réactions de PCR sont automatisées et réalisées à l'aide des appareils thermocycleurs GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)

Les fragments d'ADN amplifiés (environ 220 pb) sont séparés sur un gel d'agarose à 1,5% pendant 30 mn à 100 V. Les gels sont ensuite colorés pendant 30 mn au bromure d'éthidium (1 µg/ml), rincés à l'eau déminéralisée puis photographiés sous UV à l'aide du logiciel BIO-Capt (Ets Vilber Lourmat, France).

La figure 7 présente une description schématique des différentes étapes du cycle thermique PCR utilisé lors de l'amplification du gène ADNr 16S de la communauté bactérienne totale.



**Figure 7 :** Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène ADNr16S marqueur de la communauté bactérienne totale

### b. Structure de la communauté bactérienne dénitrifiante

Le gène nirk (gène marqueur d'une partie des communautés bactériennes dénitrifiantes) a été amplifié en utilisant le couple d'amorce R3Cu-GC et F1aCu (Throbäck *et al.*, 2004). Ces amorces génèrent des fragments d'environ 472 pb.

Le mélange réactionnel de 25 µl est composé de :

- amorces à une concentration finale de 10 µM,
- l'ADN à une concentration de 2,5 ng/µl,
- Taq Ready-to-Go (PuRe Taq™Ready-To-Go™) .

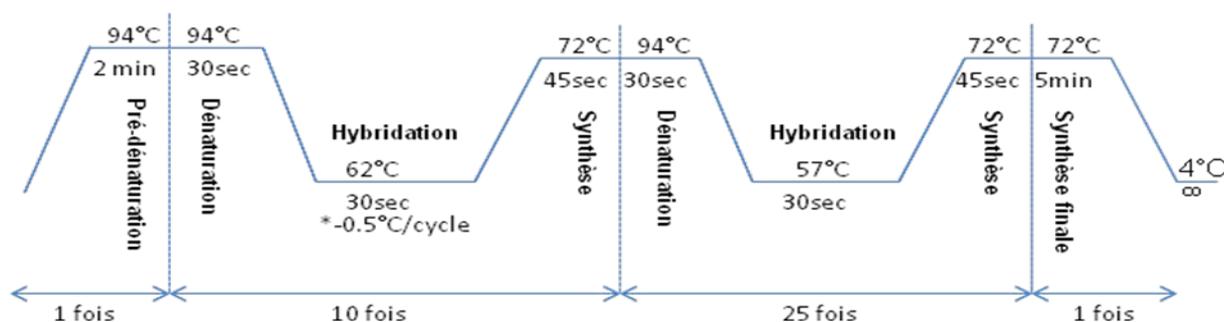
Le cycle thermique (Figure 8) comprend les phases suivantes :

- une phase de dénaturation de l'ADN de 2 min à 94°C.
- 10 cycles d'amplification constitués chacun :
  - d'une dénaturation de 30 sec à 94°C,

- une hybridation par touch down de 30 sec de 62°C (le touch-down consiste en une diminution de la température d'appariement de 0,5°C à chaque cycle),
- élongation de 45 sec à 72°C.
- 25 cycles d'amplification constitués chacun :
  - d'une dénaturation de 30 sec à 94°C,
  - suivi d'une hybridation de 30 sec de 57°C,
  - une élongation de 45 sec à 72°C.
- un dernier cycle de synthèse finale à 72°C pendant 5 min.

Les fragments d'ADN amplifiés (environ 400 pb) sont séparés sur un gel d'agarose 1,5% pendant 30 mn à 100 V. Les gels sont ensuite colorés pendant 30 mn au bromure d'éthidium (1 µg/ml), puis rincés à l'eau déminéralisée et photographiés sous UV à l'aide du logiciel BIO-Capt (Ets Vilber Lourmat).

La figure 8 présente une description schématique des différentes étapes du cycle thermique PCR utilisé lors de l'amplification du gène *nirk*.



**Figure 8 :** Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène *nirk* (nitrite réductase) marqueur des communautés dénitrifiantes

### c. Structure de la communauté bactérienne nitrifiante

Le gène *amoA* a été amplifié en utilisant le couple d'amorces *amoA1F-GC* (Rottauwe *et al.*, 1997) et *amoA-2R* (Rottauwe *et al.*, 2003). Ces amorces génèrent des fragments d'environ 491 pb du gène codant une sous-unité de l'ammonium monooxygénase.

Le mélange réactionnel de 25 µl est composé de :

- amorces à une concentration finale de 10 µM,
- l'ADN à une concentration de 5 ng/µl,
- Taq Ready-to-Go (PuRe Taq<sup>TM</sup>Ready-To-Go<sup>TM</sup>),
- 0,5µl de BSA.

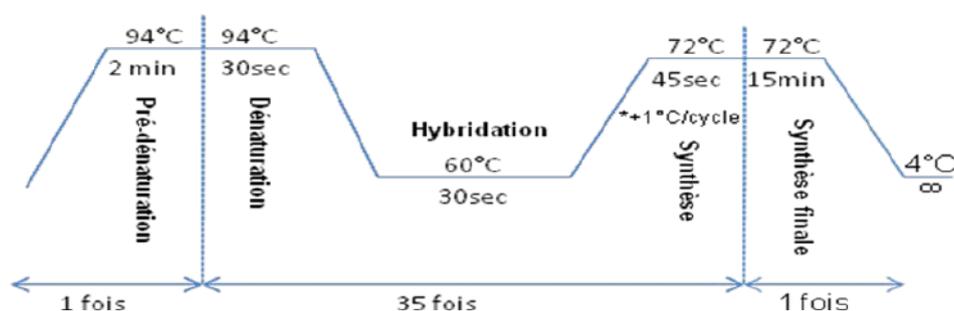
Le cycle thermique (Figure 9) comprend les phases suivantes :

- une phase de dénaturation de l'ADN de 2 min à 94°C.
- 35 cycles d'amplification constitués chacun :

- d'une dénaturation de 30 sec à 94°C,
  - une hybridation de 30 sec à 60°C,
  - élongation de 45 sec à 72°C (le touch-down consiste en une augmentation de la température d'appariement de 1°C à chaque cycle),
- un dernier cycle de synthèse finale à 72°C pendant 15 min.

Les fragments d'ADN amplifiés (environ 491 pb) sont séparés sur un gel d'agarose 1,5% pendant 30 mn à 100 V. Les gels sont ensuite colorés pendant 30 mn au bromure d'éthidium (1 µg/ml), puis rincés à l'eau déminéralisée et photographiés sous UV à l'aide du logiciel BIO-Capt (Ets Vilber Lourmat, France).

La figure 9 présente une description schématique des différentes étapes du cycle thermique PCR utilisées lors de l'amplification du gène *Amoa*.



**Figure 9 :** Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène *amoA* marqueur des communautés ammonifiantes

#### d. Structure des communautés diazotrophes

La structure des communautés diazotrophes a été étudiée en ciblant le gène *nifH* des microorganismes fixateurs libres d'azote dans le sol. Ce gène a été amplifié en utilisant 2 couples d'amorces FGPH 19 (Simonet *et al.*, 1991), PolR (Poly *et al.*, 2001) et AQER (Poly *et al.*, 2001) et PolF-GC (Poly *et al.*, 2001). L'étude consiste à faire une première PCR ciblant une région précise avec les amorces FGPH 19 et PolR afin d'augmenter la sensibilité pour l'identification du gène marqueur. Les fragments d'ADN obtenus d'environ 429 pb servent d'ADN matrice pour une deuxième amplification du gène cible en utilisant le couple d'amorces AQER et PolF-GC. Cette dernière amplification génère des fragments d'environ 320 pb.

Pour chaque PCR, le mélange réactionnel (25 µl) contient :

- 10 µM de chaque amorce,
- la Taq polymérase Ready-To-Go,
- de l'ADN (5 ng/µl) d'ADN pour la première PCR et une dilution au 1/100 du produit de la première PCR (ADN matrice pour la deuxième PCR).
- BSA 0,5 µl

Les cycles thermiques (Figure 10) comportent les phases suivantes :

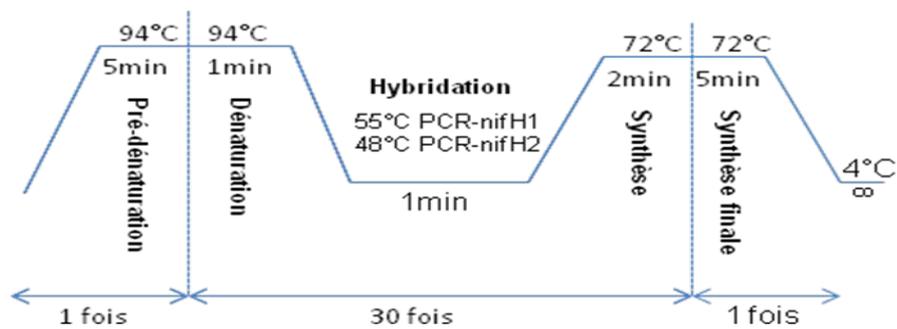
- une première phase de dénaturation de l'ADN de 5 min à 94°C.
- 30 cycles constitués chacun :

- o de 1 min à 94°C de dénaturation,
- o de 1 min à 55°C pour la première PCR et à 48°C pour la deuxième PCR pour l'hybridation
- o et de 2 min à 72°C d'élongation ou de synthèse.

- un dernier cycle d'élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Les fragments d'ADN amplifiés (environ 400 pb) sont séparés sur un gel d'agarose à 1,5% pendant 30 mn à 100 V. Les gels sont ensuite colorés pendant 30 mn au bromure d'éthidium (1 µg/ml), puis rincés à l'eau déminéralisée et photographiés sous UV à l'aide du logiciel BIO-Capt (Ets Vilber Lourmat, France).

La figure 10 présente une description schématique des différentes étapes du cycle thermique PCR utilisées lors de l'amplification du gène nifH de la communauté bactérienne diazotrophe.



**Figure 10 :** Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène nifH marqueur des communautés diazotrophes

Le tableau 2 présente l'ensemble des gènes ciblés, leur fonction et les séquences des amorces qui permettent de les amplifier.

**Tableau 2:** Séquence des amorces et gènes cibles des communautés microbiennes étudiées.

Fonction cible	Gènes ciblés	Amorce	Séquences	Taille	Communautés	Auteurs
	16S rDNA	GC338f  518r	5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGGATC CCTACGGGAGGCAGCAG 3'  5' ATT ACCGCGGCTGG 3'	220 pb	Bactériennes totales	Ovreas <i>et al.</i> , (1997)  Muyzer <i>et al.</i> , (1993)
Nitrification	AmoA	AmoA1F-GC  AmoA-2R	5' CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCG GGGTTTCTACTGGTGGT-3'  5' CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC 3'	491 pb	Bactériennes nitrifiantes	Rotthauwe <i>et al.</i> , (1997) Rotthauwe <i>et al.</i> , (1997)
Dénitrification	Nirk	R3Cu-GC  F1aCu	5' GGC GGC GCG CCG CCC GCC CCG CCC CCG TCG CCC GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT 3'  5' ATCATGGTSTGCGCG 3'	472 pb	Bactériennes dénitrifiantes	Throbäck <i>et al.</i> , 2004  Throbäck <i>et al.</i> , 2004
Fixateurs libres	nifH	PolR  PolF-GC  FGPH19  AQER	5' ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA 3'  5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GTG CGA YCC SAA RGC BGA CTC3'  5' TAC GGC AAR GGT GGN ATH G3'  5' GAC GAT GTA GAT YTC CTG3'	429 pb    320 pb	Bactériennes diazotrophes	POLY <i>et al.</i> , 2001  POLY <i>et al.</i> , 2001  Simonet <i>et al.</i> , (1991)  POLY <i>et al.</i> , 2001

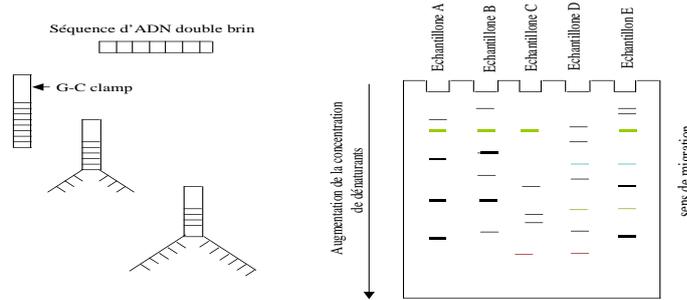
#### 2.2.4.2.2. La DGGE (Gel Electrophorèse en Gradient de Dénaturation)

La DGGE est une technique d'empreinte génétique qui consiste en une séparation des séquences amplifiées par PCR sur un gel d'acrylamide contenant un gradient linéaire de dénaturants de l'ADN. Il s'agit de dénaturants chimiques (urée et formamide) dont le gradient de concentration utilisé varie en fonction de la taille des amplifiats à séparer. Les variations de séquences entre les différents amplifiats vont influencer leur dénaturation et par conséquent leur distance de migration électrophorétique. Ainsi les séquences d'ADN ayant une plus forte concentration en bases G et C (high G+C avec une triple liaison hydrogène) vont migrer plus loin dans le gel avant d'atteindre leur point de dénaturation. On obtient ainsi des profils complexes représentatifs de la diversité des fragments d'ADN amplifiés.

