



**HAL**  
open science

## Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France

Odile Domergue

► **To cite this version:**

Odile Domergue. Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France. Interactions entre organismes. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT : 2017PSLEP067 . tel-02107043v2

**HAL Id: tel-02107043**

**<https://theses.hal.science/tel-02107043v2>**

Submitted on 23 Apr 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres  
PSL Research University

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

Diversité fonctionnelle de rhizobia associés à la féverole  
en agro-écosystème Sud de France

École doctorale de l'EPHE – ED 472

Spécialité : ÉCOLOGIE MICROBIENNE

Soutenue par :

**Odile DOMERGUE**

le 19 Décembre 2017

Dirigée par :

**Thierry DUPRESSOIR**

Coencadrée par :

**Philippe DE LAJUDIE**

## COMPOSITION DU JURY :

M. Philippe HINSINGER  
INRA  
Rapporteur

M. Vincent VADEZ  
IRD  
Rapporteur

Mme Mireille ROSSEL  
EPHE  
Examineur

M. Hervé SENTENAC  
INRA  
Examineur

M. Philippe DE LAJUDIE  
IRD  
Président du jury

M. Thierry DUPRESSOIR  
EPHE  
Directeur de thèse



École Pratique  
des Hautes Études





« Un petit pas pour l’homme, un grand pas pour l’humanité »



Neil Amstrong 1969.

« Légumineuses : un petit pois pour l’homme, un grand pas pour l’humanité »



Schneider et Huyghe, (2015)



## Remerciements

Les recherches présentées dans ce mémoire ont été réalisées dans le cadre du projet FABATROPIMED financé par Agropolis Fondation, au sein de deux unités de recherche de Montpellier : Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) et Eco & Sols. Merci Michel Lebrun et Robin Duponnois, Directeurs du LSTM, de m'avoir soutenue dans ce projet. Merci Jean-Luc Chotte, Philippe Hinsinger, Jean-Michel Harmand, Directeurs d'Eco & Sols, de m'avoir acceptée au sein de l'unité et merci Jean-Jacques Drevon, de m'avoir intégrée parmi les jeunes thésards et d'aller au-delà de mon rôle d'encadrement pour ce projet de thèse. Merci Philippe de Lajudie et Antoine Galiana, Directeurs scientifiques au LSTM et Thierry Dupressoir, Directeur d'étude à l'école doctorale SIEB de l'EPHE de la Sorbonne à Paris pour votre accompagnement. Je remercie les membres du jury de thèse d'avoir libéré une case de leur emploi du temps pour évaluer mon travail et surtout mes deux rapporteurs sans qui cette soutenance n'aurait eu lieu. Merci Didier Blavet, pour ton enseignement de pédologue, le maniement du GPS et de la bêche-fourche mais surtout celui des bases de données et du logiciel R qui ont réussi à faire évoluer une statophobe. A propos de statR, merci Vincent Robert et Franck Dorkeld de m'avoir sortie de ma torpeur initiale. Merci à tous les responsables de plateformes : Catherine Pernot, Josiane Abadie, Laurie Amenc, Agnès Martin, Manon Villeneuve, Gérard Souche, Didier Arnal, Ernest Kouakoua, Jean-Marc Souquet,... Je remercie Farid Meddaci et Karine Heulin, soutiens administratifs des unités Eco & Sols et LSTM. Un grand merci à mon amie Claude Plassard pour sa disponibilité. Merci à l'équipe DIASCOPE de la station expérimentale de Mauguio. Un grand merci à Romain, Louis et Cristian, courageux étudiants du parcours. Merci aux doctorants marocains, algériens, tunisiens, burkinabés, maliens, malgaches ainsi qu'à leurs encadrants. Je remercie le département Santé des Plantes et Environnement INRA et la formation permanente de m'avoir accordé leur confiance et soutenue dans cet ambitieux projet de thèse. Merci à tous mes amis et collègues du LSTM et de l'équipe RISA, les priant de bien vouloir excuser ces années d'infidélité, au profit d'Eco & Sols.

Faire une thèse n'est pas qu'une histoire scientifique, mais également une incroyable aventure humaine. Je profite donc de ces quelques lignes pour remercier tous ceux qui, par leur soutien financier, scientifique ou affectif, ont contribué à rendre cette aventure possible et à en assurer le bon déroulement. Que ma famille veuille bien ne pas me tenir rigueur de ce mariage à la recherche et de ce temps non consacré.

## Table des figures

Figure 1. Apports d'intrants et production de céréales.....	12
Figure 2. Surface de protéagineux en France .....	13
Figure 3. Courbe du phosphore .....	16
Figure 4. FABATROPIMED .....	17
Figure 5. Zones d'études sur le continent africain.....	20
Figure 6. Zone d'étude en France.....	21
Figure 7. Système de culture plurispécifique .....	24
Figure 8. Interactions biotiques et abiotiques sur le microbiome.....	28
Figure 9. Cycle de l'azote.....	30
Figure 10. Schéma du cycle du phosphore dans le sol et l'eau (Ghanimi, 2014).....	32
Figure 11. Arbre phylogénétique des sous-familles de légumineuses.....	34
Figure 12. Féveroles à fleur blanche et colorée.....	40
Figure 13. Répartition des surfaces de féverole, en France en 2015 .....	41
Figure 14. Stades du développement indéterminé et déterminé de nodules de légumineuse .....	44
Figure 15. Etapes précoces du développement d'un nodule racinaire.....	45
Figure 16. Signalétique des facteurs Nod et Myc.....	48
Figure 17. Transduction du signal symbiotique dans les cellules racinaires .....	50
Figure 18. Mécanismes d'action des bactéries PGPR.....	52
Figure 19. Arbre phylogénétique simplifié de l'ADNr 16S d' $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -protéobactéries.....	54
Figure 20. Dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuses.....	58
Figure 21. Chromosome et six plasmids de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841 .....	60
Figure 22. Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique.....	62
Figure 23. Mécanismes d'échange de carbone et d'azote dans une cellule nodulaire infectée.....	64
Figure 24. Dynamique du P, dans le sol/rhizosphère de la plante.....	70
Figure 25. Disponibilité du phosphore du sol en fonction du pH.....	71
Figure 26. Caractéristiques de la plante et mécanismes favorables à l'efficacité d'absorption du phosphore .....	74
Figure 27. Morphologie et production racinaire.....	76
Figure 28. Modèle conceptuel du cycle biogéochimique du phytate du sol.....	81
Figure 29. Intérêt des phytases .....	87
Figure 30. Classification des phytases.....	89
Figure 31. Structure des phytases HAP et BPP .....	92
Figure 32. Produits organiques et inorganiques bactériens de solubilisation du P du sol .....	94
Figure 33. Nodules de racine de féverole, de type indéterminé .....	98
Figure 34. Variation des biomasses aériennes, nodulaires et racinaires, en fonction des placettes ....	100
Figure 35. Variation des biomasses aériennes, nodulaires et racinaires, en fonction des placettes ....	102
Figure 36. Corrélation entre croissance et nodulation de la féverole, sur l'ensemble des placettes....	103
Figure 37. Corrélation entre croissance et nodulation de la féverole, par département .....	104
Figure 38. Corrélation entre croissance et nodulation de la féverole, en fonction des années .....	106
Figure 39. Analyse en composante principale (ACP) <i>V. faba</i> /sol de l'agroécosystème Sud de France .....	108
Figure 40. Régressions linéaires entre le P inorganique disponible du sol et les biomasses aériennes, nodulaires et racinaires .....	110
Figure 41. Régressions linéaires entre la teneur en P de la partie aérienne de féverole et les biomasses aériennes, nodulaires et racinaires.....	111
Figure 42. Projection des individus (29 placettes) sur le plan factoriel 1x2.....	112

Figure 43. Comparaison statistique de moyennes de données sur les placettes en fonction de sous-régions Occitanie.....	113
Figure 44. Minéralisation du Phytate et solubilisation du Tri-Calcium Phosphate des isolats bactériens de féverole, sur milieu solide .....	118
Figure 45. Cinétique de croissance et de pH de cultures liquides de bactéries minéralisatrices de phytate .....	119
Figure 46. Croissance des bactéries minéralisatrices de phytate, en milieu liquide.....	120
Figure 47. Activité phytase d'isolats bactériens de féverole, à l'état libre et nodulaire.....	122
Figure 48. Analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance.....	124
Figure 49. Amplification <i>in vitro</i> de genes d'isolats rhizobiens de <i>V. faba</i> et localisation <i>in situ</i> de leurs transcrits.....	126
Figure 50. Production de Pi et d'acides organiques par des isolats aptes à minéraliser le phosphore organique et inorganique .....	127
Figure 51. Test de nodulation de la féverole par les isolats Phy+ .....	130
Figure 52. Efficacité d'utilisation symbiotique de rhizobia Phy+ .....	131
Figure 53. Carte de localisation de la région Occitanie.....	137
Figure 54. Plaine du Lauragais (A), localisation géographique (B) et topographie (C).....	139
Figure 55. Paysage de gascogne.....	140
Figure 56. Localisation géographique de la Camargue .....	141
Figure 57. Schéma opérationnel.....	144
Figure 58. Schéma conceptuel de la relation entre.....	148



# Sommaire

Remerciements .....	4
Table des figures .....	5
Sommaire .....	7
Avant-propos .....	11
Chapitre I : Synthèse bibliographique .....	23
I.1. L'agroécologie .....	23
I.2. Sol, microbiome et rhizomicrobiome.....	26
I.3. NPK et nutrition végétale.....	29
I.3.1 L'azote .....	29
I.3.2. Le potassium.....	31
I.3.3. Le phosphore .....	31
I.4. Les légumineuses .....	33
I.4.1. Diversité des légumineuses.....	33
I.4.2. Les légumineuses modèles .....	35
I.4.3. Intérêt des légumineuses.....	36
I.4.4. Intérêt de la légumineuse à graine : <i>Vicia faba</i> .....	38
I.5. La nodulation .....	42
I.5.1. Les gènes de nodulation et facteurs Nod .....	46
I.5.2. Voies de signalisation des Facteurs Nod et Myc .....	47
I.5.3. Signaux de reconnaissance des Facteurs Nod et Myc .....	48
I.6. Les microorganismes fixateurs d'azote.....	51
I.6.1. Les PGPRs .....	51
I.6.2. Les rhizobia .....	53
I.6.2.1. Particularités du génome des rhizobia.....	55
I.6.2.2. Evolution et diversité des rhizobia.....	56
I.7. La Symbiose rhizobium-Légumineuses.....	57
I.7.1. Spécificité de la symbiose .....	58
I.7.2. Diversité des rhizobia associés à la féverole .....	59
I.8. Fixation biologique d'azote.....	61
I.8.1. Généralités .....	61
I.8.2. Nitrogénase et gènes de fixation d'azote.....	62
I.8.3. Métabolisme du carbone et de l'azote, lors de la fixation d'azote .....	63
I.9. Effet des facteurs biotiques et abiotiques sur la symbiose.....	66
I.9.1. Facteurs biotiques .....	66
I.9.2. Facteurs abiotiques .....	67
I.9.3. Phosphore et légumineuses.....	68
I.10. Disponibilité du phosphore du sol .....	69
I.10.1. Facteurs influençant la disponibilité du phosphore du sol.....	71
I.10.1.1. Effet du pH et de la texture du sol.....	71
I.10.1.2. Effet de la matière organique et de l'activité microbienne .....	72
I.11. Réponse de la plante à la déficience en P .....	73
I.11.1. Effet de l'espèce végétale et du génotype.....	74
I.11.2. Effet de la morphologie racinaire .....	75
I.11.3. Effet des exsudats racinaires.....	76
I.11.4. Excrétion bactérienne d'acides organiques .....	77
I.11.5. Importance de la réserve en P des semences .....	78

I.12. Efficacité d'utilisation du phosphore .....	78
I.13. Le phytate.....	80
I.14. Le <i>Myo</i> -inositol .....	82
I.15. Les phytases .....	84
I.15.1. Généralités .....	84
I.15.2. Intérêt des phytases.....	85
I.15.3. Nomenclature et classification des phytases.....	88
I.15.3.1. Les Histidines Acid Phosphatases (HAPs) .....	90
I.15.3.2. Les $\beta$ -propeller phytases (BPPs).....	90
I.15.4. Caractéristiques moléculaires et activité phytase .....	92
Présentation de l'étude .....	95
Chapitre II : Résultats et discussion .....	97
II.1. Impact de l'agroécosystème sur la nodulation et la croissance de <i>Vicia faba</i> .....	97
II.1.1. Généralités.....	97
II.1.2. Variation des biomasses nodulaires, aériennes et racinaires, en fonction des placettes .....	98
II.1.2.1. Classification selon un ordre croissant de chacune des moyennes.....	99
II.1.2.2. Classification selon un ordre croissant des biomasses nodulaires.....	101
II.2. Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne.....	103
II.2.1. Variation des croissances aériennes, en fonction de la nodulation .....	103
II.2.2. En fonction des départements .....	104
II.2.3. En fonction des années .....	105
II.3. Analyse des relations entre variables des plantes et variables du sol .....	107
II.3.1. Analyse exploratoire par ACP.....	107
II.3.1.1. Qualité de la représentation des variables sur le plan factoriel 1x2 ACP... 109	
II.3.1.2. Corrélation entre variables sur le plan factoriel 1x2 de l'ACP.....	109
II.3.2. analyse statistique des relations entre les biomasses nodulaire, aérienne, racinaire et le phosphore du sol et des plantes .....	109
II.3.2.1. Relation entre les biomasses aériennes, nodulaires et racinaires et la teneur en P inorganique du sol disponible.....	110
II.3.2.2. Relation entre les biomasses aériennes, nodulaires et racinaires et la teneur en P de la partie aérienne de la plante.....	111
II.4. Analyse des 29 placettes ayant fait l'objet d'une l'ACP .....	112
II.4.1 Analyse exploratoire par projection des individus (placettes) sur le plan factoriel 1x2 de l'ACP.....	112
II.4.2 Comparaisons de moyennes selon les régions pour les placettes étudiées (ACP) .	113
II.5. Discussion.....	114
II.6. Isolement et caractérisation des rhizobia associés à <i>V. faba</i> .....	116
II.6.1. Collection des isolats bactériens.....	116
II.6.2. Diversité fonctionnelle des isolats bactériens .....	116
II.6.2.1. Minéralisation du phytate et/ou solubilisation du TCP sur milieu solide..	117
II.6.2.2. Croissance sur milieu phytate liquide.....	119
II.6.2.2.1. Cinétique de croissance .....	119
II.6.2.2.2. Phase de latence, pH et Pi.....	120
II.6.2.3. Propriétés enzymatiques d'isolats Phy+ bactériens de féverole.....	121
II.6.2.3.1. au niveau bactérien.....	122
II.6.2.3.2. au niveau nodulaire, en condition P suffisant et Pdéficient.....	122
II.6.3. Caractérisation phylogénétique et symbiotique .....	123

II.6.4. Amplification de gènes phytases .....	125
II.6.4.1. PCR in vitro.....	125
II.6.4.2. RtPCR in situ.....	126
II.6.5. Production d'acides organiques et de Pi d'isolats Phy <sup>+</sup> .....	127
II.7. Test de nodulation de la féverole par les souches Phy+ en culture hydroaéroponique ..	129
II.8. Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne.....	131
II.9. Discussion sur la caractérisation fonctionnelle de la symbiose <i>V. faba</i> -rhizobia.....	132
II.10. Conclusion générale et perspectives .....	135
Chapitre III : Matériel et méthodes .....	137
III.1. L'agroécosystème Sud de France.....	137
III.1.1. Zone d'étude .....	137
III.1.2. Présentation et description du Lauragais .....	138
III.1.3. La Gascogne : Domaine de la Hourre .....	140
III.1.4. la Camargue .....	141
III.2. Les organisations agricoles .....	142
III.2.1. CIVAM Bio .....	142
III.2.1.1. Démarche agro-écologique.....	142
III.2.1.2. Maintien et développement des activités agri-rurales.....	142
III.2.1.3. Les modes d'organisation collective (coopération, éducation populaire...)	143
III.2.2. CREAB Midi-Pyrénées.....	143
III.3. Diagnostic nodulaire.....	145
III.3.1. Généralités .....	145
III.3.2. Echantillonnage des plantes, au champ .....	146
III.3.2.1. Définition des placettes.....	146
III.3.2.2. Paramètres relevés.....	146
III.3.3. Au laboratoire .....	147
III.3.3.1. Traitement des plantes.....	147
III.3.3.2. Traitement des sols.....	147
III.4. Analyses physico-chimiques .....	148
III.4.1. Généralités .....	148
III.4.2. La plante.....	149
III.4.3. Le sol.....	149
III.4.3.1. Le pH.....	149
III.4.3.2. Le phosphore.....	149
III.4.3.3. Le carbone et l'azote.....	150
III.4.4. Analyses statistiques .....	150
III.5. Caractérisation fonctionnelle des rhizobia .....	150
III.5.1. Isolement bactérien des nodosités.....	150
III.5.2. Cinétique de croissance bactérienne .....	151
III.5.3. Sélection de rhizobia aptes à minéraliser le phosphore .....	151
III.5.4. Propriétés symbiotiques des rhizobia.....	152
III.5.4.1. Généralités.....	152
III.5.4.2. Inoculation et culture des féveroles, en hydroaéroponie.....	152
III.5.5. Caractérisation génotypique des bactéries.....	153
III.5.5.1. Extraction d'ADN.....	153
III.5.5.2. Amplification <i>in vitro</i> .....	153
III.5.5.3. Analyse et alignement des séquences.....	154

III.5.6. Tests enzymatiques : activité phytase .....	154
III.5.6.1. Au niveau bactérien.....	154
III.5.6.2. Au niveau nodulaire.....	154
III.5.7. Localisation génétique <i>in situ</i> .....	154
III.5.8. Dosage des acides organiques.....	155
Remerciements .....	155
Références .....	157
Annexes .....	183
Annexe 1. Articles.....	183
Article 1. En rédaction finale .....	183
Article 2. Soumis pour le bilan du projet.....	204
Article 3. Soumis pour le bilan du projet.....	207
Article 4. Soumis pour le bilan du projet.....	211
Article 5. Chapitre d'ouvrage.....	214
Annexe 2. EURS pour chacune des 63 placettes.....	225

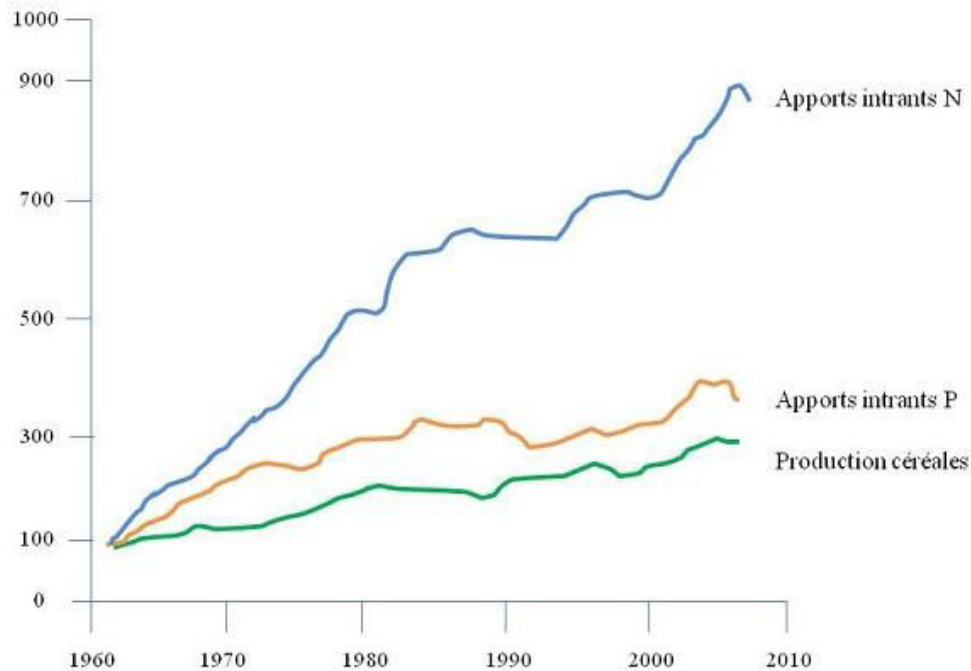
## Avant-propos

La révolution agricole du siècle dernier (1950-1980) a conduit à une intensification massive de l'agriculture, par la sélection variétale, la mécanisation et l'utilisation intensive de pesticides, herbicides et intrants chimiques (Dawson and Hilton, 2011). Face à une démographie mondiale en forte croissance, cette « révolution verte » a assuré la sécurité alimentaire. Cependant, l'utilisation d'intrants azotés et phosphatés a été plus massive que la production alimentaire mondiale, signe d'une perte d'efficacité des apports d'azote et de phosphore dans les agro-systèmes (Figure 1). Ces pratiques agricoles qui assurent les besoins alimentaires de 40% de la population mondiale, appauvrissent les ressources fossiles et entraînent des impacts sur l'environnement, la faune et la flore (*i*) pollution des nappes phréatiques et eutrophisation des eaux de surface par lixiviation de nitrates, phosphates et herbicides (Griffon, 2006a) (*ii*) accumulation de résidus de pesticides au niveau végétal et réduction de l'activité pollinisatrice d'insectes, liée à l'utilisation d'insecticides, (*iii*) diminution de la diversité florale, par prolifération d'espèces nitrophiles, ainsi que faunistique du sol ; notamment des microorganismes.

L'altération des cycles biogéochimiques naturels N et P est l'effet anthropique le plus visible au niveau des services écosystémiques (Steinshamn et al., 2004), dépassant les hypothétiques « limites planétaires » pour N et en devenir pour P (Rockström et al., 2009; Steffen et al., 2015). Associée à la structuration des filières, cette intensification a favorisé une spécialisation forte des systèmes de production. Une séparation géographique des productions animales et végétales a conduit à une gestion particulièrement déséquilibrée de l'élément phosphore ; tel l'exemple des élevages intensifs de porc, en Bretagne.

Basée sur un choix d'espèces cultivées assurant une meilleure rentabilité à court terme, cette évolution a entraîné l'abandon d'espèces produisant certains services agronomiques et environnementaux, telles que les légumineuses (Duc et al., 2010a). Actuellement conjugué aux changements climatiques accentuant les stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinisation et l'érosion des sols l'agriculture, qui se doit de conserver de forts rendements, est face à un nouveau défi. Depuis les années 1990, l'émergence de préoccupations liées à l'environnement, aux disponibilités énergétiques et aux économies d'intrants pose la nécessaire question d'amélioration de l'efficacité des systèmes de productions agricoles. Le développement de l'agriculture biologique marque les premiers signes d'une remise en cause de ce système de production intensif en capital et hautement spécialisé, qualifié par (Allaire and Boyer, 1995) d'agriculture du fordisme. La reconnaissance croissante des externalités

négligentes associées à ces systèmes intensifs : pollution des écosystèmes, émissions de gaz à effet de serre, perte de biodiversité, nécessite de trouver de nouvelles solutions agronomiques en considérant, comme le suggère (Griffon, 2006a), quatre variables : quantité, qualité, production de services écologiques et adaptation des systèmes de production au changement climatique.

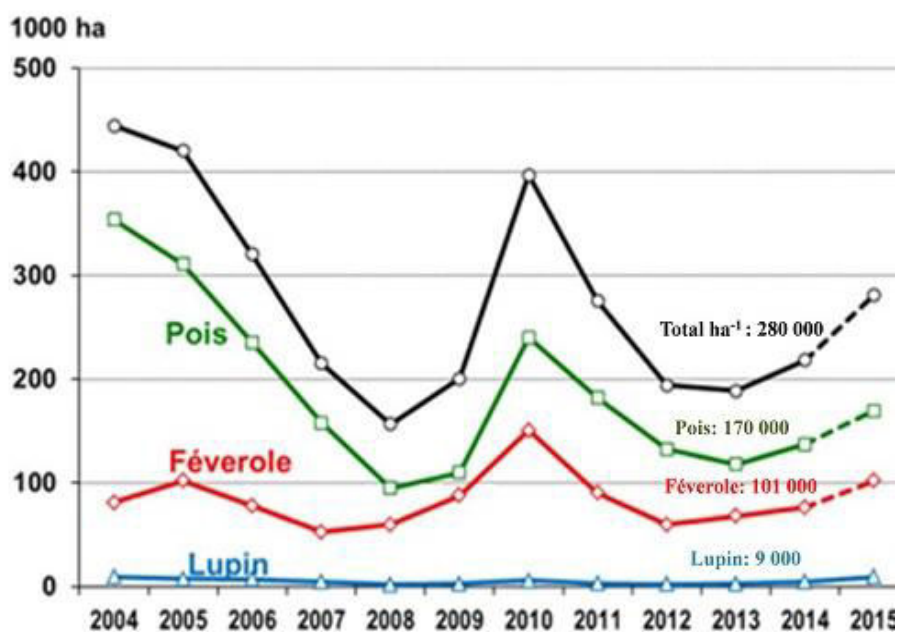


**Figure 1.** Appports d'intrants et production de céréales

Augmentation relative de la production annuelle mondiale de céréales (C) et de consommation annuelle d'engrais N et P (1961 à 2008). La base 100 (1961) correspond à 876,9 Tg C an<sup>-1</sup>, 11,6 Tg N an<sup>-1</sup> et 4,8 Tg P an<sup>-1</sup>. En 2008, ces valeurs étaient 2,520.7 Tg C an<sup>-1</sup>, 101,6 Tg N an<sup>-1</sup> et 17,1 Tg P an<sup>-1</sup> (Hinsinger et al., 2011).

L'utilisation intensive des mécanismes écologiques des écosystèmes offre des perspectives satisfaisantes pouvant conduire à des systèmes de culture plus durables, respectueux de l'environnement. A ces techniques, pourrait s'ajouter l'usage de méthodes conventionnelles, sous réserve d'interférences positives (Griffon, 2006b). Ces alternatives écologiques, pouvant se substituer aux techniques conventionnelles de forçage chimique ou pouvant s'associer à des techniques agronomiques plus raisonnées, se regroupent sous le terme (i) d'agro-écologie, (ii) d'agriculture écologiquement intensive, (iii) d'agriculture à haute valeur environnementale (Griffon, 2006b). La diversification des agro-systèmes par l'augmentation d'espèces cultivées et l'utilisation de légumineuses est proposée comme l'une des alternatives pour répondre aux enjeux de l'agriculture contemporaine (Altieri and Toledo, 2011; Malézieux et al., 2009).