Dans notre étude, les fragments d'ADN obtenus après amplification par PCR sont séparés sur un gel de polyacrylamide à 8% [acrylamide-bisacrylamide 40 % (37.5 :1)] contenant

des gradients de dénaturants chimiques de 45 % à 70 % (annexe 4) (100 % dénaturant contient 7 M Urée et 40% formamide). La migration dure 18 h dans une cuve (INGENY phorU) sous une tension de 100V. Elle s'effectue dans un tampon TAE 1X (annexe 3) à une température de 60°C. A la fin de la migration, le gel est coloré au Sybr Green (1/20) pendant 20 mn puis rincé à l'eau pendant 5 mn. La visualisation du gel est faite par photographie sous UV à l'aide du logiciel BIO-Capt (Ets Vilber Lourmat).

### Principe de la DGGE :



**Figure 11** : Description schématique de l'électrophorèse en gradient de gel de dénaturation (DGGE).

### 2.2.5 Analyses statistiques

Nous avons utilisé les méthodes classiques de comparaison des moyennes des traitements avec le logiciel XLSAT (version 2010 ; Addinsoft, USA) (test de Fisher ;  $p < 0,05$ ), et l'analyse de la variance Anova pour estimer les variations des paramètres chimiques (C, N, P totaux et CEC) et biochimiques (mesures des activités microbiennes) dans les sols.

Pour l'analyse des profils DGGE, nous avons utilisé le logiciel TotalLab (TL120, version 2006 ; Digilab, Inc USA) pour déterminer les similarités et les distances entre les différents profils DGGE. Ce même logiciel a servi à l'établissement des dendrogrammes de similarité en calculant le coefficient de Dice (intervalle de confiance de 0,05 %) avec la méthode de l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Algorithm).

## Chapitre 3: RESULTATS

### 3.1 PROPRIETE PHYSIQUE : la granulométrie

Le tableau 3 montre les résultats des analyses granulométriques exprimés en pourcentages d'argile, limons fins, limons gros, sables fins, sables gros sous *A. senegal* ainsi que hors-couvert d'*A. senegal*. Ces résultats indiquent que le pourcentage de sable fin constitue la fraction dominante avec plus de 50% dans les blocs, suivi de sable gros plus de 20% et argile plus de 10%. Cependant les limons représentent une faible fraction (seulement 10%) dans les sols.

**Tableau 3:** Texture des sols sous *A. senegal* de différentes provenances.

Bloc	Argile %	Limons fins%	Limons gros%	Sables fins%	Sables gros%	Total%
Bloc1	9,5	2,8	8,9	54,9	22,4	98,5
Bloc2	11,7	0,93	9,0	53,5	22,7	97,7
Bloc3	11,6	1,8	9,0	54,4	23,7	100
HC	12,3	2,5	8,3	54,8	23,5	101

### 3.2 IMPACT D'A. SENEGAL SUR LES PROPRIETES CHIMIQUES DU SOL

**Tableau 4 :** Valeurs de la concentration de carbone, d'azote en mg/g de sol, de phosphore en mg/Kg de sol, C/N et pH obtenues sous *A. senegal* de différentes provenances.

Provenances	C (mg/g sol)	N (mg/g sol)	P (mg/kg sol)	CEC (meq%)	pH (eau)	C/N
Hors-couvert	0,57 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	3,38 <sup>a</sup>	5,78 <sup>a</sup>	10
Kankossa	0,73 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	62 <sup>ab</sup>	10,01 <sup>ab</sup>	6,09 <sup>a</sup>	10
Tchad	0,77 <sup>ab</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	80 <sup>ab</sup>	9,3 <sup>ab</sup>	6,04 <sup>a</sup>	10
Djiguéri	0,87 <sup>abc</sup>	0,09 <sup>abc</sup>	84,3 <sup>ab</sup>	8,7 <sup>ab</sup>	6,36 <sup>a</sup>	10
Diaménar	1,02 <sup>abc</sup>	0,1 <sup>abc</sup>	90,3 <sup>ab</sup>	7,9 <sup>ab</sup>	5,95 <sup>a</sup>	10
Karofane	1,09 <sup>abcd</sup>	0,11 <sup>abcd</sup>	94,3 <sup>abc</sup>	6,9 <sup>ab</sup>	6,32 <sup>a</sup>	10
Daïba	1,09 <sup>abcd</sup>	0,11 <sup>abcd</sup>	94,7 <sup>ab</sup>	6,5 <sup>ab</sup>	6,26 <sup>a</sup>	10
Soudane	1,16 <sup>abcd</sup>	0,11 <sup>abcd</sup>	98,3 <sup>ab</sup>	7,7 <sup>ab</sup>	5,94 <sup>a</sup>	10
Kidira	1,18 <sup>abcd</sup>	0,12 <sup>abcd</sup>	100 <sup>abc</sup>	10,9 <sup>ab</sup>	6,13 <sup>a</sup>	11
Pakistan	1,2 <sup>abcd</sup>	0,12 <sup>abcd</sup>	101 <sup>bc</sup>	6,9 <sup>ab</sup>	6,3 <sup>a</sup>	10
Kirane	1,22 <sup>abcd</sup>	0,12 <sup>abcd</sup>	104 <sup>ab</sup>	13,7 <sup>b</sup>	6,61 <sup>a</sup>	10
Sodéra	1,23 <sup>abcd</sup>	0,12 <sup>abcd</sup>	107 <sup>abc</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	6,37 <sup>a</sup>	10
Somo	1,23 <sup>abcd</sup>	0,13 <sup>bcd</sup>	121 <sup>bc</sup>	11 <sup>ab</sup>	6,36 <sup>a</sup>	9
Aité	1,28 <sup>bcd</sup>	0,13 <sup>bcd</sup>	123 <sup>abc</sup>	7,4 <sup>ab</sup>	6,09 <sup>a</sup>	10
Burkina	1,42 <sup>cd</sup>	0,15 <sup>cd</sup>	125 <sup>bc</sup>	13,4 <sup>b</sup>	6,27 <sup>a</sup>	9
Bissiga	1,44 <sup>cd</sup>	0,15 <sup>cd</sup>	127 <sup>bc</sup>	6,8 <sup>ab</sup>	6,24 <sup>a</sup>	10
Ngane	1,65 <sup>d</sup>	0,17 <sup>d</sup>	167,7 <sup>c</sup>	10,1 <sup>ab</sup>	6,06 <sup>a</sup>	10

Chaque valeur est la moyenne des trois répétitions. Les lettres a, b, c, d indiquent une différence significative ou non significative selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.1 pH du sol

Le tableau 4 et la figure 12 présentent les résultats du pH des sols des différents traitements. Les résultats indiquent que tous les sols analysés sont acides (pH allant de 5,78 à 6,61). Ces résultats montrent que le sol Hors-couvert (HC) enregistre la plus faible valeur de pH (5,78) tandis que le pH le plus élevé (6,61) est obtenu sous la provenance Kirane (Kir) du Mali. Les valeurs du pH des sols sous *A. senegal* de différentes provenances sont plus élevées que celle enregistrée sous le sol hors-couvert mais ces différences ne sont pas significatives. *A. senegal*, quelle que soit la provenance, a contribué à une augmentation du pH du sol.

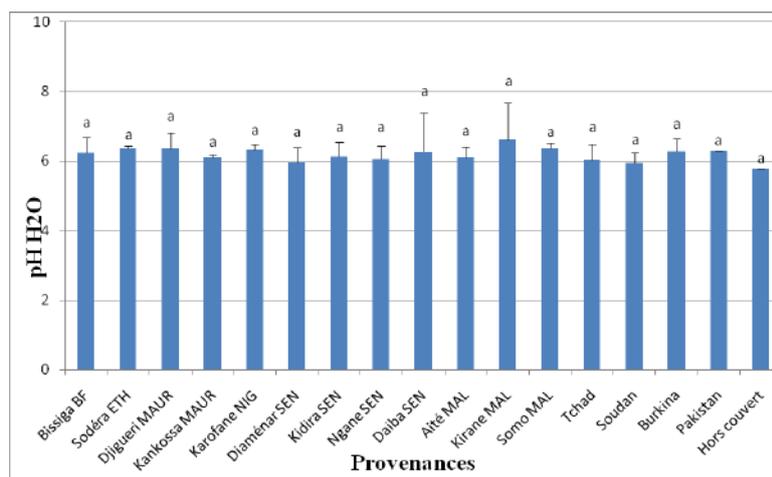
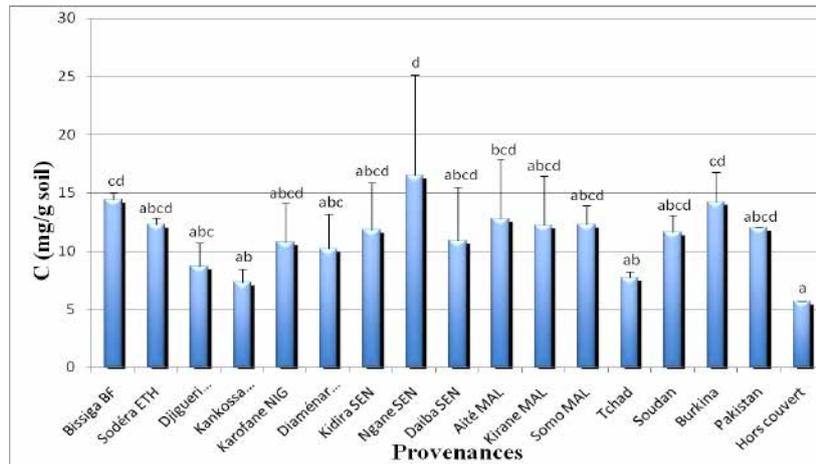


Figure 12 : pH du sol sous *A. senegal* de différentes provenances.

Chaque histogramme est la moyenne des trois répétitions. Les barres représentent les écart-types. La différence non significative entre deux moyennes est marquée par une même lettre selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ ).

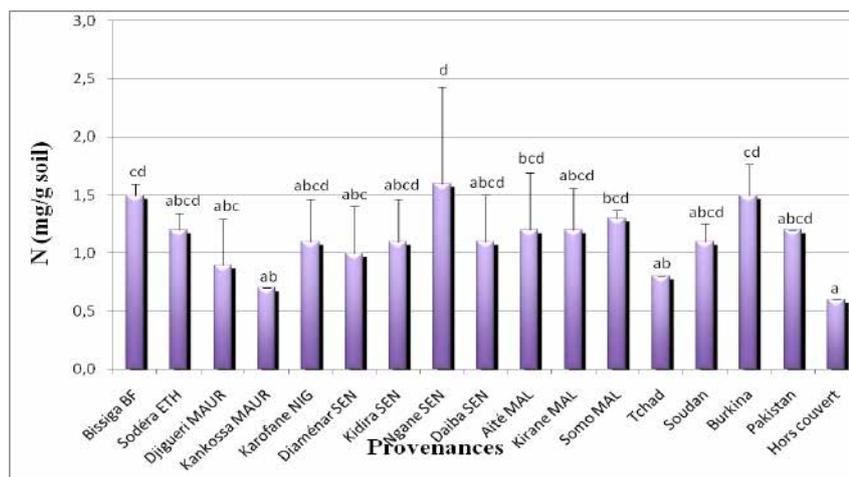
### 3.2.2 Taux de carbone total et azote total

Les figures 13 et 14 montrent les teneurs en C et N dosées dans les sols sous les *A. senegal*. Les teneurs en C et N sont plus élevées sous *A. senegal* de différentes provenances que sous hors-couvert d'*A. senegal*. Les sols sous les provenances Ngane (Sénégal), Bissiga (Burkina Faso), Burkina (Burkina Faso) et Aité (Mali) ont présenté des taux de C et N significativement plus élevés que celui du sol témoin HC. Les teneurs en C et N des sols sous les autres provenances ne présentent pas de différences significatives avec les teneurs observées dans les sols HC. Les rapports C/N varient entre 9 et 11 (Kidira) entre les traitements, mais cette différence n'est pas significative.



**Figure 13 :** Teneurs en carbone total des sols sous *A. senegal* et hors couvert d'*A. senegal*

Chaque histogramme est la moyenne des trois répétitions. Les barres représentent les écart-types. La différence significative entre deux moyennes est marquée par des lettres différentes selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ ).



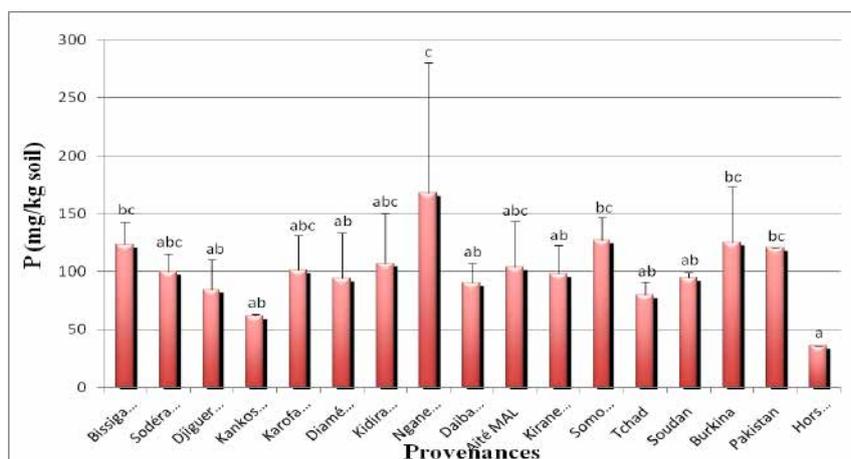
**Figure 14:** Teneurs en azote total des sols sous *A. senegal* et hors couvert d'*A. senegal*

Chaque histogramme est la moyenne des trois répétitions. Les barres représentent les écart-types. La différence significative entre deux moyennes est marquée par des lettres différentes selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Taux de phosphore total (Pt)

La figure 15 montre les teneurs en phosphore total dans les sols des différents traitements. Les résultats montrent que les teneurs en phosphore sous les différentes provenances *A. senegal* sont plus élevées que dans le sol hors-couvert qui a montré la plus faible teneur en Pt (36 mg/Kg sol). Les sols sous les provenances Ngane (Sénégal) Somo (Mali), Burkina (Burkina Faso), Bissiga (Burkina Faso), Pakistan (Pakistan) ont montré les teneurs en Pt les plus significativement ( $p < 0,05$ ) élevées par rapport aux sols sous les autres provenances (Tableau 4). Ces résultats montrent que les plants d'*A. senegal* en provenance de Ngane, Somo, Burkina,

Bissiga, Pakistan par leur apport de litière ont contribué à l'enrichissement des sols en Pt comparés au témoin hors-couvert.

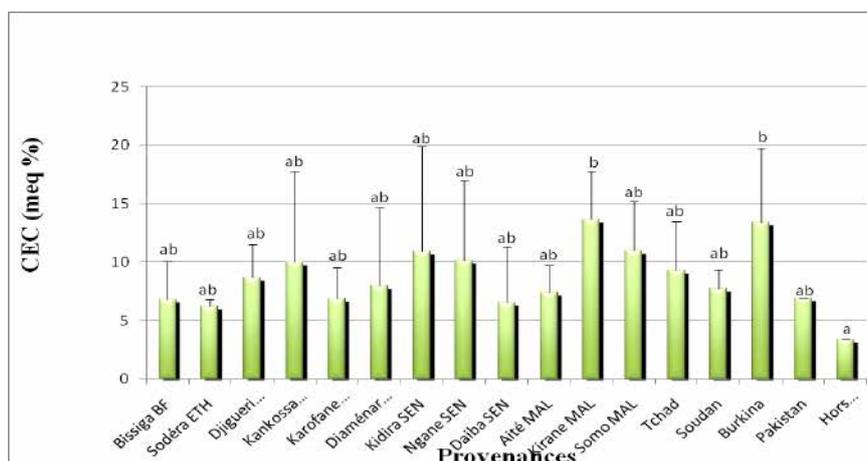


**Figure 15:** Teneurs en phosphore total des sols sous *A. senegal* et hors couvert d'*A. senegal*.

Chaque histogramme est la moyenne des trois répétitions. Les barres représentent les écart-types. La différence significative entre deux moyennes est marquée par des lettres différentes selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ )

### 3.2.4 Capacité d'échanges cationiques (CEC)

La figure 16 montre les teneurs en cations échangeables dans les sols des différentes provenances d'*A. senegal* et HC. Les résultats indiquent que les capacités d'échanges cationiques enregistrées dans les sols sous les Acacias sont plus élevées que celles enregistrées dans le sol hors-couvert qui a la plus faible CEC (3,38 meq%) (Tableau 4). Les teneurs les plus significativement élevées sont observées sous les provenances Kirane (13,7 meq%) et Burkina (13,4 meq%).



**Figure 16:** Capacités d'échangeables cationiques sous et hors *A. senegal*

Chaque histogramme est la moyenne des trois répétitions. Les barres représentent les écart-types. La différence significative entre deux moyennes est marquée par des lettres différentes selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 DENSITE ET ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE

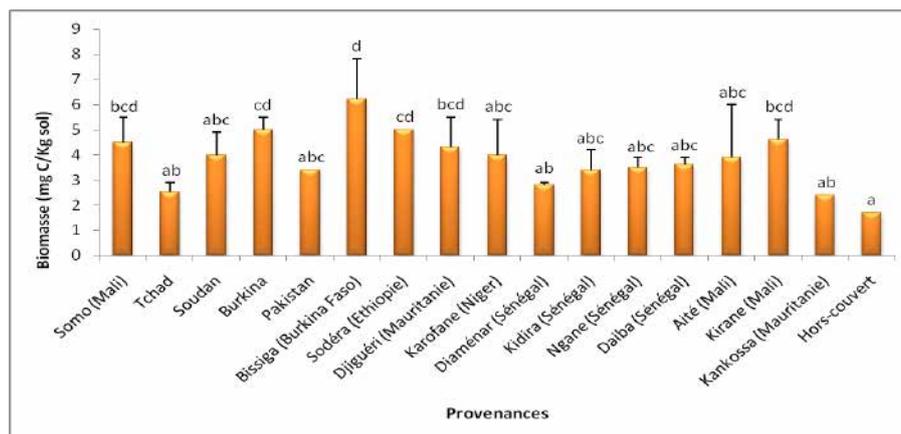
#### 3.3.1 Densité microbienne

Le tableau 5 et la figure 17 montrent les résultats de la biomasse microbienne totale dans les sols sous les *A. senegal* et hors-couvert d'*A. senegal*. Les résultats montrent que la biomasse microbienne totale est plus élevée sous *A. senegal* de différentes provenances que sous hors-couvert d'*A. senegal*. On note une biomasse microbienne significativement plus élevée dans les sols des provenances Bissiga-Burkina Faso (6,2 mg C/g sol), Burkina (5 mg C/g sol), Kirane-Mali (4,6 mg C/g sol), Somo-Mali (4,5 mg C/g sol), Djiguéri-Mauritanie (4,3 mg C/g sol) et Sodéra-Ethiopie (5 mg C/g sol) par rapport au sol témoin (hors-couvert d'*A. senegal*). Les provenances par leurs apports de litières et leurs exsudats racinaires contribuent à l'augmentation de la biomasse microbienne totale du sol.

**Tableau 5 :** Quantité de CO<sub>2</sub>-C et biomasse microbienne totale dans les sols sous *A. senegal* et hors-couvert d'*A. senegal*.

Provenances	Biomasse (mg C/g sol)	Quantité de CO <sub>2</sub> -C (µg C/g sol)
HC	1,7 <sup>a</sup>	115,6 <sup>a</sup>
Kankossa (Mauritanie)	2,4 <sup>a</sup>	201,2 <sup>ab</sup>
Tchad	2,5 <sup>ab</sup>	180,1 <sup>ab</sup>
Diaménar (Sénégal)	2,8 <sup>ab</sup>	245,8 <sup>abc</sup>
Kidira (Sénégal)	3,4 <sup>abc</sup>	226,9 <sup>abcd</sup>
Pakistan	3,4 <sup>abc</sup>	259,8 <sup>abcd</sup>
Ngane (Sénégal)	3,5 <sup>abc</sup>	267,5 <sup>abcd</sup>
Daiba (Sénégal)	3,6 <sup>abc</sup>	289,7 <sup>bcd</sup>
Aité (Mali)	3,9 <sup>abc</sup>	300,6 <sup>bcd</sup>
Soudan	4 <sup>abc</sup>	329,64 <sup>bcd</sup>
Karofane (Niger)	4 <sup>abc</sup>	273,6 <sup>abcd</sup>
Djiguéri (Mauritanie)	4,3 <sup>bcd</sup>	277,4 <sup>abcd</sup>
Somo (Mali)	4,5 <sup>bcd</sup>	341,8 <sup>bcd</sup>
Kirane (Niger)	4,6 <sup>bcd</sup>	283,4 <sup>abcd</sup>
Burkina	5 <sup>cd</sup>	317,1 <sup>bcd</sup>
Sodéra (Ethiopie)	5 <sup>cd</sup>	390,5 <sup>cd</sup>
Bissiga (Burkina Faso)	6,2 <sup>d</sup>	115,6 <sup>d</sup>

Chaque valeur est la moyenne des trois répétitions. Les lettres a, b, c, d indiquent une différence significative ou non significative selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ ).



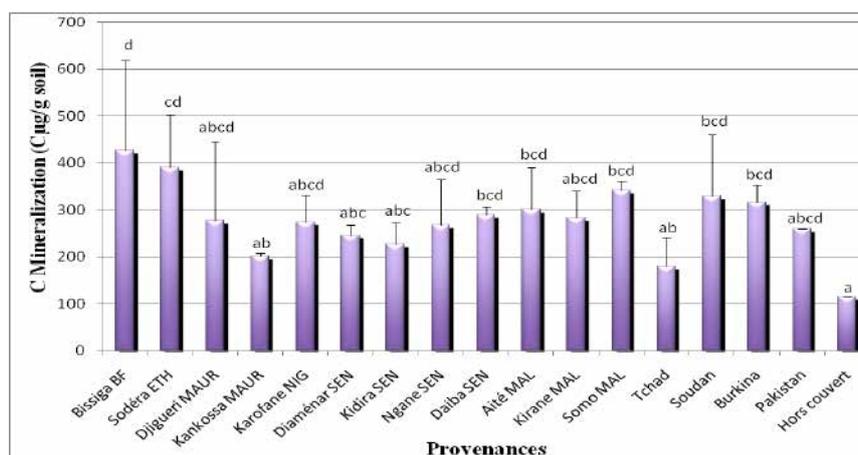
**Figure 17:** Biomasse microbienne totale des sols sous *A. senegal* et hors-couvert d'*A. senegal*.

Chaque histogramme est la moyenne des trois répétitions. Les barres représentent les écart-types. La différence significative entre deux moyennes est marquée par des lettres différentes selon le test de Fisher ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2. Minéralisation du carbone

Le tableau 5 et la figure 18 présentent les résultats des quantités totales de  $\text{CO}_2$  dégagées par les échantillons de sol des différentes provenances d'*A. senegal* au bout de 15 jours d'incubation. Ces résultats montrent que le flux de  $\text{CO}_2$  libéré dans les sols d'*A. senegal* est plus élevé que celui dégagé par le sol hors-couvert. Le taux de minéralisation du C est significativement plus élevé dans les sols des provenances Bissiga-Burkina Faso ( $427,5 \mu\text{g C g}^{-1}$  sol), Sodéra-Ethiopie ( $390,5 \mu\text{g C g}^{-1}$  sol), Somo-Mali ( $341,8 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}$  sol), Soudane-Soudan ( $329,6 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}$  sol), Burkina-Burkina Faso ( $317 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}$  sol), Aité-Mali ( $300,6 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}$  sol), et Daiba-Sénégal ( $289,7 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}$  sol) par rapport à celui du sol hors-couvert.

Les apports des litières de ces provenances d'*A. senegal* ont contribué à l'augmentation de l'activité microbienne et par conséquent de la minéralisation du C dans leurs sols.



**Figure 18 :** Quantités de  $\text{CO}_2$  libéré ( $\mu\text{g C/g}$ ) dans les sols sous et hors *A. senegal*

Les valeurs sont les moyennes des trois répétitions. Les barres représentent les écart-types. La différence significative entre deux moyennes est marquée par des lettres différentes selon le test de Fisher ( $P < 0,05$ ).