Les légumineuses présentent plusieurs atouts : (i) au niveau alimentaire, pour la nutrition humaine et animale, les légumineuses constituent une source de protéines végétales de bonne valeur nutritionnelle, (ii) au niveau des systèmes de production, la capacité à fixer l'azote de l'air en symbiose avec des bactéries du sol leur confère un fort potentiel d'insertion dans les systèmes de culture à bas niveaux d'intrants et à faible niveau d'émission de gaz à effet de serre, (iii) dominées par deux ou trois espèces majeures, les légumineuses jouent un rôle de cultures de diversification, permettant une rupture des cycles des bioagresseurs. Les légumineuses peuvent donc jouer un rôle majeur dans l'intensification agro-écologique en faveur de systèmes agricoles plus durables, avec des effets positifs dans des domaines connexes à l'agriculture : réduction énergétique pour la synthèse d'engrais azotés de synthèse, amélioration des régimes alimentaires (Voisin et al., 2013). Malgré un intérêt environnemental certain et l'existence de débouchés importants les légumineuses, notamment à graines (protéagineux), occupent une très faible place dans les systèmes agricoles français et européens (Figure 2). Pourtant, différents signaux montrent le souhait des pouvoirs publics français et européens de favoriser le développement de ces cultures (Magrini et al., 2016).



**Figure 2.** Surface de protéagineux en France

Evolution de cultures de légumineuses en France (2014-2015), y compris semences et hors associations céréales-protéagineux.

Total protéagineux : 280 000 ha (+ 28%) ; pois : 170 000 ha (+24%), dont pois d'hiver : 44 000 ha (+74%) ; féverole : 101 000 ha (+32%), dont féverole d'hiver : 19 000 ha (+62%) ; lupin : 9 000 ha (+92%), dont lupin d'hiver : 6 800 ha (+120%).

Sources : UNIP d'après déclaration PAC jusqu'en 2014, y compris semences de pois potager pour le pois ( $\pm$  5000 ha environ en 2014) prévision 2015 d'après évolution ventes de semences (source GNIS).

Contrairement à l'azote présent en quantité illimitée dans l'atmosphère, le phosphore est extrait de roches phosphatées dont l'épuisement est prévu dans les cinq à dix prochaines décennies (Cordell and Neset, 2014; Dawson and Hilton, 2011) (Figure 3). La qualité des réserves diminue et augmente le coût d'exploitation. De plus, les préoccupations environnementales telles que la prolifération d'algues toxiques liée au lessivage de phosphore et d'azote des terres agricoles, sont majeures (Sharpley et al., 2015).

Le phosphore, second élément indispensable à la croissance des plantes après l'azote, ne peut être remplacé par un autre élément. Plus de 40% des terres arables mondiales sont affectées par une carence en phosphore disponible (Vance et al., 2003). De plus, moins de la moitié des apports d'engrais est utilisé par les plantes, entraînant de lourdes conséquences environnementales et économiques (White et al., 2012).

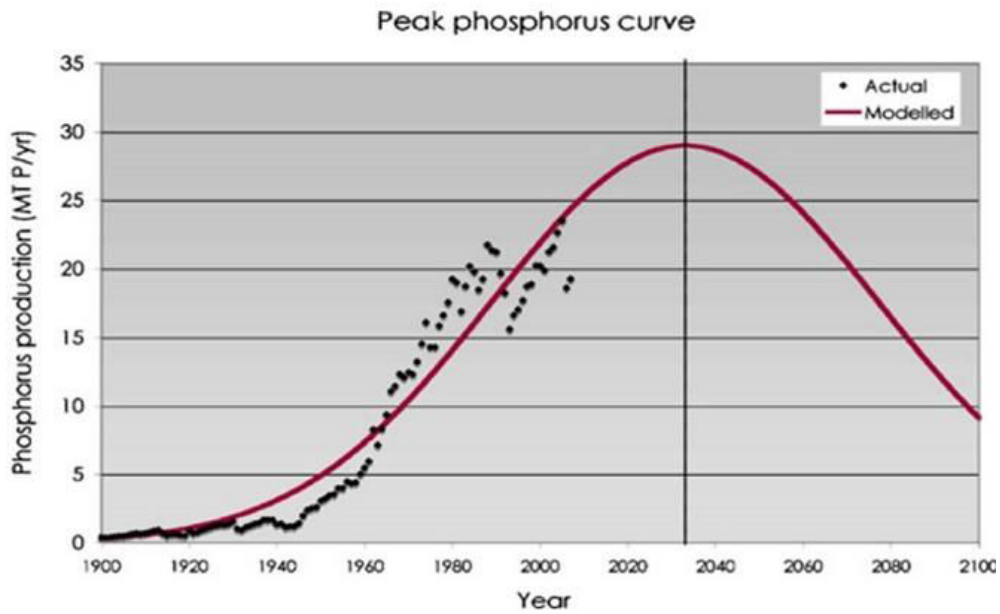
Face à des besoins alimentaires d'une population en forte croissance, la production agricole devra, au cours du siècle, faire face à une crise majeure concernant le phosphore (Vance et al., 2003). Pour des questions environnementales, économiques et de sécurité alimentaire, il est donc urgent de trouver des alternatives aux fertilisants phosphatés, en augmentant la disponibilité du phosphore, à partir des réserves des sols et des effluents et sa biodisponibilité pour la plante.

Le phosphore du sol est essentiellement présent sous forme de P organique (Po) et notamment de phytates. Réserve majeure de P des graines (Raboy, 2009), le phytate ne peut être digéré par les animaux monogastriques. Abondant dans les sols par accumulation d'intrants et déjections animales et aviaires, le phytate est peu disponible pour la plante. L'orthophosphate (Pi :  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), est la seule forme soluble de P absorbé par les plantes quasi inaptes à libérer des phytases : hydrolases minéralisatrices de phytate. Pour l'accès à ces réserves biologiques de P, des stratégies de gestions novatrices restent à définir. Contrairement aux plantes, les microorganismes sont très diversifiés pour la libération et la production de phytases. Une alternative favorable à l'utilisation du Po, au niveau agronomique, serait donc de gérer l'écosystème de façon à favoriser les communautés microbiennes minéralisatrices de phytate. Les phytases éliminent successivement les groupes phosphate du *myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6- hexakisphosphate (phytate), libérant du *myo*-inositol et du P inorganique assimilable par les plantes. Des activités phytases sont produites par divers microorganismes tels que : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Aspergillus*, *E. coli*, *Salmonella* (Azeem et al., 2015; Jorquera et al., 2008b; Richardson and Simpson, 2011; Singh and Satyanarayana, 2011). L'effet bénéfique des phytases microbiennes, au niveau de la rhizosphère des plantes, peut contribuer à favoriser leur croissance et leur productivité (Idriss et al., 2002; Richardson



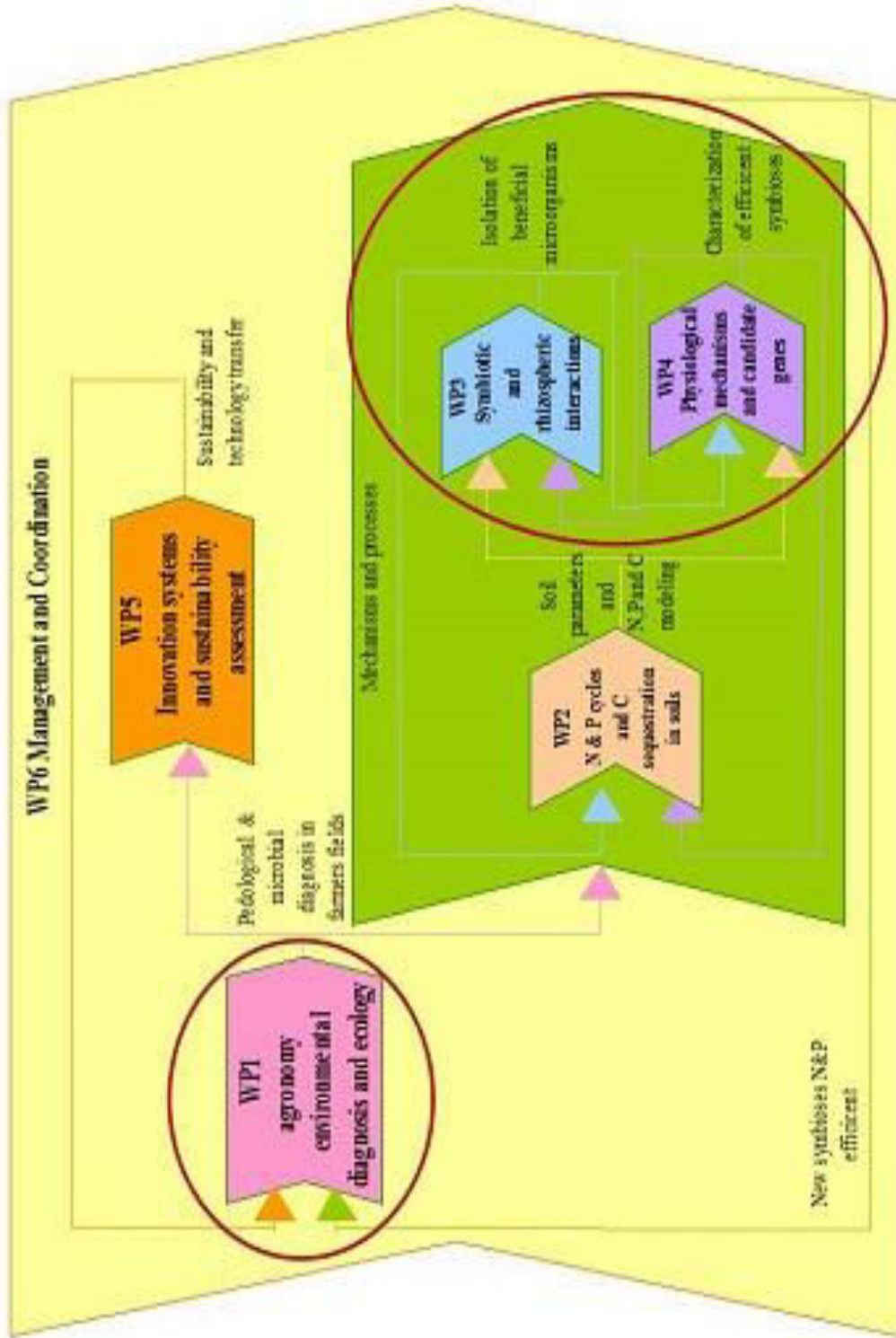
and Simpson, 2011; Sajidan et al., 2004). Alors que les mécanismes impliqués dans la fixation d'azote dans les systèmes de cultures sont assez bien identifiés, ceux concernant l'acquisition du phosphore sont encore assez peu décrits. L'introduction de légumineuses dans les systèmes de cultures représente un modèle déterminant, en raison de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, mais la mise en évidence d'un effet similaire pour le phosphore ouvre un nouveau champ de recherches (Graham, 2003). Par rapport aux plantes dépendantes de l'azote minéral, les légumineuses dépendantes de la fixation symbiotique d'azote nécessitent d'importants apports en phosphore pour satisfaire les coûts énergétiques de la symbiose. Les légumineuses fixatrices d'azote sont donc plus particulièrement affectées par la faible disponibilité du phosphore. La sensibilité des légumineuses à la déficience en phosphore est généralement attribuée au turn-over énergétique du carbone et du phosphore, requis dans le métabolisme (Schulze, 2005). Relation tripartite : légumineuse-rhizobium-rhizosphère, sous influence du rhizo-microbiote et basée sur une forte dépendance de disponibilité du phosphore, la symbiose fixatrice d'azote mérite une attention particulière concernant les moyens d'accès à la principale forme de Po du sol : le phytate.

Les rhizobia locaux efficaces pour la symbiose fixatrice d'azote, intervenant dans la dégradation du Po du sol de type phytate, présentent donc un intérêt agronomique et environnemental majeur, pouvant faire l'objet de production d'inoculums, également nommés biofertilisants (Briat and Job, 2017). Les inoculums microbiens sont des éléments prometteurs pour intégrer des solutions aux problèmes agro-environnementaux du fait de leur capacité à promouvoir la croissance et la santé des plantes, d'améliorer la disponibilité des nutriments et leur absorption (Adesemoye and Kloepper, 2009). Les inoculums microbiens comprennent trois grands groupes: (i) les mycorhizes arbusculaires (AMF), (ii) les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), et (iii) les rhizobia fixateurs d'azote, habituellement non considérés comme PGPR mais qui, en bactéries libres et/ou associés à des non-légumineuses, en ont les propriétés (Ghosh et al., 2014; Gopalakrishnan et al., 2014; Subramaniam et al., 2016)



**Figure 3.** Courbe du phosphore

Les réserves mondiales de P sont susceptibles d'atteindre un seuil maximum vers 2033 (Cordell et al., 2009).