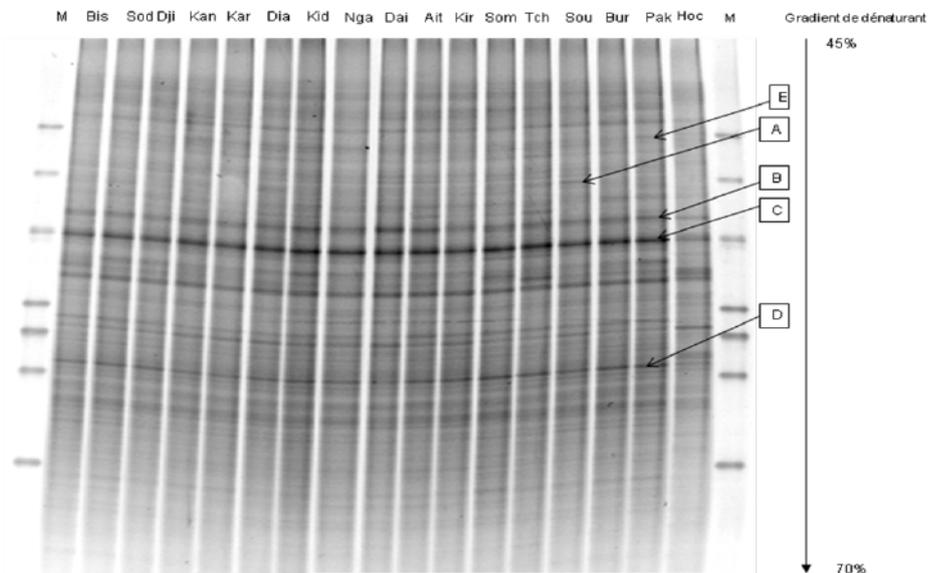
### 3.4 STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNE SOUS LES PROVENANCES D'*A. SENEGAL*

#### 3.4.1 Structure des communautés bactériennes totales

La structure génétique des communautés bactériennes totales dans les sols d'*A. senegal* de différentes provenances a été étudiée par la PCR-DGGE d'une partie du gène 16S rDNA. L'amplification de la région V<sub>3</sub> de l'ADNr 16S a donné des amplifiats de 200 paires de bases utilisés pour la DGGE.

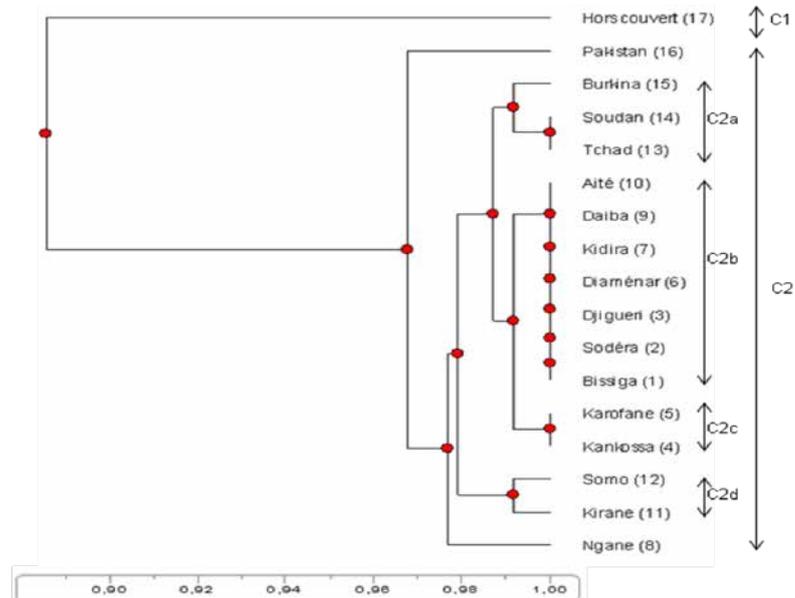
La figure 19 présente les profils DGGE obtenus représentatifs de la diversité des fragments d'ADN ribosomal 16S amplifiés dans les sols des plants d'*A. senegal*. L'analyse des résultats montre que les profils DGGE sous *A. senegal* sont très différents de celui du sol hors-couvert. De plus ces profils présentent plus de bandes DGGE que dans le sol hors-couvert.

Les profils DGGE des sols sous *A. senegal* montrent de nombreuses bandes intenses indiquant la présence de nombreuses communautés bactériennes dominantes dans ces sols. Certains fragments (bandes B et C, Fig 19) sont présents à la fois dans les sols sous les différentes provenances d'*A. senegal* et dans le sol témoin indiquant l'existence des communautés bactériennes stables dans les sols. L'analyse poussée a révélé la présence de quelques bandes DGGE de faibles intensités dans les sols de certaines provenances (bande A dans les profils des sols sous Soudan et bande E dans les profils des sols sous Pakistan) montrant ainsi la spécificité de certaines communautés bactériennes dans ces sols. Néanmoins, les sols sous les différentes provenances d'*A. senegal* ont montré de grandes similarités (plus de 96%) de leurs profils DGGE.



**Figure 19:** Profils DGGE de l'amplifiat d'une partie du gène 16S rDNA de la communauté bactérienne totale d'un sol de différentes provenances d'*A. senegal*. M=marqueur DGGE, Bis=Bissiga, Sod=Sodéra, Dji=Djigueri, Kan=Kankossa, Kar=Karofane, Dia=Diaménar, Kid=Kidira, Nga=Ngane, Dai=Daiba, Ait=Aité, Kir=Kirane, Som=Somo, Tch=Tchad, Sou=Soudan, Bur=Burkina, Pak=Pakistan, Hoc=Hors-couvert.

L'analyse des résultats du dendrogramme de similarité (Figure 20) obtenu à partir des profils DGGE montre une subdivision des communautés bactériennes totales en 2 grands clusters (regroupements). Le premier cluster (C1) regroupe les communautés bactériennes du sol HC, tandis que les communautés bactériennes des sols des différentes provenances forment le second cluster (C2) avec plus de 96% de similarité. Une analyse au sein du second cluster fait apparaître 2 sous-groupes : celui formé par les profils des sols sous Pakistan et celui des autres provenances qui se regroupent avec de 98 à 100% de similarité (Figure 20).



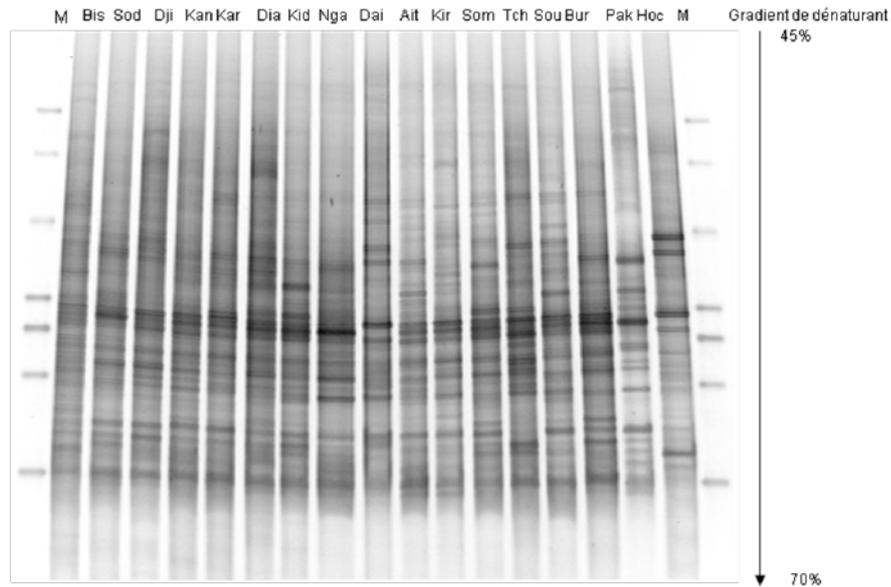
**Figure 20 :** Dendrogramme de similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE-16S d'*A. senegal* de différentes provenances.

Ces différents résultats montrent que les *A. senegal* de différentes provenances ont modifié la structure génétique des communautés bactériennes totales. Les modifications structurales majeures comparées au sol témoin sont caractérisées par la présence ou l'absence des communautés bactériennes totales ainsi que leur abondance relative (variations d'intensité des fragments DGGE).

### 3.4.2 Etude de la structure des communautés bactériennes fonctionnelles

#### 3.4.2.1 Structure des communautés bactériennes dénitrifiantes

La structure génétique des communautés bactériennes nitrites réductases a été étudiée par PCR-DGGE ciblant le gène *nirK*. La figure 21 présente les profils DGGE représentant la diversité des fragments *nirK* amplifiés. Les résultats montrent que la structure des communautés dénitrifiantes des sols hors-couvert d'*A. senegal* est différente de celle des sols sous *A. senegal*. De plus, le nombre total de bandes DGGE est plus élevé et plus intenses dans les profils des sols des provenances que celui du sol témoin (HC). Ces résultats montrent que quelles que soient leurs provenances, les plants d'*A. senegal* ont modifié la structure génétique des communautés dénitrifiantes en favorisant la diversité et l'abondance relative de certaines communautés.

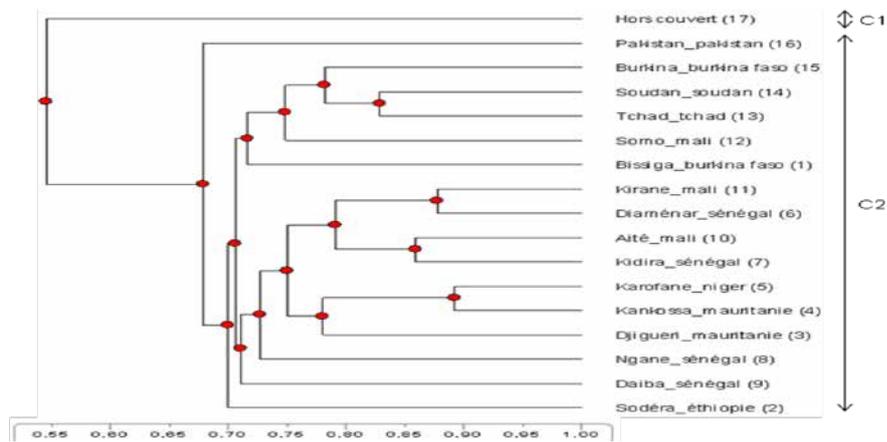


**Figure 21:** Structures génétiques (empreinte DGGE-nirk) de la communauté bactérienne dénitrifiante nitrite réductase d'un sol de différentes provenances d'*A. senegal*: M=marqueur DGGE, Bis=Bissiga, Sod=Sodéra, Dji=Djiguéri, Kan=Kankossa, Kar=Karofane, Dia=Diaménar, Kid=Kidira, Nga=Ngane, Dai=Daiba, Ait=Aité, Kir=Kirane, Som=Somo, Tch=Tchad, Sou=Soudan, Bur=Burkina, Pak=Pakistan, Hoc=Hors-couvert.

Néanmoins, les résultats indiquent l'existence de bandes DGGE communes à tous les sols montrant la stabilité dans le sol de certaines communautés dénitrifiantes.

L'analyse du dendrogramme de similarité (Figure 22) effectuée à partir des profils DGGE indique une séparation des communautés dénitrifiantes en 2 grands clusters en fonction de la présence ou l'absence d'*A. senegal*. Le premier cluster (C1) est formé uniquement par les profils des communautés bactériennes dénitrifiantes du sol hors-couvert d'*A. senegal*, tandis que le second cluster (C2) est constitué par les profils des communautés bactériennes dénitrifiantes des sols d'*A. senegal* de différentes provenances avec plus de 68% de similarité.

Ce résultat indique que les profils des sols sous les *A. senegal* bien que n'étant pas identiques entre elles, partagent plus de communautés bactériennes dénitrifiantes semblables au niveau de leur structuration génétique. Une analyse des profils du cluster C2 fait apparaître d'autres sous-groupes : celui du Pakistan et celui des autres provenances. Le sol de la provenance Pakistan partage moins de communautés bactériennes dénitrifiantes avec les autres provenances (-70% de similarité), alors que les autres provenances ont plus de 70% de similarité entre elles.

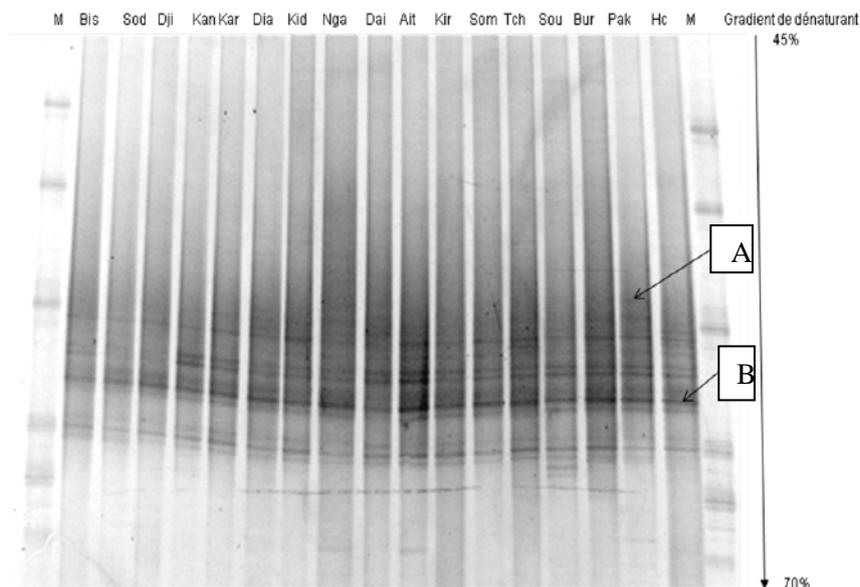


**Figure 22** : Dendrogramme de similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE-nirk des provenances d'*A. senegal*.