**Figure 4. FABATROPIMED**  
 Services écologiques des légumineuses pour les cycles C, N, P dans les systèmes de cultures <http://www.agropolis-fondation.fr/fr/accueil.html>

Ces considérations agro-environnementales ont conduit à la construction d'un projet innovant : FABATROPIMED (2011-2016). Ce projet est bâti sur un projet antérieur FABAMED : FABA (Fabaceae), MED (Méditerranéennes), avec une extension TROPI (Tropicales). Celui-ci constitue un des trois grands projets fédérateurs soutenus par Agropolis Fondation, regroupant 15 équipes de recherche des UMRs Eco & Sols, Innovation, LSTM (Laboratoire des Symbioses tropicales et Méditerranéennes) ainsi que des unités SCA (Systèmes de cultures annuelles) et Diascope de Montpellier, en partenariat avec des unités d'Afrique méditerranéenne et tropicale (Algérie, Maroc, Tunisie, Burkina-Faso, Madagascar). Le projet FABATROPIMED s'appuyait sur l'objectif d'augmenter le bénéfice des légumineuses pour les systèmes de culture céréalière et l'environnement, par réduction d'utilisation de fertilisants minéraux et augmentation de la séquestration du carbone, en favorisant les interactions entre les micro-organismes du sol pour l'acquisition et l'utilisation de l'azote et du phosphore par les plantes. Basé sur une recherche participative dans six agro-écosystèmes (Afrique, France), le projet FABATROPIMED (Figure 4), subdivisé en six Work-Packages (WP), est axé sur un diagnostic agronomique et environnemental (WP1), associée à une étude de durabilité et d'innovation (WP5), en interdisciplinarité avec le suivi des cycles de C, N et P des sols et de l'atmosphère (WP2), la caractérisation de la diversité fonctionnelle microbienne, symbiotique et rhizosphérique (i.e. dans la zone d'influence des racines) (WP3) et la recherche de gènes d'efficacité d'acquisition et d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique d'azote (WP4). Ces recherches sont fédérées par une approche d'écologie fonctionnelle d'interactions plante-micro-organismes-sol-atmosphère sur trois espèces de légumineuses : haricot (*Phaseolus vulgaris*), fève, fêverole (*Vicia faba*) et niébé (*Vigna unguiculata*), en rotation ou en association avec (i) le sorgho, dans le zaï du Yatenga (Burkina Faso), (ii) le riz et le maïs dans le tanety d'Ivory (Madagascar), (iii) le blé dur dans la vallée de la Medjerda (Tunisie), le périmètre du Haouz (Maroc), le plateau de Sétif (Algérie) (Figure 5) et la région d'Occitanie (France) (Figure 6). Les technologies alternatives, biologiques et organiques qui en résultent, sont évaluées en réseau de placettes de production où sont simultanément appliqués des modèles numériques, avec la prise en compte des Micro-Organismes et des Matières Organiques du Sol (MOMOS), permettant la simulation des cycles du carbone, Azote, Phosphore (CNP) dans le sol et la rhizosphère. L'approche comparée d'agro-écosystèmes distinguera les mécanismes génériques de conservation et la résilience des cycles bio-géochimiques de CNP par rapport à ceux qui sont spécifiques des écosystèmes. Le projet FABATROPIMED considère les légumineuses comme des ingénieurs écologiques du fonctionnement biologique des sols, en apportant ainsi

une contribution spécifique au contexte international de coopération pour la sécurité alimentaire et environnementale, avec la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'AIEA (Agence Internationale d'Énergie Atomique), le CIAT (Comité International d'Accompagnement de la Transition), l'ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas), l'IITA (International Institute of Tropical Agriculture) et l'ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) du CGRAI (Consultative Group on International Agricultural Research) et des projets de Recherches Interdisciplinaires et Participatives sur les Interactions entre les Écosystèmes, le Climat et les Sociétés en Afrique de l'Ouest (Ripiecsa 2007-2011) ou focalisés sur l'introduction de légumineuses fixatrices d'azote dans les systèmes de culture africains (N2 Africa).

Site d'Agropolis Fondation : <http://www.agropolis-fondation.fr/fr/accueil.html>



**Figure 5.** Zones d'études sur le continent africain

Culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*), fève, fêverole (*Vicia faba*) et niébé (*Vigna unguiculata*), en rotation ou en association avec le sorgho, dans le zaï du Yatenga (Burkina Faso), le riz et le maïs dans le tanety d'Ivory (Madagascar), le blé dur dans la vallée de la Medjerda (Tunisie), le périmètre du Haouz (Maroc) et le plateau de Sétif (Algérie).



Mon travail de thèse, partie intégrante du projet FABATROPIMED, s'intitule : « Caractérisation fonctionnelle de rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France ». Celui-ci émerge sur trois « Work Packages » : WP1, WP3-WP4, et englobe deux principales disciplines (i) agro-écologique, au champ et (ii) physiologique moléculaire, au laboratoire. Le WP1 repose sur un diagnostic nodulaire au niveau multilocal, en placettes paysannes d'un agro-écosystème Sud de France, situé en région Occitanie et s'étendant du Lauragais à la Gascogne (Figure 6), où sont pratiquées les cultures de Féverole et de blé dur, en association ou en rotation. L'absence de pratiques agricoles prenant en compte la féverole dans les systèmes de cultures céréalières (blé, riz) en agro-écosystème camarguais, initialement présélectionné dans le projet, a conduit à une succincte étude en essais agronomiques de féveroles cultivées en rotation ou en association au blé dur, sous apports suffisants ou déficients en azote. Les travaux de recherche réalisés dans cet agro-écosystème sont présentés en annexe, sous forme de mini-publications, ainsi que d'un chapitre d'ouvrage.



**Figure 6.** Zone d'étude en France

Culture de la féverole (*Vicia faba*), en rotation ou en association avec le blé dur en région d'Occitanie, s'étendant du lauragais à la gascogne.





# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## I.1. L'agroécologie

Le terme d'agroécologie (ou agro-écologie), créé dès 1928 par l'agronome Bensing, est un concept utilisé en agriculture et en agronomie pour désigner à la fois une discipline scientifique, un mouvement social et un ensemble de pratiques agricoles (Tomich et al., 2011; Wezel and Soldat, 2009). L'agroécologie peut être définie comme l'étude intégrative de l'écologie de l'ensemble du système alimentaire, à des dimensions écologiques, économiques et sociales (Francis et al., 2003; Gliessman, 2013). Celle-ci s'appuie sur un sens d'innovation et d'expérimentation des agriculteurs aptes à adopter de nouvelles pratiques novatrices et efficaces, basées sur des processus et des fonctions écosystémiques valorisant l'(agro)biodiversité (Figure 7), alors que l'agriculture industrielle issue de la Révolution verte raisonne la production à partir d'intrants issus de synthèses chimiques ou d'extractions de roches (Altieri et Toledo, 2011). Ce mouvement agroécologique met en avant les questions de souveraineté et de sécurité alimentaire, de développement rural, et d'autonomie des agriculteurs (Martínez-Torres et Rosset, 2014), en vue d'une agriculture durable, écologiquement saine, économiquement viable et socialement juste (Pohajda et al., 2016; Wezel and Soldat, 2009). Schutter (2011) résume cette définition de l'agroécologie par « la recherche de moyens d'améliorer les performances environnementales et techniques des systèmes agricoles en imitant les processus naturels, créant ainsi des interactions et synergies biologiques bénéfiques entre les composantes de l'agroécosystème ». Le mouvement agroécologique s'enracine au Brésil et au Mexique, dans les années 1970-1980, suite à une résistance à la pression de la « Révolution Verte » des années 1950, alors qu'en France, l'agroécologie se développe à partir de 2008 (Gliessman, 2013). Au niveau international, la filière agro-écologique est portée par des réseaux officiels tel que la Via Campesina (200 millions de paysans), pratiquée par un nombre important de petits agriculteurs, et appréhendée explicitement ou implicitement comme science par un nombre croissant d'enseignants-chercheurs d'équipes de recherche, laboratoires, revues à comité de lecture (*Agroecology and sustainable food systems, The journal of peasant studies,...*). En France, il n'existe pas d'institut réellement spécialisé, mais une base de données nationale qui référence des acteurs plus ou moins impliqués ou intéressés par l'agroécologie et la restauration et/ou le développement d'infrastructures agroécologiques. Ceux-ci peuvent s'appuyer sur des travaux

de recherche et d'analyses multicritères, modélisations, réseaux d'essais, traitement d'images, web 2.0, etc. Ces acteurs regroupent : les ministères de l'Agriculture, de l'Écologie et de la Recherche soutenant, au travers du Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural (CASDAR) : la recherche agroécologique (30 % des projets financés de 2004 à 2012 sur la biodiversité ; nombre croissant depuis 2007, certainement lié au Grenelle de l'environnement et plan Écophyto 2018) ;

- l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) ;
- le Centre International de Recherche et d'Aide au Développement (CIRAD) ;
- l'Institut de Recherche pour le développement (IRD) ;
- l'Institut de recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA) ;
- l'association de soutien aux cultures (SOLAGRO) ;
- les instituts techniques agricoles (ITA) dont : l'Association de Coordination technique Agricole (ACTA) ; l'institut technique agricole (ARVALIS) ; horticole (ASTREDHOR) ; viticole (IFV) ; apicole (ITSAP) ; oléagineux (CETIOM) ; protéagineux (UNIP).



**Figure 7.** Système de culture plurispécifique

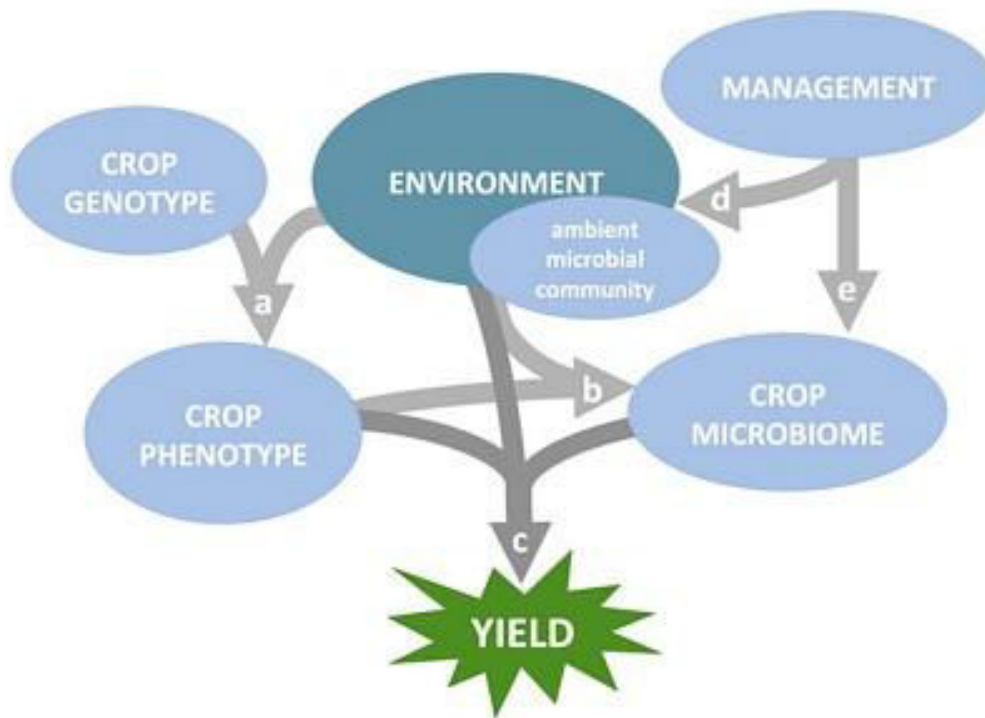
Production de féverole-blé dur, en culture associée.  
Source : Odile Domergue.



## I.2. Sol, microbiome et rhizomicrobiome

Le sol, constitué d'une phase solide (matière organique et inorganique), liquide, et gazeuse (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N) (Gobat et al., 2004), est soumis à des menaces anthropiques, facteurs d'érosion, perte de matières organiques, contaminations, tassement, salinisation, imperméabilisation, glissements de terrain, perte de biodiversité et de fertilité. Il est établi que dans un sol vivant, les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans les cycles bio-géochimiques terrestres et dans le fonctionnement des écosystèmes (Agler et al., 2016; Bastian et al., 2013). Une importante diversité taxonomique de micro-organismes colonisent et interagissent avec un hôte eucaryote, constituant le microbiote (Berendsen et al., 2012; Hacquard et al., 2015). Un parallèle est établi entre le microbiote racinaire végétal (rhizo-microbiote) et le microbiote digestif humain, pour l'acquisition de nutriments, la résistance aux pathogènes. Le microbiome constitue un véritable réservoir génétique pour la plante, formant une entité unique (holobionte) soumise à des mécanismes évolutifs (Vandenkoornhuysen et al., 2015). Il représente un potentiel génétique favorable à l'adaptation des plantes aux conditions environnementales du sol associées à des changements climatiques, limitant ainsi les effets délétères sur la croissance et le développement végétal (Busby et al., 2017; Renoud, 2016). Le microbiome est soumis à plusieurs facteurs biotiques et abiotiques (Figure 8) qui affectent la diversité, l'abondance et l'activité des taxons qui le composent (Hacquard et al., 2015). Ainsi, la structure du rhizomicrobiote dépend de (i) l'interaction entre la plante et son microbiote ; (ii) des composés exsudés (Tkacz et al., 2015) tels que des acides organiques libérés par les racines, nommé phénomène de rhizodéposition. Ces composés proviennent de métabolites exsudés par la plante et de débris végétaux ou mucilage correspondant à des cellules émises, lors de la progression racinaire dans le sol (Gougoulias et al., 2014), l'acide cinnamique (Bhattacharyya et Jha, 2012), les flavonoïdes et isoflavonoïdes (Baetz et Martinoia, 2014) ; (iii) l'influence du génotype végétal dans la sélection taxonomique du rhizomicrobiote (Lebeis, 2015) ; (iv) du sol et de la structure des communautés fonctionnelles de la rhizosphère, second génome pour la plante (Berendsen et al., 2012) ; (v) de la diversité et du fonctionnement du rhizomicrobiome (Gougoulias et al., 2014). De même, la structure génétique du microbiote racinaire est influencée par le stade de croissance de la plante et les conditions environnementales auxquelles il est soumis (Martínez-Hidalgo et Hirsch, 2017). La structure physique et la composition chimique du sol influent considérablement la structure taxonomique du rhizomicrobiote. C'est notamment au sein de ce rhizomicrobiome que

s'opèrent les échanges fonctionnels impliqués dans les cycles de l'azote, du carbone et du phosphore (Lidbury et al., 2017; Renoud, 2016; Richardson and Simpson, 2011). La capacité de souches bactériennes à solubiliser des sources de P inorganique, au travers de la production d'acides organiques (acides malique, malonique, citrique, etc) et à minéraliser le P organique, par des processus enzymatiques, est rapportée chez les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, notamment chez *R. leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) en ce qui concerne la solubilisation du P minéral (de Oliveira et dos Santos Hara, 2004) ainsi que la minéralisation du P organique chez la souche *Rlv* TAL 1236 (Abd-Alla, 1994). Cette souche bactérienne minéralisatrice de P organique possède une activité phosphatase cellulaire et extracellulaire, de type acide et alcaline ; préférentiellement alcaline. La capacité de *Rhizobium* sp. à survivre et à utiliser du glucose-1-phosphate, de l'ATP, ainsi que des  $\beta$ -glycéro-phosphates, indique que les activités des phosphatases acides et alcalines permettent une disponibilité du phosphore pour la croissance des rhizobia et une biodisponibilité pour la plante. La production de phosphatases en réponse à une carence en phosphore a été rapportée chez les organismes procaryotes et eucaryotes (Abd-Alla, 1994). Alors que l'activité cellulaire (endogène) des phosphatases profite à l'hôte producteur, l'activité extracellulaire (exogène) profite à l'hôte associé. Le phytomicrobiome ou microbiome végétal est défini en tant que corps végétal colonisé par des micro-organismes, i.e. la rhizosphère et la phyllosphère, et comprend tous les endophytes et épiphytes directement associés (Quiza et al., 2015). Ainsi, le phytomicrobiome est un sous-ensemble du phytobiome, englobant les plantes, l'environnement, et les organismes en interaction, influençant ainsi la santé des plantes et leur productivité (Martin et al., 2017). La perspective de prise en considération du phytomicrobiome nodulaire et de considérer l'interaction d'une légumineuse au-delà d'une seule espèce bactérienne fixatrice d'azote peut nous aider à comprendre comment cultiver, fertiliser, et protéger durablement les cultures (Martínez-Hidalgo et Hirsch, 2017). Cinq priorités pour l'étude du phytomicrobiome destinées à une agriculture durable (i) développer des systèmes hôtes-microbiome modèles pour les plantes cultivées et non cultivées avec des collections de cultures microbiennes associées et des génomes de référence ; (ii) définir des microbiomes et des génomes de base dans ces systèmes modèles ; (iii) élucider les règles d'assemblage d'un microbiome synthétique, fonctionnellement programmable ; (iv) déterminer les mécanismes fonctionnels des interactions du microbiome et (v) caractériser et affiner les interactions génotypiques, au niveau de l'environnement, du microbiome et de la gestion végétale (Busby et al., 2017).



**Figure 8.** Interactions biotiques et abiotiques sur le microbiome

L'interaction du genotype, de l'environnement, des techniques culturales, et du microbiome a une influence sur la production végétale (Busby et al., 2017).

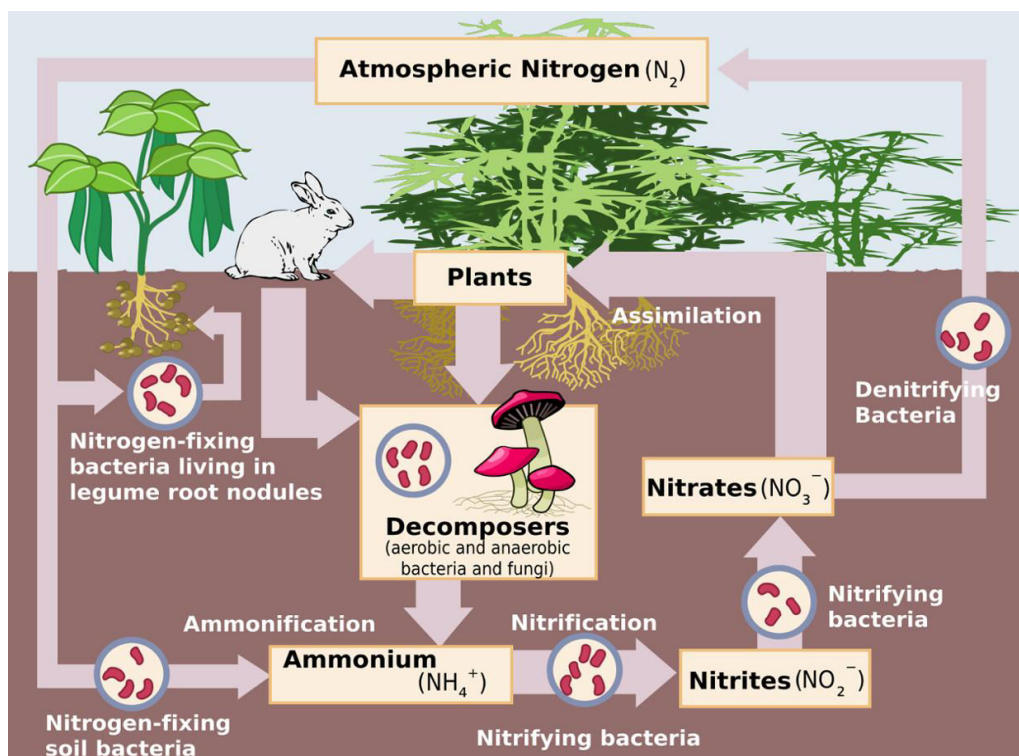
### **I.3. NPK et nutrition végétale**

Parmi les 14 macro- et micro-éléments indispensables à la croissance des plantes, l'azote, le phosphore et le potassium représentent les 3 principaux macro-éléments essentiels (Maathuis, 2009). Les nutriments prélevés par les plantes sont issus de réserves du sol ou de matières fertilisantes telles que (i) les engrais contenant un ou plusieurs éléments nutritifs pour la plante, notamment NPK (ii) l'amendement par des substances minérales ou organiques employées pour entretenir ou améliorer les propriétés physiques et chimiques du sol, ainsi que l'activité biologique, complémentaire à la disponibilité minérale du sol, favorable à la croissance et au rendement végétal (Vanotti et Bundy, 1994). Dans l'antiquité, les engrais étaient utilisés de façon empirique ; le P étant apporté par des broyats d'os parfois calcinés, l'N par des déjections animales et humaines et le K par des cendres végétales. L'apport d'engrais modernes de type NPK chimique, a permis une croissance et une productivité végétale bien supérieure à celle de plantes non fertilisées. Les intrants chimiques ont été introduits en Europe vers les années 1950, lorsque les faibles quantités de phosphates des sols avaient un impact négatif sur la production alimentaire des pays industrialisés (Cordell et Neset, 2014; Dawson et Hilton, 2011). La découverte de roches phosphatées, en 1840, a permis le maintien d'un système agricole, évitant une crise alimentaire de 1.5 milliards d'individus. Cependant, au début du XX<sup>ième</sup> siècle, la perte de fixation biologique d'azote pour les cultures représente un nouveau challenge pour les scientifiques et les agriculteurs. Le procédé Haber-Bosch, développé en 1909, permet une synthèse industrielle d'ammoniac par fixation d'azote atmosphérique ( $3\text{H}_2 + \text{N}_2 \rightarrow 2 \text{NH}_3$ , à 500°C, 300 atm). L'ammoniac produit est directement utilisé ou converti en nitrates. La production d'une tonne d'engrais azoté nécessite l'équivalent de 2 tonnes de pétrole. La production de 40 millions de tonnes d'ammoniac annuels représente environ 1/5 de la fixation symbiotique d'azote bactérienne.

#### **I.3.1 L'azote**

L'azote est le principal élément indispensable à la croissance des plantes et à leur productivité (Cleland et Harpole, 2010). Une déficience en N se caractérise par une chlorose des vieilles feuilles et une réduction de croissance des feuilles, des tiges et des racines. L'azote intervient dans la synthèse des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines, des lipides

membranaires ainsi que d'autres composants azotés. Il est le principal constituant de la chlorophylle, pigment majeur impliqué dans la photosynthèse (Maathuis, 2009). L'azote est présent dans les écosystèmes sous diverses formes chimiques, telles que : ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) ; nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ; nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ; oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ) ; oxyde nitrique ( $\text{NO}$ ) ou azote inorganique ( $\text{N}_2$ ). L'azote est généralement assimilé par les racines sous forme  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ . Bien que l'azote représente environ 80 % d'azote atmosphérique, celui-ci n'est pas directement utilisable par les végétaux et les animaux. L'incorporation de diazote dans une molécule organique (Figure 9) s'effectue par un processus biologique (fixation biologique d'azote) ; physique (éclaircs, combustion, volcanisme) ; synthèse industrielle (production d'engrais chimiques). La fixation biologique d'azote représente environ les deux tiers d'azote globalement fixé, tandis que le tiers restant est synthétisé par le procédé industriel Haber-Bosch (Halbleib et Ludden, 2000). L'azote, sous forme  $\text{NO}_3^-$ , très soluble dans l'eau, est le plus lessivé des sols et source de pollution des nappes phréatiques.



**Figure 9.** Cycle de l'azote

Source : [thinglink.com](http://thinglink.com)



### **I.3.2. Le potassium**

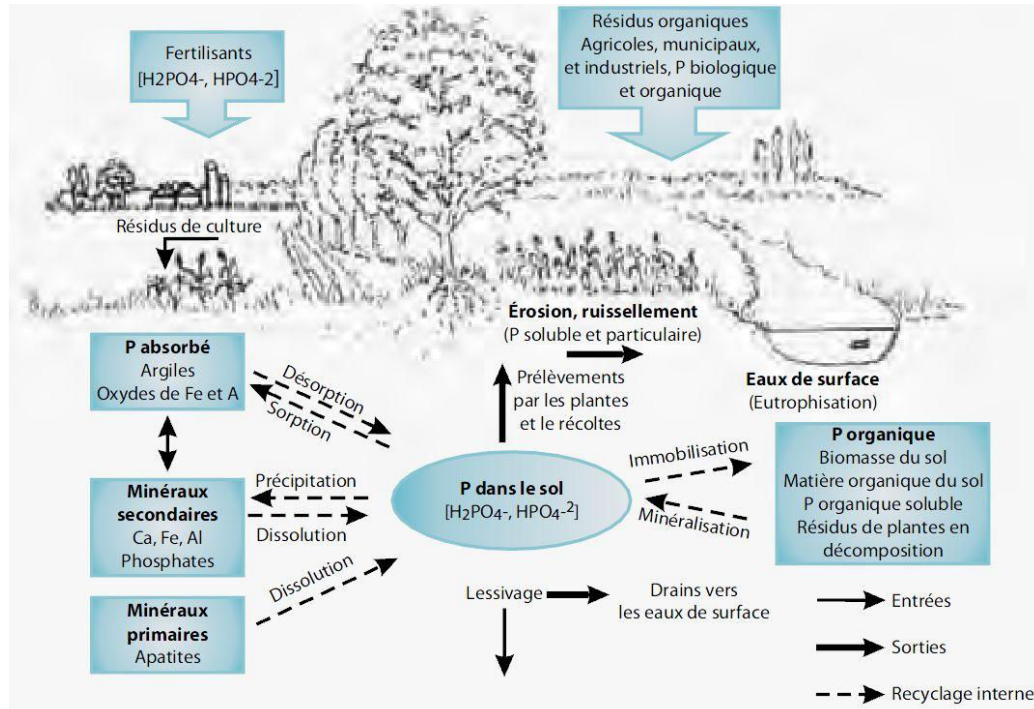
Le Potassium (K) joue un rôle important dans la turgescence des cellules végétales et dans l'activation d'enzymes impliquées dans la respiration et la photosynthèse. Favorisant le transfert des hydrates de carbone des feuilles aux racines, le potassium contribue à une bonne croissance racinaire et améliore le nombre et la taille nodulaire chez les légumineuses. L'apport de K dans les sols favorise les processus physiologiques impliqués dans la croissance et le développement des plantes (Marschner, 2012). Le potassium permet une meilleure résistance aux maladies, augmente la taille des grains chez le maïs, le sorgho, et le soja (Pettigrew, 2008) et améliore la qualité des fruits et des légumes (Lester et al., 2010). Les plantes absorbent la majorité du K en début de croissance ; chez le maïs, 70-80% de K est absorbé à floraison et 100% 3 à 4 semaines après. Dans les systèmes de culture, K est apporté sous forme de fertilisants inorganiques : chlorure de potassium, sulfate de potassium, sulfate de magnésium potassique et nitrate de potassium et sous forme organique : compost, cendre de bois, fumier. La concentration de K, dans les sols, varie de 0,1 à 1 mM. La carence en K est rare, mais la croissance des plantes est généralement stimulée par apport de K. Le potassium est extrait de lacs souterrains, salés et des océans. Les concentrations élevées de K dans les sols et l'eau ne sont nocives ni pour la santé humaine, ni pour la faune et l'environnement (Mvolo, 2010).

### **I.3.3. Le phosphore**

Second élément indispensable à la croissance et au développement végétal, après l'azote, le phosphore (P) joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques, la photosynthèse et la fixation biologique d'azote (Marschner, 2012). Il est un constituant des acides nucléiques (ADN, ARN), des enzymes, des phosphoprotéines et des phospholipides qui contrôlent la stabilité et les propriétés des membranes cellulaires. Le phosphore est impliqué dans les transferts d'énergie cellulaires par l'intermédiaire de molécules telles que l'ATP. Celui-ci est essentiellement absorbé par les racines, sous forme d'orthophosphate  $H_2PO_4^-$ , grâce à un processus actif de facilitation par un co-transporteur  $H^+$ . Environ 10 minutes après absorption, 80% du phosphore inorganique intervient dans les processus métaboliques et est incorporé dans les composants organiques, pour être ensuite transformé sous forme inorganique dans le xylème. Dans les graines en germination le phosphore,

principalement stocké sous forme de phytates, est libéré par des enzymes phytases avant d'être incorporé dans d'autres molécules.