### 3.4.2.2 Structure des communautés nitrifiantes

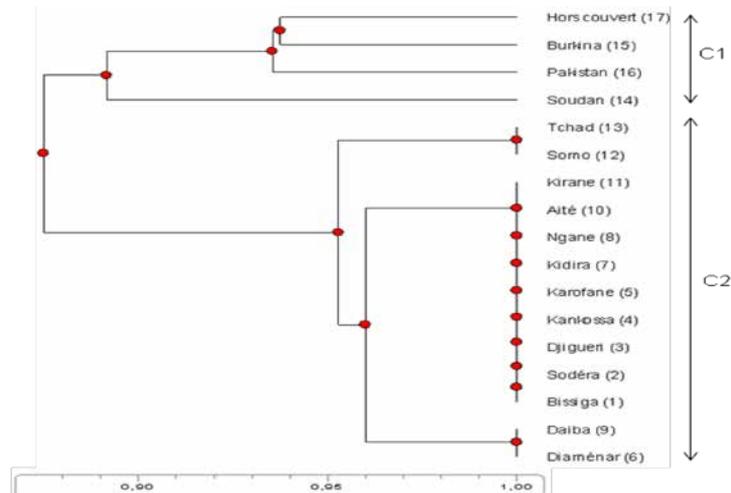
La structure génétique des communautés bactériennes nitrifiantes dans les sols d'*A. senegal* a été étudiée par PCR-DGGE en ciblant le gène *amoA*. La figure 23 présente les profils montrant la diversité des fragments d'ADN amplifiés dans les différents échantillons de sols.

L'analyse des profils montre l'existence des bandes dominantes (bande B) dans tous les sols sous *A. senegal* et le sol HC. Les résultats révèlent la présence ou l'absence de bandes DGGE mineures (bande A) dans les sols de certaines provenances d'*A. senegal* montrant ainsi la spécificité de certaines communautés nitrifiantes sous le sol de Pakistan (Pakistan).



**Figure 23** : Profils DGGE montrant la structure génétique des communautés bactériennes ammonifiantes des sols sous *A. senegal*. M=marqueur, Bis=Bissiga, Sod=Sodéra, Dji=Djiguéri, Kan=Kankossa, Kar=Karofane, Dia=Diaménar, Kid=Kidira, Nga=Ngane, Dai=Daiba, Ait=Aité, Kir=Kirane, Som=Somo, Tch=Tchad, Sou=Soudan, Bur=Burkina, Pak=Pakistan, Hoc=Hors-couvert.

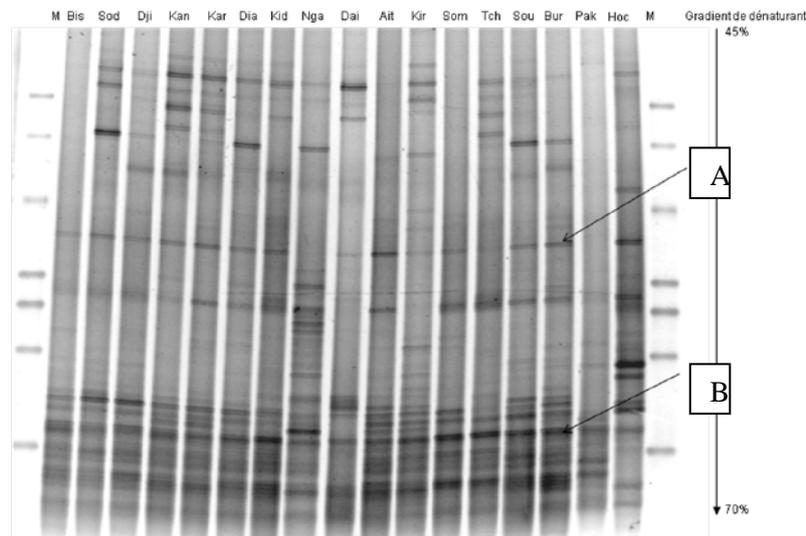
L'analyse du dendrogramme de similarité (figure 24) montre le regroupement de certaines provenances (Burkina, Pakistan et Soudan) avec le témoin HC montrant ainsi la similarité de leur structure des communautés nitrifiantes. Le second cluster (C2) regroupe à des degrés divers de similarité (95 à 100%) les profils des communautés bactériennes nitrifiantes des sols des autres provenances.



**Figure 24 :** Dendrogramme similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE du gène amoA des sols sous les provenances d'*A. senegal*.

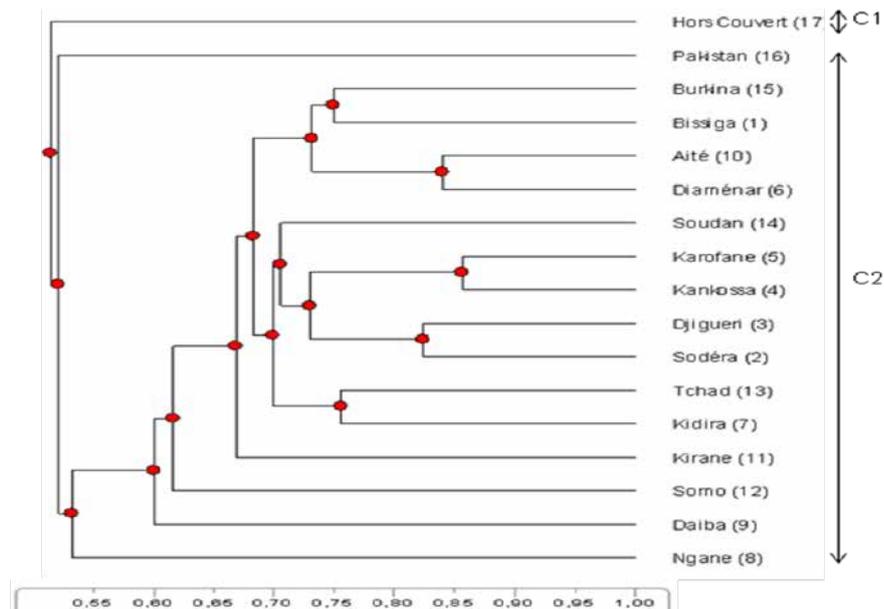
### 3.4.2.3 Structure des communautés bactériennes diazotrophes

La structure génétique des communautés bactériennes diazotrophes dans les sols sous *A. senegal* a été étudiée par PCR-DGGE en ciblant le gène nifH. La figure 24 présente les profils montrant la diversité des fragments d'ADN amplifiés des échantillons de sol sous *A. senegal* de différentes provenances et du sol témoin (HC).



**Figure 25 :** Profils DGGE montrant la structure génétique des communautés bactériennes diazotrophes dans les sols sous *A. senegal*. M = marqueur DGGE, Bis=Bissiga, Sod=Sodéra, Dji=Djiguéri, Kan=Kankossa, Kar=Karofane, Dia=Diaménar, Kid=Kidira, Nga=Ngane, Dai=Daiba, Ait=Aité, Kir=Kirane, Som=Somo, Tch=Tchad, Sou=Soudan, Bur=Burkina, Pak=Pakistan, Hoc=Hors-couvert.

Les résultats indiquent que tous les profils des sols sont différents et que le nombre de bandes par profil est toujours plus élevé dans les sols des provenances d'*A. senegal* que dans le sol témoin hors-couvert d'*A. senegal*. Les bandes intenses sont plus nombreuses en bas du gel indiquant la présence des communautés diazotrophes à fort pourcentage en G+C. Les nombreuses bandes intenses traduisent l'effet d'augmentation relative des communautés bactériennes par les provenances. Cet effet est beaucoup plus marqué chez Ngane (Sénégal), Kirane (Mali), Burkina (Burkina Faso) et Aité (Mali) que chez Bissiga (Burkina Faso). Les résultats indiquent la grande variabilité des communautés diazotrophes montrant ainsi la spécificité de l'impact des différentes provenances d'*A. senegal* sur ces communautés.



**Figure 26 :** Dendrogramme de similarité (UPGMA) obtenu à partir des profils DGGE des communautés diazotrophes des sols des provenances d'*A. senegal*.

L'analyse des résultats du dendrogramme de similarité (figure 26) montre également 2 grands clusters avec seulement 50% de similarité. Le premier cluster est formé uniquement de communautés bactériennes du sol hors-couvert et le second regroupe les communautés diazotrophes des sols sous les provenances. Au sein du second cluster, les similarités varient de 50 à 85% entre les communautés diazotrophes dans les sols et les profils des sols sous Pakistan et Ngane présentent les similarités les plus faibles avec respectivement 53 et 54 % de similarités avec les communautés des sols des autres provenances. Ces résultats montrent également que les différentes provenances impactent différemment les communautés diazotrophes dans les sols sous *A. senegal*.

## Chapitre 4 : **DISCUSSION**

Les communautés microbiennes jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques des sols et par conséquent dans la nutrition des plantes, la croissance et dans leurs interactions plantes - sol - microorganismes.

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence des provenances d'*Acacia senegal* sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols. L'introduction d'*A. senegal* de diverses provenances a entraîné des modifications sur les propriétés physico-chimiques des sols, la densité, l'activité et la structure des communautés microbiennes du sol.

### **4.1 EFFET DES PROVENANCES D'*A. SENEGAL* SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL**

Les sols sous *A. senegal* ont montré un pH plus élevé par rapport au sol hors-couvert (témoin). Cette augmentation du pH dans le sol des provenances peut s'expliquer par les effets de la décomposition biochimique de la litière formée par les feuilles des *Acacias* et les produits de l'exsudation racinaire des *Acacias*. Des différences de pH ont été observées parmi les sols sous les différentes provenances d'*A. senegal* mais elles ne sont pas significatives.

Malgré cet effet de légère augmentation du pH due aux *A. senegal*, les sols restent toujours acides.

La capacité d'échange cationique (CEC) des sols est également plus élevée dans les sols sous les provenances comparées au sol hors-couvert d'*A. senegal*. L'action de ces litières est connue dans l'augmentation de la capacité d'échange cationique des sols (Young, 1989).

Des différences significatives sont néanmoins notées au sein des provenances. En effet, les sols sous les provenances Kirane (Mali) et Burkina (Burkina Faso) ont montré un CEC élevé. En effet, la CEC est dépendante des teneurs en argiles et en C. Dans le contexte des sols de Bambey (pauvres en argile, 3,86%), la teneur en C pourrait expliquer cette différence de CEC dans les sols. Car selon Augusto *et al.*, (2006), le C total est fortement corrélé à la CEC dans les sols pauvres en composés argileux. Nos résultats montrent que les litières ont augmenté le taux de C total dans les sols sous la provenance Burkina.

Cependant, certains sols ayant un taux de C total élevé n'ont pas montré un CEC élevé (sous la provenance Kirane). Ces résultats sont contradictoires et pourraient s'expliquer par le fait que certaines litières pourraient présenter des teneurs en lignine très élevées pouvant agir sur leur biodégradation et par conséquent entraîner une réduction de la CEC.

Les taux de C, N et P totaux des sols des provenances d'*A. senegal* sont toujours supérieurs à ceux enregistrés dans les sols hors-couvert. Les sols de certaines provenances telles que Ngane (Sénégal), Bissiga (Burkina Faso), Burkina (Burkina Faso), Somo (Mali), Aité (Mali) ont montré des taux significativement plus élevés par rapport aux sols des autres provenances. Ces résultats sont probablement dus à la différence de la qualité et de la quantité de litière produits au sol par ces provenances ainsi que les produits de leurs exsudats racinaires fournis aux sols. En effet, les litières constituent une source importante en nutriments (N, C, P et K ...) et leur qualité et quantité conditionnent les différentes teneurs de ces nutriments dans les sols. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Kaur *et al.* (2000) qui ont montré que la qualité et la quantité de litière ainsi que l'exsudation racinaire contribuent de manière substantielle à

l'augmentation du taux de carbone organique, de l'azote et du phosphore dans le sol. De même, Dommergues (1994) a montré l'utilité des Acacias dans l'amélioration du statut de l'azote du sol, amélioration résultant essentiellement de l'apport de matière organique riche en azote par le renouvellement des racines et surtout par les effets des litières.

De nombreuses études ont montré le rôle des constituants des litières sur leur décomposition. Certaines ont mis en évidence la relation entre l'azote et le ratio C/N lors de la décomposition des litières (Trinsoutrot *et al.*, 2000). Les sols sous les provenances ont montré un rapport C/N faible, compris entre 9 et 10. Il traduit à la fois une évolution rapide des litières et par conséquent une libération d'azote immédiatement utilisable par la plante.