Sous forme organique (Po) et inorganique (Pi), le phosphore est uniquement assimilable par la plante sous forme de Pi. Le phosphore se trouve dans trois principaux compartiments du sol (i) la roche mère composée de Po non assimilable, (ii) le complexe argilo-humique dont la disponibilité du P est dépendante du système de culture, (iii) la solution du sol qui contient le Pi assimilable (Figure 10). Les formes organiques représentent les 30-80% de P du sol avec, dans certains sols, une teneur supérieure à 50% de phytate (Turner et al., 2006). Les apports de phosphore aux cultures sont réalisés par le biais d'intrants phosphatés extraits de la roche mère (apatite, phosphorites), de déjections aviaires et animales (fumier, guano), ainsi que de carcasses animales. Face à l'épuisement des réserves et aux excédents dans les sols ainsi qu'à la faible disponibilité du P pour la plante, le phosphore est actuellement au cœur de forts enjeux agronomiques et environnementaux. L'accumulation de P associée à celle de N, dans les lacs et les rivières, engendre une eutrophisation, par prolifération d'algues toxiques et acidification du milieu, pouvant conduire à des cas extrêmes de dystrophisation, anoxie mortelle pour les organismes animaux et végétaux supérieurs.



**Figure 10.** Schéma du cycle du phosphore dans le sol et l'eau (Ghanimi, 2014)

## I.4. Les légumineuses

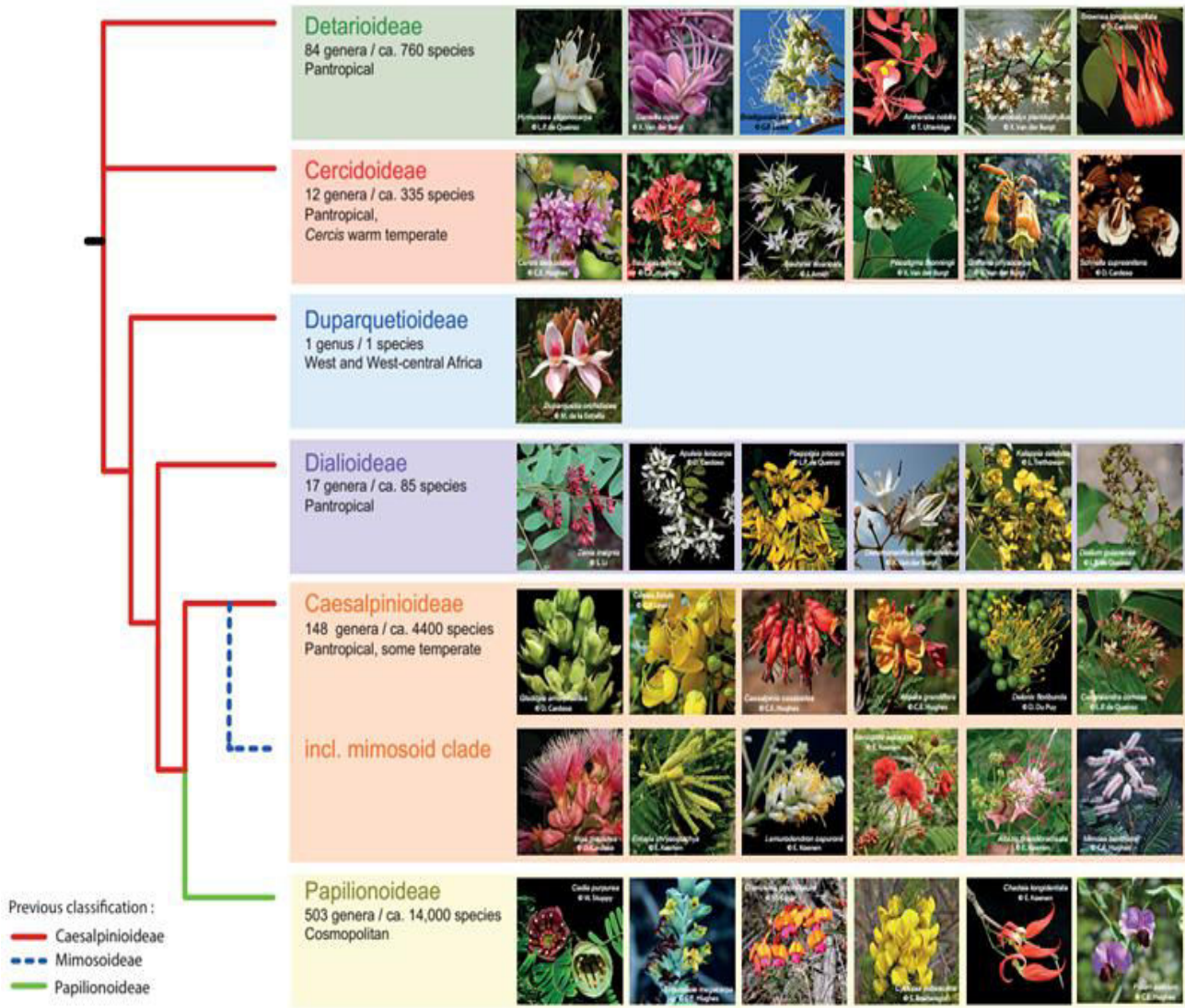
### I.4.1. Diversité des légumineuses

Les légumineuses, caractérisées par un fruit en forme de gousse, sont très diversifiées (Figure 11). Elles font partie de la famille des *Fabaceae* (ou *Leguminosae*), de l'ordre des Fabales, de la classe des *Dicotyledonae* et de la sous classe des *Rosidaeae*. Les légumineuses se classent au troisième rang dans la famille des angiospermes, après les *Asteraceae* et les *Orchidaceae* (Doyle and Luckow, 2003). Représentées par 770 genres et près de 20 000 espèces, les légumineuses se subdivisent en six sous-familles (Azani et al., 2017). Les *Papilionoideae* représentent la sous famille la plus diversifiée, comprenant 478 genres et environ 14 000 espèces tropicales et tempérées. Les espèces tropicales (*Phaseoloides*), de la tribue des *Phaseoleae*, comprennent les genres : *Cajanus* (pois cajan), *Glycine* (soja), *Phaseolus* et *Vigna* (haricot). Les espèces tempérées (*Galegoïdes*) comprennent dans la tribu des (i) *Viciae*, les genres : *Lens* (lentille), *Vicia* (vesce), *Pisum* (pois) ; (ii) *Trifolieae* : *Medicago* (luzerne), *Melilotus* (mélilot), *Trifolium* (trèfle) ; (iii) *Cicereae* : *Cicer* (pois chiche) et (iv) *Loteae* : *Lotus* (lotier) (Young et al., 2003). Les *Papilionoideae* sont principalement des herbacées et plus rarement des arbres et des arbustes, particulièrement adaptées aux conditions méditerranéennes. Les *Mimosoideae* (77 genres et 3 000 espèces) et les *Caesalpinioideae* (171 genres et 3 000 espèces) se composent essentiellement d'arbres et d'arbustes des régions tropicales et subtropicales (Azani et al., 2017).

A l'exception du genre *Parasponia* de la famille des *Ulmaceae*, toutes les plantes aptes à établir des symbioses fixatrices d'azote avec des bactéries du sol de type rhizobium appartiennent à la superfamille des *Fabaceae*. La symbiose fixatrice d'azote conduit à la formation de nodosités au niveau racinaire et exceptionnellement au niveau caulinaire. C'est au sein de ces nodosités que le rhizobium, différencié en bactéroïde, trouve les conditions physiologiques nécessaires à la fixation d'azote atmosphérique. Lors de la symbiose rhizobium-légumineuse, la plante fournit les substrats carbonés aux bactéroïdes présents dans les nodules, en échange de sources azotées rendues assimilables par le partenaire bactérien (Graham, 2003).

La nodulation des légumineuses par les rhizobia est un phénomène très fréquent. En effet, parmi les 20% de légumineuses étudiées, 97% des espèces de la sous-famille des *Papilionoideae* (pois, haricot, fève, lentille, etc.), 90% de la sous-famille des *Mimosoideae*

(robinier, glycine, acacia, etc.) et 30% de la sous-famille des *Caesalpinioideae* (flamboyant, barbade, séné d'Alexandrie, etc.) sont nodulées (Doyle and Luckow, 2003).



**Figure 11.** Arbre phylogénétique des sous-familles de légumineuses

[Chinese Academy of Sciences](http://www.cas.ac.cn)

#### I.4.2. Les légumineuses modèles

*Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* font partie des *Fabaceae* modèles pour l'étude de la symbiose fixatrice d'azote. Ces espèces réagissent différemment à leur partenaire rhizobien: *L. japonicus*, légumineuse tropicale, forme des nodules racinaires de type déterminé, alors que *M. truncatula*, légumineuse tempérée, forme des nodules de type indéterminé. La faible taille de ces espèces, l'auto-fertilité, le cycle de vie court, la floraison abondante et la production de semences font de ces modèles des espèces idéales pour des études moléculaires et génétiques classiques. La taille du génome de ces espèces est estimée à environ 500 Mb pour *M. truncatula* et 470 Mb pour *L. japonicum*; légèrement plus élevée que chez *Arabidopsis thaliana* (125 Mb) et significativement plus petite que chez la plupart des espèces de légumineuses, dont 4 000 Mb pour le pois ou 13 000 Mb pour la féverole (Young et al., 2003). Les caractéristiques de ces deux espèces, associées à la capacité de transgène par *Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizogenes*, font de *M. truncatula* et *L. japonicus* de précieux outils pour la compréhension des interactions symbiotiques moléculaires répondant à des besoins spécifiques des légumineuses. Dans la symbiose rhizobium-légumineuses, les exopolysaccharides (EPS) bactériens sont essentiels pour le développement des nodules racinaires infectés. Un gène codant un récepteur-like kinase, *Epr 3*, permettant le contrôle de cette infection a notamment été identifié chez *Lotus japonicus* (Kawaharada et al., 2015). En raison de leur importance économique, d'autres légumineuses, telles que le soja (*Glycine max*) et le pois (*Pisum sativum*), ont largement été étudiées. Des collections de germplasmes et de mutants de ces deux espèces sont disponibles. Des outils de génomique, protéomique, plates-formes de transcriptomique et de génomique fonctionnelle sont développés chez ces espèces. Les ressources génétiques d'espèces modèles ont permis de créer des cartes génétiques basées sur de nombreux marqueurs (Choi et al., 2004). Ces ressources font des légumineuses modèles, des candidates idéales pour l'étude physiologique et la compréhension de processus d'interactions symbiotiques plante-microbes fixatrices d'azote. Le niveau élevé de syntenie et de colinéarité entre légumineuses permet un transfert de connaissances de ces légumineuses modèles. En outre, ces espèces sont également affectées par la plupart des contraintes biotiques et abiotiques limitant le rendement des cultures de légumineuses, telles que les maladies fongiques et bactériennes, les nématodes, les parasites, le stress salin ainsi que la faible disponibilité des sols en phosphore. Depuis les années 1980, des recherches s'intensifient au niveau des légumineuses à graines pour la résistance aux maladies et

l'identification de marqueurs de résistance. Les fortes exigences de la fixation symbiotique d'azote vis-à-vis du phosphore favorisent des symbioses d'acquisition de P, établies avec des champignons mycorhiziens (Sprent and James, 2007).

### **I.4.3. Intérêt des légumineuses**

Les légumineuses ou Leguminosae se classent au second rang économique, après les Poaceae. Entre 1990 et 2012, l'exportation globale de légumineuses (i.e., légumineuses à graines) a doublé, de 6 à 13 millions de tonnes pour une valeur estimée à environ 10 milliards de dollars (Food and Agriculture Organisation [FAO]: <http://www.fao.org/pulses-2016/en/>). Depuis le début de l'agriculture les légumineuses, domestiquées parallèlement aux graminées, jouent un rôle clé dans leur développement (Hancock, 2012). Pour une sensibilisation de leur importance au plan nutritionnel, ainsi qu'agroécologique en faveur d'un maintien d'une agriculture durable et d'une biodiversité face au changement climatique, 2016 a été désignée par l'ONU « année internationale des légumineuses ».

Compte tenu de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, en association à des rhizobia du sol, les légumineuses sont sources de protéines. Comparées aux céréales, leurs grains contiennent trois fois plus de protéines, sans fertilisation azotée. Ainsi, dans de nombreuses régions pauvres de la planète, les espèces de légumineuses adaptées telles que : pois chiche, pois, haricot, fève, lentilles, arachide, constituent une importante source de nourriture humaine. Elles représentent, pour les populations locales, un apport en protéines, une source de revenu (huile, gomme,...), de fourrage pour les animaux (luzerne, trèfle,...) et de bois (Acacia, Dalbergia, Pterocarpus,...). Ainsi, les légumineuses couvrent globalement 66% des besoins de subsistance des communautés rurales dans les pays en développement, tout en assurant un maintien durable de la fertilité des sols et de l'équilibre des écosystèmes. Des légumineuses sont utilisées (i) comme plantes pionnières, initiatrices d'une succession écologique, pour revégétaliser des sols très pauvres et dégradés (Brunel et al., 2007), (ii) en phytoremédiation, pour le piégeage et la dégradation de contaminants du sol, tels : les herbicides, les pesticides et les métaux lourds (Afzal et al., 2014), (iii) la dégradation des hydrocarbures, avec pour exemple : la luzerne en association avec la microflore du sol, (iv) piège à nitrate (CIPAN), en agriculture biologique et engrais verts (Vandenberghé et al., 2009). La culture de légumineuses (pois, haricots et fèves vertes) peut générer d'importantes quantités d'azote dans les sols. En interculture la vesce est capable de stocker, en deux à trois mois, 60 à 80 kg d'azote par hectare dans la couche superficielle du sol (Bodson et

Vandenberghe, 2013). Certaines légumineuses sont tolérantes et très peu accumulatrices en métaux lourds. *Medicago sativa* en association avec *Sinorhizobium meliloti* présente une forte résistance à l'arsenic. Les légumineuses sont utilisées en ingénierie écologique, après sélection de souches rhizobiennes capables de dégrader les composants organiques. Du fait de la forte teneur en huile de leurs graines, le soja et *Pongamia pinnata* sont utilisables en tant que biodiesel (Ferguson et al., 2010). Les légumineuses sont également sources de molécules pharmaceutiques (Sprent, 2009). Elles sont cultivées (i) pour la fabrication d'huiles alimentaires (soja, arachide) et non alimentaires (encre, vernis, peintures d'huile de soja), (ii) comme plantes ornementales (*Albizia*, *glycine*,...), (iii) en agroforesterie (acacias, mimosas, ) (Somarriba and Beer, 2011). Les légumineuses à graines jouent un rôle important dans les rotations de cultures (Bedoussac et Justes, 2007). Elles peuvent répondre à deux défis majeurs de l'agriculture contemporaine : (i) réduction de la consommation d'énergie fossile et d'émission de gaz à effet de serre, par diminution d'apport d'engrais azotés contribuant à des émissions de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>O ; (ii) diversification des systèmes de culture, pour la réduction de pesticides, l'amélioration de l'utilisation des éléments nutritifs et de l'eau et diminution de pertes de nutriments dans les milieux de cultures (Magrini et al., 2016). A l'exception du lupin, les légumineuses, font parties des 80% de plantes aptes à établir des symbioses racinaires avec des champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules (VAMs). Ces champignons permettent une meilleure utilisation du phosphore du sol et une tolérance accrue au stress hydrique et à certaines maladies racinaires. La mycorhization favorise également l'interaction avec les bactéries fixatrices d'azote et est source d'énergie pour le fonctionnement nodulaire. Des essais de co-inoculations des deux symbiontes (rhizobium, VAM), en sol pauvre en N et P, améliorent la croissance et le rendement de la plante hôte et/ou de la plante associée, généralement en rotation ou en association, dans les systèmes de culture céréaliers (Wahbi et al., 2012).

Malgré leurs différents intérêts : agronomiques, nutritionnels et économiques et leurs fonctions bénéfiques pour des agro-écosystèmes durables et multifonctionnels, l'introduction des légumineuses dans les systèmes de cultures est encore insuffisante (Magrini et al., 2016). En Europe, les coûts d'approvisionnement en soja pour nourrir les monogastriques vont devenir problématiques à court terme. Les besoins énergétiques et les émissions de gaz à effet de serre (GES), liés à la synthèse d'engrais azotés devant être pris en compte, se priver d'azote naturellement synthétisé est globalement contre-productif. Dans nos régions comme ailleurs, des plans d'autonomie protéique se dessinent, reposant essentiellement sur la culture de légumineuses. Pour que les légumineuses à graines deviennent de bonnes candidates pour

une agriculture durable, elles doivent être attrayantes à la fois pour les producteurs et les utilisateurs. Les légumineuses sont utilisées depuis l'antiquité, en tête de culture des plantes cultivées. Certaines civilisations les tenaient en haute estime alors que d'autres les méprisaient. On cultivait déjà les légumineuses depuis la préhistoire ; il semble que la première culture de légumineuses soit originaire d'Asie du Sud-Est et non du Moyen-Orient, comme supposée jusqu'alors. Des découvertes archéologiques de graines de fèves et d'autres légumineuses datant de plus de 11 000 ans sont issues de cette région, également lieu d'origine du pois chiche et de la lentille. Les Grecs et les Romains considéraient les légumineuses comme nourriture du pauvre ; Pythagore était un fervent ennemi des légumineuses. Au Moyen-Age, les légumineuses constituaient une alimentation de base en Europe du Nord dont le climat était défavorable à une bonne culture de céréales. Aux XV<sup>ième</sup> et XVI<sup>ième</sup> siècles, l'exploration et le commerce ont permis d'introduire d'autres variétés de légumineuses en d'autres régions du monde. Si les légumineuses ont empiriquement été utilisées depuis l'antiquité pour améliorer et entretenir la fertilité des sols, les mécanismes moléculaires régissant la mise en place de cette symbiose émergent seulement depuis une soixantaine d'années.

#### **I.4.4. Intérêt de la légumineuse à graine : *Vicia faba***

Connue sous le nom botanique de *Vicia faba* L., la fève appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Papilionaceae* (Mezani et al., 2016). *Vicia faba* L. est une légumineuse à graines annuelle, d'une taille d'environ 60 à 200 cm. La tige est creuse et rigide et la feuille porte 2 à 6 folioles. Les fleurs, sous forme de grappes, apparaissent à partir du 5<sup>ième</sup> ou 7<sup>ième</sup> noeud végétatif. Selon les conditions de cultures et selon les génotypes, la floraison s'étale généralement sur 6 à 10 noeuds végétatifs. Le fruit est une gousse à peau épaisse. La féverole (*V. faba minor* L., ou *equina*) comporte jusqu'à 3 gousses par noeud reproducteur, incluant environ 3 graines par gousse. La fève (*V. faba major* L.) comporte une gousse par noeud reproducteur incluant environ 7 graines par gousse (Daoui, 2007). La grosseur de graine permet une distinction des deux sous espèces (i) la fève, dont la graine aplatie avec un hile noir mesure 2 à 3 cm de long (ii) la féverole dont la graine est plus petite, plus ou moins cylindrique ou ovoïde et légèrement comprimée. La racine pivotante, atteint environ 70 à 80 cm de profondeur. Une variabilité génétique pour des paramètres symbiotiques existe chez de nombreuses lignées de féveroles de collection, offrant une excellente ressource pour la protection des obtentions végétales. Bien que des variétés de printemps à fleur blanche sans



tanin soient homologuées, l'essentiel de la production est encore issu de variétés à fleurs colorées dont les graines contiennent des tanins (Figure 12). L'origine de *V. faba* est floue, aucun géniteur sauvage n'est trouvé et plusieurs différences existent entre *V. faba* et d'autres espèces : *V. narbonensis*, *V. galilea*, *V. johannis* et *V. hyaeniscyamus* (Duc, 1997). La culture de *V. faba* major s'est développée dans les pays du Sud méditerranéen et en Chine et s'est étendue au 16<sup>ième</sup> siècle à travers le Mexique et l'Amérique du Sud. La culture de *V. faba equina* s'est développée au Moyen Orient et en Afrique du Nord avec une plus grande concentration en Egypte. *V. faba minor* est présente en Ethiopie et est très développée en Europe. *V. faba* est largement cultivée au niveau international, avec une superficie de l'ordre de 40% de la superficie totale des légumineuses alimentaires ; la Chine en est le premier producteur. La production de féverole, développée en France depuis les années 2000, est d'environ 300 000 tonnes pour des rendements en graines de l'ordre de 4 à 5 tonnes par hectare, pouvant atteindre 7 tonnes (Arvalis-UNIP 2014). La culture de féverole d'hiver (semis/récolte : octobre/juillet) et de printemps (semis/récolte : février/août) est développée dans les régions climatiques douces et pluvieuses, principalement dans l'ouest et le nord du territoire (Figure 13). Apte à étouffer les mauvaises herbes, la féverole d'hiver est très adaptée à une culture biologique. La féverole est plus avantageuse que le pois et la lentille, de par sa résistance au pathogène racinaire : l'Aphanomyces. Par contre, elle offre une sensibilité à la bruche, un insecte qui dégrade la qualité des grains (fiche technique de la féverole [www.itab.fr](http://www.itab.fr)). Riche en protéines, *V. faba* est utilisée aussi bien pour l'alimentation humaine (gousses et grain sec) que pour l'alimentation animale. L'incorporation de fève ou de féverole dans l'alimentation du poulet de chair offre une possible substitution aux tourteaux de soja. La féverole est appréciée en tant que bon précédent cultural pour la céréaliculture, via ses reliquats d'azote (Duc, 1997) et l'amélioration de la structure du sol. Elle peut fixer entre 135 et 244 kg N ha<sup>-1</sup> et contribuer jusqu'à 155 kg N ha<sup>-1</sup> de reliquats. Grâce aux exsudats racinaires, *V. faba* améliore la disponibilité du phosphore du sol, chez le maïs associé et le blé qui lui succède. Toutefois, l'instabilité des rendements est le problème majeur chez *V. faba* ; seulement 5 à 15% des fleurs aboutiraient à la formation de gousses. Outre les stress environnementaux, cette instabilité peut être liée à différents facteurs abiotiques et biotiques. Parmi les principales contraintes abiotiques, on peut noter le stress hydrique et le déficit en phosphore. Au même titre que la plupart des légumineuses à graines, les contraintes biotiques chez la féverole sont liées à de nombreux agents pathogènes et parasites, y compris des bactéries, des virus et des mycoses (*Botrytis faba*, *Ascochyta faba*), ainsi que des infections par des nématodes et un parasitisme par *Orobanche crenata* (Stoddard et al., 2009) Il est

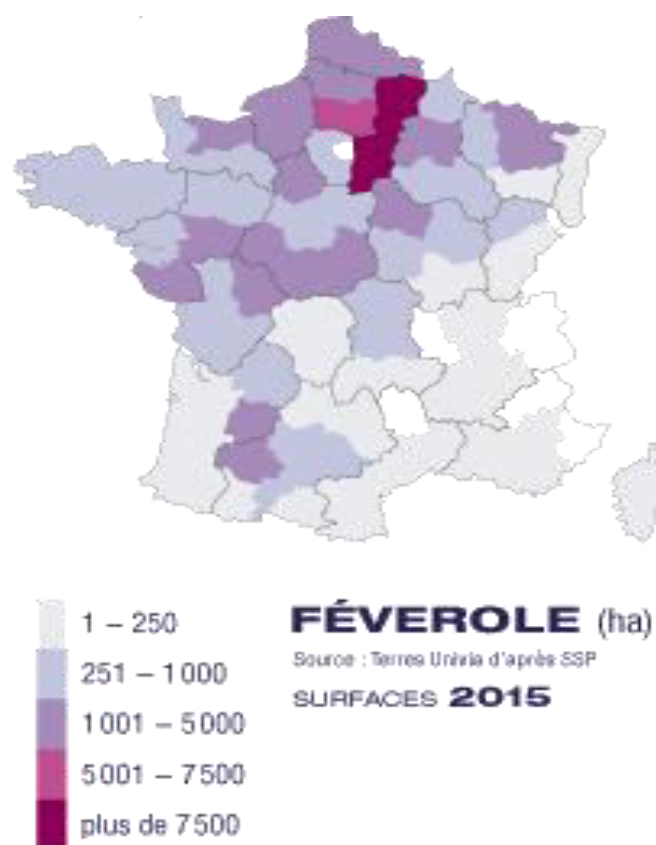
également à noter : le manque d'insectes pollinisateurs (avortement des fleurs), la faible luminosité, la compétition interne entre croissance végétative et développement reproducteur pour les photo-assimilats. Différents QTL (Quantitative Trait Loci) de résistance sont identifiés chez différentes légumineuses à graines y compris la féverole (Duc et al., 2010a).



**Figure 12.** Féveroles à fleur blanche et colorée

Féveroles de printemps à fleur blanche, à graines dépourvues de tanin (gauche) et à fleur colorée, à graines riches en tanins (droite).

Source : Odile Domergue.