#### **4.2 EFFET DES PROVENANCES D'A. SENEGAL SUR LES PROPRIETES MICROBIOLOGIQUES DU SOL**

Les résultats montrent que la biomasse microbienne totale est plus élevée dans les sols des provenances que sous hors-couvert d'*Acacia senegal*. Les sols des provenances Bissiga (Burkina Faso), Burkina (Burkina Faso), Kirane (Mali), Somo (Mali), Djiguéri (Mauritanie) et Sodéra (Ethiopie) ont montré une biomasse microbienne significativement plus élevée par rapport au sol témoin. Donc les provenances d'*A. senegal* ont un effet positif sur l'abondance de la biomasse microbienne. Cet effet positif est dû à la qualité et quantité de litière de feuilles des Acacias et les produits d'exsudation racinaires. Des résultats similaires ont été obtenus par Diallo (2005) sur l'augmentation de la biomasse microbienne par apport de litière. La biomasse microbienne est d'autant plus élevée que l'apport de litière est abondant. Des auteurs comme Aggangan (1999) ont montré que l'addition de litière avait une influence significative sur la biomasse microbienne. Les différences de valeur de la biomasse notées entre les provenances sont aussi dues à la qualité de litières des différentes provenances. Les teneurs en polyphénol des litières variables d'une provenance à l'autre peuvent affecter la biomasse microbienne.

Les résultats ont montré que la minéralisation du C dans les sols des provenances est plus élevée que dans les sols témoin (sol HC). Des variations significatives dans la minéralisation du C ont été observées entre les sols des différentes provenances. Une forte activité minéralisatrice est notée dans les sols des provenances Bissiga (Burkina Faso), Sodéra (Ethiopie), Somo (Mali), Soudane (Soudan), Burkina (Burkina Faso), Aité (Mali), et Daiba (Sénégal) comparé aux sols des autres provenances. Cette forte activité minéralisatrice doit être due d'une part à la qualité des litières et à une rapide décomposition et minéralisation de leurs substrats organiques. La respiration du sol est conditionnée par la disponibilité des substrats dans le sol et par l'activité de la biomasse microbienne.

D'autre part, ces variations peuvent être dues à la qualité et la quantité des exsudats racinaires, source de C pour l'activité des microorganismes. Des études ont montré que l'apport de litière stimule l'activité et le développement des micro-organismes du sol par l'effet direct de l'apport de substrat carboné (Vance & Chapin, 2001). De plus Hulugalle *et al.*, (1986) et Recous *et al.*, (1995) ont montré que la qualité des litières avait une importance sur l'activité des micro-organismes. Ces substrats organiques carbonés constitués de substances solubles et de poids moléculaire peu élevé sont les premières consommées et rapidement minéralisées par une flore très variée. Cette flore est surtout constituée de consommateurs de sucres simples.

Les faibles activités minéralisatrices enregistrées sous les autres provenances comme Ngane (Sénégal) sont également liées à la qualité de leur litière. En effet, la richesse en polyphénols des

litières de certaines provenances peut être évoquée. *A. senegal* étant une légumineuse, les feuilles ont un taux de polyphénols qui peut varier d'une provenance à l'autre. Certains auteurs ont souligné que la teneur en polyphénols pouvait ralentir la minéralisation du C (Sall *et al.*, 2003). Il a été par ailleurs montré (Scheffer & Cowling, 1966 ; Rice, 1984 ; Bremner & Mc Carty, 1993), que les composés phénoliques pourraient inhiber l'activité et la croissance microbienne. La forte teneur en azote sous la provenance Ngane (tableau 4) peut expliquer la faible activité minéralisatrice car selon Schroth (2003), les concentrations élevées de lignines et polyphénols peuvent retarder la décomposition des litières et la minéralisation de l'azote.

Des résultats obtenus par Sarr (2009), sur la production de gomme des différentes provenances ont montré que la provenance Tchad a enregistré la valeur la plus élevée (139,5 g / individu), malgré sa faible teneur en C, N, Pt et sa faible activité minéralisatrice par rapport aux autres provenances. Les résultats montrent aussi une production nulle sur les provenances Ngane (Sénégal), Pakistan, Sodéra (Ethiopie) et moyenne (7,4 et 57,2 g / individu) sur les autres provenances. Donc le meilleur rendement en gomme n'est pas corrélé à une teneur élevée des sols en C, N, Pt ni à une forte activité minéralisatrice. En outre l'arbre présente la capacité de vivre en symbiose avec les micro-organismes du sol, des bactéries aérobies, les rhizobiums. Cette symbiose avec les rhizobiums variable d'une provenance à l'autre peut expliquer les différents rendements observés sur les provenances.

#### **4.3 EFFET DES PROVENANCES D'*A. SENEGAL* SUR LA STRUCTURE GENETIQUES DES COMMUNAUTES BACTERIENNES**

Les structures des communautés bactériennes ont été analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (DGGE). Cette technique est adaptée à la caractérisation de la structure de communautés microbiennes complexes (Muyzer *et al.*, 1993 ; Muyzer, 1999). Cette approche moléculaire fournit un profil de la diversité structurale basé sur la séparation électrophorétique des séquences des gènes amplifiés. Rapide et sensible (Muyer & 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 amené à limiter notre étude à une analyse comparative de la structure génétique des communautés bactériennes totale et spécifique.

Les différences en termes de présence et d'absence de bandes au niveau de la structure résultent des différences dans la composition des communautés bactériennes.

L'analyse des profils DGGE a montré une différence de la structure des communautés bactériennes totales des sols des provenances d'*A. senegal* comparé à HC. D'une provenance à l'autre, cette variabilité de structure des communautés est aussi notée. Il apparaît que les différentes provenances ont eu un des impacts différents sur les communautés bactériennes des sols. Comme pour l'activité microbienne, ces différences peuvent être imputées aux différentes qualité et quantité de litières recueillies dans ces sols ou à la différence de la qualité et de la quantité de leurs exudats racinaires.

Les modifications de la structure des communautés microbiennes sont caractérisées par l'apparition et la disparition de certaines communautés microbiennes et par des changements de

densité (intensité des bandes) sous l'effet des plantes d'*A. senegal*. Des résultats comparables ont été obtenus par Priha *et al.*, (1999) ; Weiland & Sundsbak, (2000) ; Marschner *et al.*, (2001) ; Smalla *et al.*, (2001) ; Kuske *et al.*, (2002) ; Dunfield & Germida, (2003) ; Garbeva *et al.*, (2004) ; A. Houlden *et al.*, (2008). Ces auteurs ont montré l'influence des plantes sur les modifications de structure des communautés microbiennes.

Les modifications de ces communautés bactériennes totales sont liées aux apports de litières de feuilles des Acacias et des produits d'exsudation racinaire des plants. Cette litière peut être favorable au développement de certaines espèces bactériennes et défavorable à d'autres, ce qui explique la détection de nouvelles bandes dans les structures de certaines provenances. Des conditions favorables (litière et produits exsudés) dans les sols des provenances peuvent stimuler l'apparition de telles ou telles communautés bactériennes. Selon Heal *et al.*, (1997), l'apport de litière qui constitue un apport direct de substrat carboné et d'azote (chute de feuilles des Acacias) stimule l'activité et le développement des micro-organismes du sol. L'effet dû aux exsudats racinaires, comme facteur déterminant pour la croissance des micro-organismes du sol, est également évoqué par Baudoin *et al.*, 2003 et Benizri *et al.*, 2005. Pour ces auteurs les exsudats racinaires représentent une source de C et d'énergie en faveur de la croissance rapide des micro-organismes dans la rhizosphère. Les travaux de Bremer and Kessel, (1990) et de Bremer and Kuikman, (1994) avaient montré que la qualité et la quantité des exsudats sont d'une première importance pour la nutrition des micro-organismes du sol et que ces derniers pouvaient différer qualitativement et quantitativement avec la diversité et la disponibilité des exsudats racinaires (Baudoin *et al.*, 2002).

Nos résultats ont montré que *A. senegal* a modifié la structure des communautés bactériennes totales comparé à hors-couvert. Néanmoins, la présence de bandes communes à tous les sols témoignent de la stabilité de certaines communautés bactériennes dans les sols quelles que soient les provenances d'*A. senegal*.

Les profils des différentes provenances montrent des bandes DGGE communes qui indiquent une colonisation fréquente de certaines populations bactériennes en fonction des provenances.

Les résultats obtenus avec le dendrogramme des profils DGGE-16S montrent des similarités qui varient de 98 à 100% entre les provenances, mais aucun regroupement de structure de ces communautés bactériennes totales en fonction des pays d'origine (localité) n'est observé.

La structure génétique des communautés fonctionnelles (diazotrophes, nitrifiantes, et dénitrifiantes) a été étudiée. Nos résultats montrent une différence de structure des communautés microbiennes fonctionnelles des sols des provenances comparés à HC. Des variations dans la structure des communautés fonctionnelles ont été relevées entre les sols des différentes provenances avec l'apparition de bandes et de fortes intensités.

Les profils nifH ont montré très peu de similarités entre les communautés bactériennes fixatrices libres (diazotrophes) des différentes provenances d'*A. senegal*. Nous avons montré que les provenances d'*A. senegal* ont exercé un impact significatif sur les communautés microbiennes ayant abouti à une sélection des communautés diazotrophes. Chaque provenance à travers l'impact de sa litière et de son exsudat racinaire a favorisé différentes communautés diazotrophes. Ces résultats corroborent ceux obtenus de Diallo *et al.*, (2004) obtenus dans les sols d'*Acacia tortilis* ssp. *raddiana*. Chaque provenance d'*A. senegal* influence différemment la structure des communautés diazotrophes des sols.

Par contre les différentes provenances n'ont pas impacté différemment sur les communautés nitrifiantes contrairement aux communautés dénitrifiantes dont les structures génétiques dans les sols varient en fonction des provenances d'*A. senegal*. Ces communautés doivent être sensibles à la qualité biochimique des litières ainsi que des exudats racinaires des différentes provenances d'*A. senegal*.

Malgré les similarités observées sur les dendrogrammes des profils DGGE-nirK, DGGE-amoA et DGGE-nifH, variant de 50 à 100%, les structures des communautés bactériennes fonctionnelles des provenances ne se regroupent pas par pays d'origine.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce présent travail nous a permis de connaître l'influence des provenances d'*A. senegal* sur les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol.

Notre étude a montré que les provenances d'*A. senegal* ont contribué à une amélioration du taux de C, N, P et des cations échangeables du sol. L'activité minéralisatrice bien que variable entre les sols sous-couvert des provenances est plus importante que HC. La provenance Ngane (Sénégal) dont les sols ont montré des teneurs en C, N, P élevées a pourtant une faible activité minéralisatrice. La qualité biochimique des litières des différentes provenances peut expliquer ces variabilités d'activité dans les sols et par conséquent les variations de fertilité des sols.

Les provenances Bissiga (Burkina Faso), Sodéra (Ethiopie), Somo et Aité (Mali), Soudan (Soudane) et Daiba (Sénégal) avec leur taux élevé en C, N, Pt et la forte activité minéralisatrice ont participé à l'amélioration des sols. Ces conditions pourront favoriser la croissance des *A. senegal* et par conséquent avoir un impact positif sur la production de gomme arabique.

Les communautés fonctionnelles (dénitrifiantes, diazotrophes) ont eu un impact différent selon la provenance indiquant ainsi la diversité « génétique et/ou physiologique » des *A. senegal* étudiés.

Au vue de ces résultats il aurait été nécessaire:

- de coupler les résultats aux données de rendements en gomme de ces provenances d'*A. senegal*.
- d'étudier la qualité biochimique des litières des différentes provenances d'*A. senegal* pour déterminer les compositions en lignines et polyphénols.
- d'étudier les communautés fixatrices d'azote dans les sols des différentes provenances

## BIBLIOGRAPHIE

- Amato, M., & Ladd, J.N. (1988). Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 107-114.
- Badiane, A. (2008). Impact des modes de gestion du sol (Semis direct sur couverture végétale, labour et jachère) sur l'activité et la structure génétique des communautés bactériennes des sols des hautes terres malgaches. *Thèse 3 cycle en Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, 63 p.*
- Baudoin, E., Benizri, E & Guckert, A. (2001). Metabolic structure of bacterial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology* 37, 85–93.
- Baudoin, E., Benizri, E & Guckert, A. (2002). Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology* 19, 135–145.
- Baudoin, E., Benizri, E & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 33 (2003) 1183-192.
- Benizri, E., Dedourge, O., Dibattista-Leboeuf, C., Piutti, S., Nguyen, C & Guckert, A. (2000). Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology* 21: 261-265.
- Berg, B. & Matzner, E. (1997). Effect of N deposition on decomposition of plant litter and soil organic matter in forest systems. *Environ. Rev.* 5(1): 1–25.
- Berg, N & Steinberger, Y. (2008). Role of perennial plants in determining the activity of the microbial community in the Negev Desert ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 40 (2008) 2686-2695.
- Bernard Reversat, F. (1987). Litter incorporation to soil organic matter in natural and planted tree stands in Senegal. *Pedobiologia*, 30: 6, 401-417.
- Bernard-Reversat, F. (1988). Soil nitrogen mineralization under a Eucalyptus plantation and a natural Acacia forest in Senegal. *Forest Ecology and Management*, 23 (4): 233-244.
- Bernhard-Reversat F., Harmand J.M & Uguen K. (1998). In: Campa Claudine (ed.), Grignon C. (ed.), Gueye M. (ed.), Hamon Serge (ed.). L'acacia au Sénégal. Paris : ORSTOM, p.205-219. *Réunion thématique sur l'acacia au Sénégal, 1996-12-03/1996-12-05, (Dakar, Sénégal).*
- Bertheau, Y., Darrasse, A., Jouan, B., Kotoujansky, A & Priou, S. (1993). Application enzymatique in vitro d'ADN et ses applications. *Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris © 1993, pp. 3-22*
- Birch, H.F. (1958). The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant and Soil*, 10: 9–31.
- Blondel, D. (1971). Rôle de la matière organique libre dans la minéralisation en sol sableux, relation avec l'alimentation azotée du mil. *Agron. Trop.*, 26: 1372-1377.
- Bossio, D.A & Scow, K.M. (1995). Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Applied and Environmental Microbiology, San Diego* 61, 4043–4050.

- Bowen, G.D & Rovira, A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. In: Sparks, D.L., (Ed.), *Advances in Agronomy*, vol. 66. Academic Press, New York, pp. 1–102.
- Braker G., Fesefeldt A & K-P Witzel (1998) - Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (nirK and nirS) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10) 3769 – 3775.
- Bremer C., Braker G. Matthies D. Andreas Reuter A., Engels C & R. Conrad. (2007). Impact of Plant Functional Group, Plant Species, and Sampling Time on the Composition of nirK-Type Denitrifier Communities in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (21) 6876 –6884.
- Chiveu. J.C., Dangasuk. G.O., Omunyin. M.E & Wachira, N.F. (2009). Quantitative variation among Kenyan populations of *Acacia senegal* (L.) Willd. for gum production, seed and growth traits. ©Springer Science+Business Media B.V. 2009.
- Crecchio. C., Gelsomino. A., Ambrosoli. R., Minati. J.L & Ruggiero. P. (2004). Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology & Biochemistry* 36 (2004) 1873–1883.
- Davet, P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. *Mieux comprendre, INRA, Paris.* 383 p.
- Degrange, V & Bardin, R. (1995). Detection and Counting of Nitrobacter Population in Soil by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, June 1995, p. 2093-2098.
- Diallo *et al.*, (2004). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology* (2004) 6 (4), 400–415.
- Diallo, M.D. (2005). Effet de la qualité des litières de quelques espèces végétales sahéliennes sur la minéralisation de l'azote. *Thèse de docteur de 3 cycle en Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Faculté des Sciences et Techniques, 151p*
- Diallo, N.H. (2005). Activité et diversité des communautés microbiennes des sols tropicaux : effet des jachères de courte durée sur les habitats microbiens. *Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Cheikh Anta Diop de Dakar.*
- Diouf, M.N. (2003). Les communautés fongiques des structures de récolte de plusieurs espèces de termites macrotermitinae : origine et évolution. *Thèse de doctorat, Université Paris VI VAL DE MARNE.*
- 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.
- Dunfield, K.E & Germida, J.J. (2003). Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with fieldgrown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl Environ Microbiol* 69: 7310–7318.
- Duponnois, R., Colombet, A., Hien V & Thioulouse, J. (2005). The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. *Soil Biol Biochem* 37: 1460–1468.

- Ehrenfeld J, Kourtev P & Huang W. (2001) Changes in soil functions following invasions of exotic understory plants in deciduous forests. *Ecol Appl* 11: 1287–1300.
- Enwall, K., Nyberga K., Bertilsson S., Cederlunda H., Stenstroma J.S and S. Hallina. (2007). Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 106–115.
- Fall, S. (2002). Réponse des communautés microbiennes d'un sol sahélien à la modification de ses habitats : cas de l'activité de construction d'un termite humivore *Cubitermes niokoloensis*. *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon1*.
- Fierer. N & Schimel. P. J. (2002). Effects of drying rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformation. *Soil Biology and Biochemistry* 34 (2002) 777-787.
- Garland, J.L. (1996). Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 213–221.
- Garnier, P., Néel, C., Mary, B., Lafolie, F. (2001). Evaluation of a nitrogen transport and transformation model in a bare soil. *European Journal of Soil Science*, 52, 253-268.
- Gerakis, P. A. & Tsangarakis C. E. (1970). The influence of *Acacia senegal* on fertility of sand sheet (a Goz;8) soil in the central Sudan. *Plant and Soil*, 33: 81-86.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Renato de Freitas, J., and Seib, A.M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26: 43-50.
- Guèye, Y. (2009). Impact d'*A. senegal* (L.) Willd sur l'activité et la structure des communautés microbiennes du cycle de l'azote. *Thèse 3 cycle en Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Faculté des Sciences et Techniques, 72p*.
- Grayston, S.J., and Campbell, C.D. (1996). Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology* 16: 1031-1038.
- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., Mawdsley, J.L., Clegg, C.D., Ritz, K., Griffiths, B.S., Rodwell, J.S., Edwards, S.J., Davies, W.J., Elston, D.J & Millard, P. (2004). Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology* 25 (2004) 63-84.
- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Lutze, J.L & Gifford, R.M. (1998b). Impact of elevated CO<sub>2</sub> on the metabolic diversity of microbial communities in N limited grass swards. *Plant and Soil* 203, 289–300.
- Grayston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, J.L., Campbell, C.D & Bardgett, R.D. (2001). Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol Biochem* 33: 533–551.
- Grayston SJ, Vaughan D & Jones D. (1996) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol* 5: 29–56.

- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D & Edwards, A.C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 369-378.
- Hamelin, J., Fromin, N., Tarnawski, Roesti, D., J-Miserez, K., Forestier, N., T-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M & Rossi, P. (2002). Statistical analysis of Denaturing Gel Electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology (Fromin et coll. 2002)*.
- Hannen, E.J., Mooij, W., van Agterveld, M.P., Gons, H.J & Laanbroek, H.J. (1999). Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2478–2484.
- Hermansson, A & Lindgren, P-E. (2000). Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb, 2001, p. 972-976.
- Hinsinger, P., Plassard, C & Jaillard, B. (2006). Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry. *J Geochem Explor* 88: 210–213.
- Houlden, A., Timms-Wilson, T.M., Day, M.J & Bailey, M.J. (2008). Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbial Ecol* 65(2008) 193-201.
- Ickowicz. A., Friot. D & Guérin. H. (2005). Acacia senegal, arbre fourrager sahélien ? *Bois et Forêt des tropiques*, 2005, N° 284 (2).
- Kandeler. E., Tschirko. D., Bruce. K.D., Stemmer. M., Hobbs. P.J., Bardgett. R.D & Amelung. W. (2000). Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol Fertil Soils* (2000) 32:390–400.
- Kirk. J. L., Beaudette. L. A., Hart. M., Moutoglis. P., Klironomos. J. N., Lee. H & Trevors. J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58 (2004) 169– 188.
- Kisa, M., Sanon, A., Thioulouse, J., Assigbetse, K., Sylla, S., Spichiger, R., Dieng, L., Berthelin, J., Prin, Y., Galiana, A., Lepage, M & Duponnois, R. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis can counterbalance the negative influence of the exotic tree species *Eucalyptus camaldulensis* on the structure and functioning of soil microbial communities in a sahelian soil. *FEMS Microbial Ecol* (2007) 1-13.
- Kourtev, P., Ehrenfeld, J & Huang, W. (1998) Effects of exotic plant species on soil properties in hardwood forests of New Jersey. *Water Air Soil Pollut* 105: 493–501.
- Kourtev, P.S., Ehrenfeld, J.G & Häggblom, M. (2003). Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 35 (2003) 895-905.
- Krafczyk, I., Trolldenier, G & Beringer, H. (1984). Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 315–322.
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A & Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry* 40 (2008) 2407-2415.

- Lensi, R., Mazurier, S., Gourbière & Josserand, A. (1986). Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biol Lugtenberg*, B.J.J., Dekkers, L.C. (1999). What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* 1, 9–13.
- Lynch, J.M & Whipps, J.M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129, 1–10.
- Mallet, B., Besse, F., Gautier, D., Muller, D., Bouba, N & Njiti, C. (2002). Quelles perspectives pour les gommiers en zone de savanes d’Afrique centrale ? Actes du colloque, mai 2002, Maroua, Cameroun.
- Marcela. C. R. A., Heitor. L.C. C., Raquel S. P., Joyce. C. B & Alexandre S. R. (2008). Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil. *Applied Soil Ecology* 3 8 (2008) 10 0 – 10 8.
- Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R & Crowley, D.E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 33 (2001) 1437-1445.
- Mary. A. B., John. R. S., George. A. K., James. I. Prosser, & Eldor. A. P. (1999). Comparative Diversity of Ammonia Oxidizer 16S rRNA Gene Sequences in Native, Tilled, and Successional Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, July 1999, p. 2994–3000.
- Maydell. V. (1983). Arbres et arbustes du Sahel. Leurs caractéristiques et leurs utilisations. *Eschborn, Allemagne, Gtz*, 531 p.
- Metay. A., Oliver. R., Scopel. E., Douzet. J-M., Moreira. J.A.A., Maraux. F., Feigl .B.J & Geoderma.C.F. (2007). N2O and CH4 emissions from soils under conventional and no-till management practices in Goiânia (Cerrados, Brazil). *Geoderma* 141 (2007) 78–88
- Morel, C., Linères, M., Guivarch, A., Kvarnstrom, E., Parnaudeau, V., Nicolardot, B & Morel, J.L. (2003). Photodisponibilité et valeur fertilisante du phosphore de déchets urbains. pp. 35-44. *Dossier de l’environnement de l’INRA*, 25, Paris, 154p.
- Morel, R. (1988). Les sols cultivés. *Techniques et documentation, Lavoisier*.
- 68- Mullis, K.B & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Murphy, D.V., Bhogal, A., Shepherd, M., Goulding, K.W.T., Jarvis, S.C., Barraclough, D & Gaunt. (1999). Comparaison of 15N labeling methods to measure gross nitrogen mineralisation. *Soil Biology and Biochemistry* 31 (1999) 2015-2024.
- Muyzer *et al.*, (1999). Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. *Methods of Microbial Community Analysis*.
- 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.

- Nane –B, A & Ganry F., Jacquin, F. Etude de la biomasse microbienne dans les sols ferrugineux tropicaux de la zone Centre Nord du Sénégal. (*poster, Numéro d'enregistrement scientifique : 83 Symposium n° : 11*)
- 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.*
- Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Générmont, S., Morvan, T., Hénaut, C., Flura, D., Robert, P., Maroveccio, F., Linères, M & Morel, C. (2003). Disponibilité en azote des effluents urbains, agro-industriels et issus d'élevage. *Dossier de l'environnement de l'INRA n°25. AGREDE.*
- Nicolardot, B., Recous, S & Mary, B. (2001). Simulation of C and N mineralization during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C: N ratio of the residues. *Plant and Soil, 228, 83-103.*
- Nusslein. K., & Tiedje. J. M. (1999). Soil Bacterial Community Shift Correlated with Change from Forest to Pasture Vegetation in a Tropical Soil. *Applied and Environmental Microbiology, Aug. 1999, p. 3622–3626.*
- Oulbachir, K., Dellal, A & Bekki, A. (2009). Les Variations De La Biomasse Microbienne Etudiée Sous Des Conditions Environnementales Différentes Dans Quatre Sols Superposés Séparés Deux à Deux Par Une Croûte Calcaire. *European Journal of Scientific Research ISSN 1450-216X Vol.36 No.3 (2009), pp 407-417.*
- Pellerin, S., Morel, C., Schneider., Mollier, A., Denoroy, P & Jordan-M, L. (2001). Transfert sol-plante des éléments minéraux : avancées des connaissances et perspectives d'application. In G. *Les nouveaux défis de la fertilisation. GEMAS-COMIFER, Blois, 129-140.*
- Poly, F. (2000). Réponses des communautés bactériennes telluriques à des perturbations chimiques complexes : Activités potentielles et empreintes génétiques. *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon1.*
- Poly, F., Monrozier, L.J & Bally, R. (2001a) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol 152: 95–103.*
- Porteous, L. A., Seidler, R. J & Watrud, L.S. (1997). An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology 6: 787-791.*
- Priha, O., Grayston, S.J., Pennanen, T & Smolander, A., (1999). Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of Pinus sylvestris, Picea abies and Betula pendula seedling in an organic and mineral soil. *FEMS Microbial Ecology 30(1999) 187-199.*
- Ranjard. L., Lejon. D. P. H., Mougel. C., Schehrer. L., Merdinoglu. D & Chaussod. R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology (2003) 5(11), 1111–1120.*

- Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., Thioulouse, J., Linet, P & Richaume, A. (2000). A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints *FEMS Microbiology Ecology* 31 (2000) 107-115.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Courbière, F., Thioulouse, J & S. Nazaret. (2000). Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology*. 39: 263-272
- Römer, W., Augustin, J & Schilling, G. (1988). The relationship between phosphate absorption and root length in nine wheat cultivars. *Plant and Soil*, 111, 199-201.
- Schimel, J.P. & Gulledege, J. (1998). Microbial community structure and global trace gases. *Global Change Biology*, 4: 745-758.
- Schomberg, H.H., Steiner, J.L & Unger, P.W. (1994). Decomposition and nitrogen dynamics of crop residues: residue quality and water effects. *Soil Sci. Am. J.* 58 372–381.
- Schroth, G. (2003). Decomposition and nutrient supply from biomass. In: G. Schroth and F.L. Sinclair, Editors, *Trees, Crops and Soil Fertility: Concepts and Research Methods*, CAB International, UK, pp. 131–150.
- Saetre, P & Baath, E. (2000). Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed spruce-birch stand. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 909–917.
- Sall, P.N. (1997). Le gommier et la gomme arabique. *Notes techniques du projet RCS- Sabel 1 507/RAF/43*.
- Sarr, A., Faye, A., Oihabi, A., Houeibib, M.A.J.O., Neyra, M & Lesueur, D. (2005). Inoculation en station et au champ d'Acacia senegal avec des souches sélectionnées de Rhizobium. *Bois et forêt des tropiques*, 2005, N°283(1).
- Sarr, M. S. (2009). Dynamique et production de gomme arabique de peuplements naturels et d'essai provenances d'Acacia senegal. *Thèse 3 cycle en Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar*. 37p.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H & Berg, G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* 67: 4742–4751.
- Smith, M.S. (1982). Dissimilatory Reduction of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and N<sub>2</sub>O by a soil Citrobacter sp. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr, 1982, p. 854-860.
- Véronique. E-H., Christiane D., Ana. P-P & Christian. S. (2004). Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *FEMS Microbiology Ecology* 47 (2004) 397-404.
- Wardle, D.A & Nicholson, K.S. (1996). Synergistic effects of grassland plant species on soil microbial biomass and activity: implications for ecosystem-level effects of enriched plant diversity. *Functional Ecology* 10, 410-416.

- Watson, C.J., Travers, G., Kilpatrick, D.J., Laidlaw, A.S & Riodan, E.O. (2000). Overestimation of gross N transformation rates in grassland soils due to non-uniform exploitation of applied and native pools. *Soil Biology and Biochemistry* 32(2000)2019-2030.
- Webster, G., Embley, T. M & JI. Prosser (2002). Grassland Management Regimens Reduce Small-Scale Heterogeneity and Species Diversity of  $\beta$ -Proteobacterial Ammonia Oxidizer Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, (1) p 20 - 30.
- Whalen, J.K & Parmelee, R.W. (1999). Quantification of nitrogen assimilation efficiencies and their use to estimate organic matter consumption by the earthworms *Aporrectodea tuberculata* (Eisen) and *Lumbricus terrestris* L. *Applied Soil Ecology* 13 (1999) 199-208.
- Williams, M.A., Myrold, D.D & Bottomley, P.J. (2006). Carbon flow from  $^{13}\text{C}$ -labeled straw and root residues into the phospholipid fatty acids of a soil microbial community under field conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 759-768.
- Yang, C.H & Crowley, D.E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 345-351.
- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L & Wildman, H.G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1101-1108.

## **ANNEXES**

### **ANNEXE 1 : Préparation des solutions d'extraction d'ADN**

#### **Tampon de lyse stérile : 0,25 M NaCl ; 0,1 M EDTA ; pH 8**

Peser 2,193 g de NaCl (MM=58,44 g) et peser 5,589 g d'EDTA (MM=372,24 g), ajoutons environ 100 ml d'eau déminéralisée et ajustons le pH à 8.

Compléter à 150 ml avec de l'eau déminéralisée.

Filtrer à 0,2  $\mu\text{m}$  et mettre à l'autoclave

Conserver à 4°C.

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

Peser 8,181 g de NaCl (MM=58,44 g) et 3,722 g d'EDTA (MM=372,24 g), dissoudre

Ajouter 2 g de CTAB

Compléter à 100 ml

Filtrer à 0,2  $\mu\text{m}$

Mettre à l'autoclave

Conserver à température ambiante.

#### **PEG 8000 à 40%**

Peser 20 g de PEG

Ajouter environ 30 ml d'eau très progressivement car le volume augmente quand la PEG se dissout.

Compléter à 50 ml

Conserver à 4°C.

#### **Acétate de potassium 5 M**

Peser 24,535 g de KAc (MM= 98,14 g), dissoudre dans 30 ml d'eau déminéralisée

Compléter à 50 ml

Filtrer à 0,2  $\mu\text{m}$

Conserver à 4°C.

#### **Acétate d'ammonium 2,5 M**

Peser 19,27 g de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (MM= 77,08), dissoudre dans 30 ml d'eau déminéralisée

Compléter à 100 ml

Filtrer à 0,2 µm

Conserver à 4°C.

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetic

PEG: PolyEthylene Glycol

CTAB: Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide

NH<sub>4</sub>Ac : Acétate d'ammonium

KAc : Acétate de potassium

## **ANNEXE 2 : Extraction d'ADN du sol**

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

**Lyse physique** : 0,5 g de sol est mis en présence de billes de zirconium stériles (0,1 mm) et de 1 ml de tampon de lyse (NaCl 0,25 M et EDTA 0,1 M, pH 8) 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 13000 g à 4°C et on récupère le surnageant.

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

**Purification CTAB** : On jette le surnageant et l'on ajoute au culot 600 µl de CTAB 2 % (1,4 M NaCl ; 0,1 M EDTA ; 2 % CTAB). On laisse incuber à 68°C en mélangeant tous les 2 min jusqu'à ce que le culot soit en suspension. Le CTAB fait précipiter les polysaccharides.

**Extraction** : On ajoute 600 µl de chloroforme ; après agitation du mélange, on sépare les phases par une centrifugation à 13000 g pendant 10 min 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 protéine précipitée. On recueille la phase aqueuse.

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

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

**Lavage** : On ajoute 500 µl d'éthanol à 70°C et l'on centrifuge de nouveau à 13000 g pendant 5 min. On jette le surnageant et l'on évapore le culot sous vide.

**Récupération ADN** : L'ADN extrait est re suspendu dans un volume de 25 µl d'eau ultra pure

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 apportée pour la PCR.

Sur un gel d'agarose 1,5 %, on fait migrer 5 µl d'échantillon mélangés à 2,5 µl de bleu de charge ainsi que 10 µl de chacun des gammes-étalons. Les gammes-étalons sont les suivantes :

G1 :12,5 ng d'ADN dans 10 µl

G2 :25 ng d'ADN dans 10 µl

G3 :50 ng d'ADN dans 10 µl

G4 :100 ng d'ADN dans 10 µl

G5 :200 ng d'ADN dans 10 µl

G6 :400 ng d'ADN dans 10 µl

La concentration en ADN de nos extraits est ensuite déterminée grâce au logiciel Molecular Analyses après coloration du gel au BET et rinçage à l'eau déminéralisé.

## ANNEXE 3 : Compositions des autres solutions utilisées

### Bleu de charge 10 X

Bleu de bromophénol	0,25% (p/v)
Glycérol 30%	
EDTA 10 Mm	
H <sub>2</sub> O	qsq
À utiliser au 1/10	

### Tampon TBE (Tris-borate) 10 X

Tris-base	215,62 g
Na <sub>2</sub> EDTA, H <sub>2</sub> O	14,88 g
Acide borique	110,08 g
H <sub>2</sub> O	qsp 2 litres
Filtrer, stériliser à l'autoclave	

### Tampon TAE 50 X

Tris-base	484 g
Na <sub>2</sub> EDTA H <sub>2</sub> O (pH 8)	37 g
Acide acétique glacial	114,2 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 2 litres

### BET (Bromure d'éthidium) :

Solution à 1 mg/l

### Composition de la Taq ready-to-go (pour un volume final de 25 µl)

Taq DNA polymérase	2,5 U
DNTP	200 µM
Tris-HCl	10 mM, pH 9
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM

### ANNEXE 4: Electrophorèse sur gel en gradient de dénaturant (DGGE)

#### Coulage du gel

- Mesurer 30 ml de « low » à l'éprouvette et le verser dans le tube Falcon « low »
- Mesurer 30 ml de « high » avec la même éprouvette et le verser dans le tube Falcon « high »  
Mettre 500 µl de Bleu dans le « high » (c'est le low qui vient diluer le high)
- Mettre 60 µl de TEMED dans chaque tube
- Vérifier que le robinet de la pompe à gradient est fermé
- Mettre 120 µl d'APS dans le « low » (la polymérisation commence) et verser dans le compartiment de gauche
- Ouvrir légèrement le robinet pour faire partir la bulle créée suite au versement du low
- Mettre 120 µl d'APS dans le « high » et verser dans le compartiment de droite
- Allumer la pompe et attendre que le ménisque du high soit légèrement sous celui du low puis lentement ouvrir le robinet de communication
- Laisser couler quelques gouttes, arrêter la pompe, placer l'aiguille au milieu entre les 2 plaques et remettre la pompe en marche.
- Surveiller pendant que le gradient se forme (durée ± 10 min) pour prévenir les éventuelle fuites.
- Rincer les 2 tubes Falcon, laisser les autres solutions à portée de main dans la glace au cas où il y aurait un problème.
- Une fois le gel coulé, chasser les bulles d'air en le soulevant puis en replaçant tout doucement le peigne.
- Laisser polymériser une heure et demi
- Rincer la pompe abondamment et la démonter.

#### Préparation des échantillons à déposer

- Sortir les produits PCR (stockés à -20°C)
- Ajouter le bleu de charge spécial DGGE aux échantillons (15 µl pour 25 µl), afin de les alourdir et de visualiser le front de migration.

- Conserver à 4°C avant de déposer.

#### Préparation de l'appareillage

- Desserrer les vis de l'appareil.
- Pousser fort l'espaceur vers le bas pour libérer l'espace et laisser passer le tampon qui devra être en contact avec le gel.
- Resserrer doucement les vis sans écraser le gel
- Placer le support dans la cuve en l'inclinant pour chasser les bulles d'air sous le gel
- Placer l'électrode rouge à droite, la noire à gauche, mettre le bouton sur jaune « Low Voltage »
- Fixer le tuyau en silicone à la cuve
- Mettre le bouton rond de la pompe (sur le côté) sur la position « ouvert », attendre que la cuve se remplisse et le remettre sur « fermé »
- Vérifier que le niveau de tampon est à « INGENY phorU2 »
- Retirer le peigne tout doucement
- Rincer les puits avec la pipette (P 100) afin d'éliminer les traces d'acrylamide (2 à 3 fois)
- Remettre les puits droits avec le cône de la pipette.

#### Dépôt des échantillons

- Centrer les échantillons au milieu du gel pour éviter au maximum les effets de bord, mélanger chaque échantillon avant de le déposer délicatement
- Déposer marqueurs de chaque côté et bleu de charge dans les puits des extrémités
- Placer le couvercle de la cuve, brancher les électrodes au générateur (position 3), mettre « meter selector » sur 3 et le bouton vert 3 sur 100 Volts.
- Mettre le boulon sur rouge « high voltage HV »
- Au bout de 10 à 15 minutes, mettre la pompe en route.

#### Migration

18 heures à 100 Volts, température du TAE (1 X) 60°C.

#### Récupération du gel

- Éteindre l'appareil, le générateur, débrancher les électrodes et le tuyau en silicone
- Sortir l'appareil en le vidant
- Dévisser et sortir les plaques en soulevant par l'espaceur, les placer dans le bac BET rempli d'eau

- Enlever la petite plaque, puis l'espaceur
- Couper le côté du gel où l'on a commencé à déposer (en haut à droite)
- Faire des mouvements de vague pour détacher le gel, puis enlever la grande plaque

#### Coloration

- Placer très délicatement le gel dans un bac contenant du Cybr green (1/20).
- Laisser colorer 30 minutes sous agitation
- Sortir le gel, le mettre dans l'eau et laisser sous agitation pendant 10 min

#### Prise de la photo du gel

- Sortir le gel et le placer sous la lampe UV
- Ouvrir le Logiciel BIOCAPT
- Mettre au point, cliquer sur « temps d'intégration » puis sur « arrêt acquisition » pour prendre la photo, annoter la photo, enregistrer et imprimer

Jeter le gel, nettoyer tout le matériel, ranger.

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

Réactifs	Dénaturants	
Gradients	45%	70%
acrylamide/bis 40%	20 ml	20 ml
TAE 50 X (ml)	2 ml	2 ml
Formamide (ml)	18 ml	18 ml
Urée (g)	18,9 g	29,4 g
Glycérol	2%	2 %
Qsp H2O	100 ml	