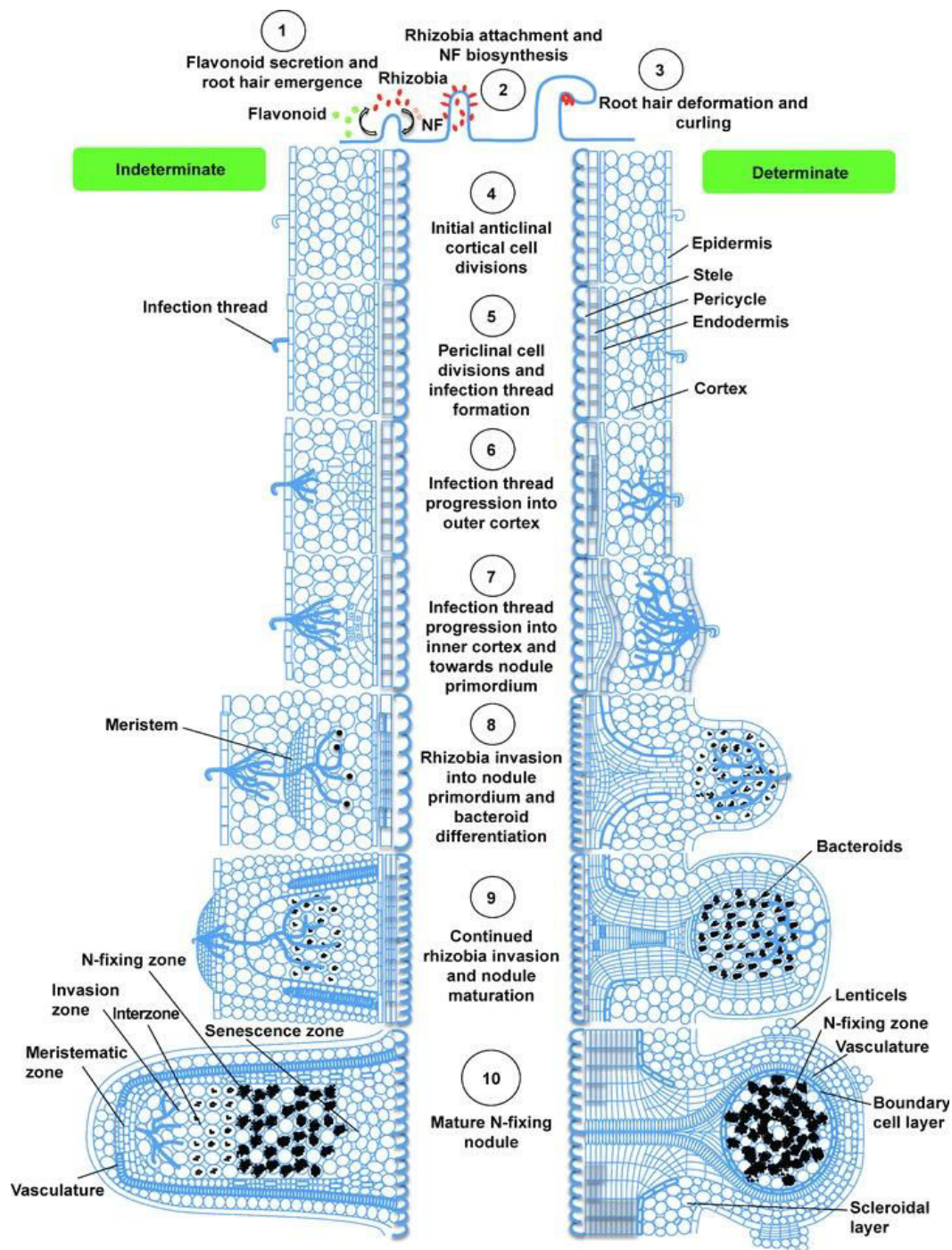
**Figure 13.** Répartition des surfaces de féverole, en France en 2015

Les principales zones de culture de féverole en France se situent en Picardie, Ile-de-France, Midi-pyrénées, Pays-de-la-Loire, haute-Normandie et centre.  
 Source : Terres Univia 2015.

## I.5. La nodulation

Les légumineuses ont pour principale caractéristique, leur réactivité aux facteurs Nod sécrétés par leurs symbiotes bactériens (Oldroyd et al., 2011). La réponse de la plante varie en fonction du tissu concerné et est induite à des concentrations de facteurs Nod de l'ordre du pico- ou du nano-molaire. Quelques secondes après contact avec les facteurs Nod, des flux d'ions traversent la membrane plasmique de l'épiderme racinaire et entraînent une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation s'accompagne d'oscillations calciques intracellulaires périodiques, ainsi que de l'expression de gènes de la plante impliqués dans les étapes précoces du cycle cellulaire (Kawaharada et al., 2015). Si le facteur Nod produit par rhizobium est l'inducteur, les oscillations calciques sont suivies de la courbure des poils absorbants, d'une modification du cytosquelette et de l'initiation de la division des cellules corticales de la plante. Au niveau du cortex, outre la déformation de cordons d'infections chez certaines légumineuses, la division cellulaire entraîne la formation d'un primordium nodulaire (Cullimore et al., 2001; Geurts et al., 2005). Les cordons d'infection traversent les couches cellulaires pour atteindre le primordium nodulaire, à l'intérieur duquel sont relargués les rhizobia (Gage and Margolin, 2000). Le primordium se transforme ensuite en nodule, alors que le rhizobium se différencie en bactéroïdes, séparés du cytoplasme des cellules végétales par une membrane pér bacté rienne. L'unité fixatrice d'azote formée par le bactéroïde, l'espace et la membrane pér bacté roïdiens est appelé symbiosome. Deux types de nodules : indéterminé (allongé) et déterminé (rond) sont définis en fonction de la localisation du système vasculaire (racine ou tige) et du niveau de persistance d'une zone méristématique ; La forme allongée du nodule indéterminé étant liée au maintien d'un méristème apical et la forme ronde du nodule déterminé en une absence de méristème apical (Figure 14). Les nodules observés sur le système racinaire de féveroles sont de type indéterminé et de morphologie coralloïde, selon la classification établie par Corby (1981). Le méristème apical nodulaire en constant développement lui confère une forme quelconque, généralement en Y. Cette morphologie nodulaire observée chez *V. faba* est en accord avec les données de littérature qui rapportent que les légumineuses de cette espèce induisent des nodules de type indéterminé. Le type nodulaire des racines de légumineuses est déterminé par la plante hôte et non par la souche rhizobienne (Hirsch, 1992). Les légumineuses tropicales tel le haricot (*Phaseolus vulgaris*), induisent des nodules du type déterminé, tandis que les légumineuses des régions tempérées comme la fève (*V. faba*), le pois chiche (*Cicer arietinum*) induisent des

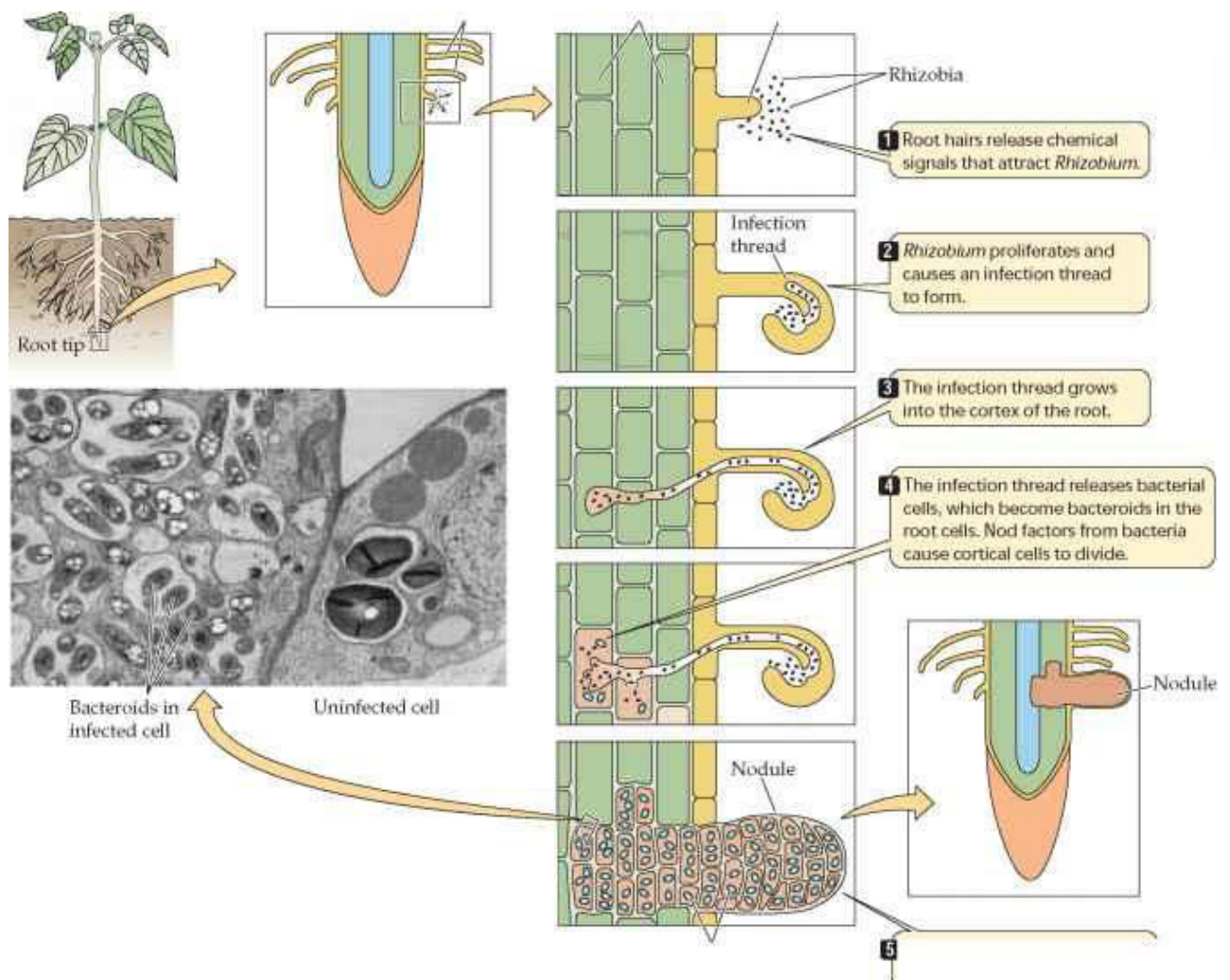
nodules de type indéterminé. Au sein des nodosités, une protéine spécifique appelée leghémoglobine est formée par synthèse de globine par la plante et d'hème par le rhizobium. La leghémoglobine permet de maintenir des concentrations élevées en oxygène dans le nodule, mais à basse pression partielle, compatible avec le fonctionnement de la nitrogénase pour la fixation d'azote. La structure des facteurs Nod n'explique pas toujours la spécificité d'hôte des rhizobia. *R. etli* et *R. loti* synthétisent des facteurs Nod identiques et ont un spectre d'hôte différent : *Phaseolus* spp. et *Lotus* spp., respectivement (Cárdenas et al., 1995) ; tout comme *R. leguminosarum* bv *trifolii* et *R. leguminosarum* bv *viciae* (Orgambide et al., 1995). Ces différences de spectre d'hôte seraient liées à une reconnaissance différentielle des flavonoïdes par les protéines NodD des deux espèce rhizobiennes (Broughton et al., 2003a). Dans certains cas, la plante semble posséder plusieurs récepteurs ; chacun étant spécifique d'un type de facteur Nod.



**Figure 14.** Stades du développement indéterminé et déterminé de nodules de légumineuse

La figure illustre le développement d'un nodule de pois (indéterminé, à gauche) et de soja (déterminé, à droite). Les divisions cellulaires des nodules indéterminés ont lieu dans le cortex interne, alors qu'elles sont sous-épidermiques chez les nodules déterminés. Le méristème situé à la pointe du primordium des nodules indéterminés est en constant développement, alors qu'il est non persistant chez les nodules déterminés. Les différents stades de développement, types de tissus et zones de nodulation, sont identifiées (Ferguson et al., 2010).





**Figure 15.** Etapes précoces du développement d'un nodule racinaire

La fixation d'azote s'appuie sur l'invasion racinaire de la légumineuse par *Rhizobium* et la formation de nodules. Les schémas montrent les divers stades de développement nodulaire, ainsi que des bactéroïdes de *Rhizobium japonicum*, dans des vésicules racinaires de soja. Une cellule de racine non infectée se trouve à droite.

[78stepshealth.us](http://78stepshealth.us)

### I.5.1. Les gènes de nodulation et facteurs Nod

La biosynthèse des facteurs Nod est déterminée par différentes combinaisons de gènes *nod* bactériens répartis en deux groupes : les gènes *nod* communs (*nodA,B,C*), impliqués dans la synthèse du squelette de base des facteurs Nod et les gènes *nod* spécifiques (hsn : host specific nodulation gene) qui codent pour des enzymes intervenant dans le greffage des décorations chimiques sur le squelette de base. La première étape de synthèse des facteurs Nod est sous contrôle de *nodC* qui code pour une N-acétylglucosaminyltransférase, laquelle assemble 2 à 5 résidus d'UDP-N-acétylglucosamines. Le gène *nodB* code pour NodB, une déacétylase qui élimine le résidu N-acétyl à l'extrémité non réductrice des facteurs Nod (Spaink, 2000). Le gène *nodA* code une N-acétyltransférase qui spécifie le transfert d'une chaîne acyl soit de type courant (acide gras mono- ou poly-insaturé provenant du métabolisme général des lipides), soit de type  $\alpha\beta$ -mono/poly insaturé (sous le contrôle des gènes *nodFE*). Les gènes *nodA* et *nodC* sont impliqués dans la spécificité d'hôte. La localisation des gènes *nod* diffère d'une espèce bactérienne à une autre. Chez *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. tropici*, *Sinorhizobium* sp. NGR 234, *S. meliloti*, les gènes *nod* sont localisés majoritairement sur des plasmides symbiotiques (pSym). La taille de ces plasmides varie de moins de 400 kb à plus de 1,5 Mb. Chez *B. japonicum*, *A. caulinodans*, *S. fredii* ou *M. loti*, les gènes *nod* sont chromosomiques et sont localisés sur des îlots symbiotiques de 610 kb chez *M. loti* et de 410 kb chez *B. japonicum*. Les gènes de nodulation font partie du « génome accessoire » (Young et al., 2003) et sont généralement regroupés en opérons, précédés d'une *nod box* régulatrice inductible par le complexe NodD-flavonoïdes. Les gènes *nodABC* présentent différentes organisations génétiques qui témoignent de phénomènes de recombinaisons importants. L'orientation et le nombre de copies d'un gène varient d'une espèce à l'autre. Certains gènes *nod* se localisent sur divers réplicons des plasmides pSym, tel le cas de *R. etli* CFN42 qui nécessite, pour un optimum d'activité symbiotique, la présence de plusieurs des 6 plasmides dont il peut être l'hôte.

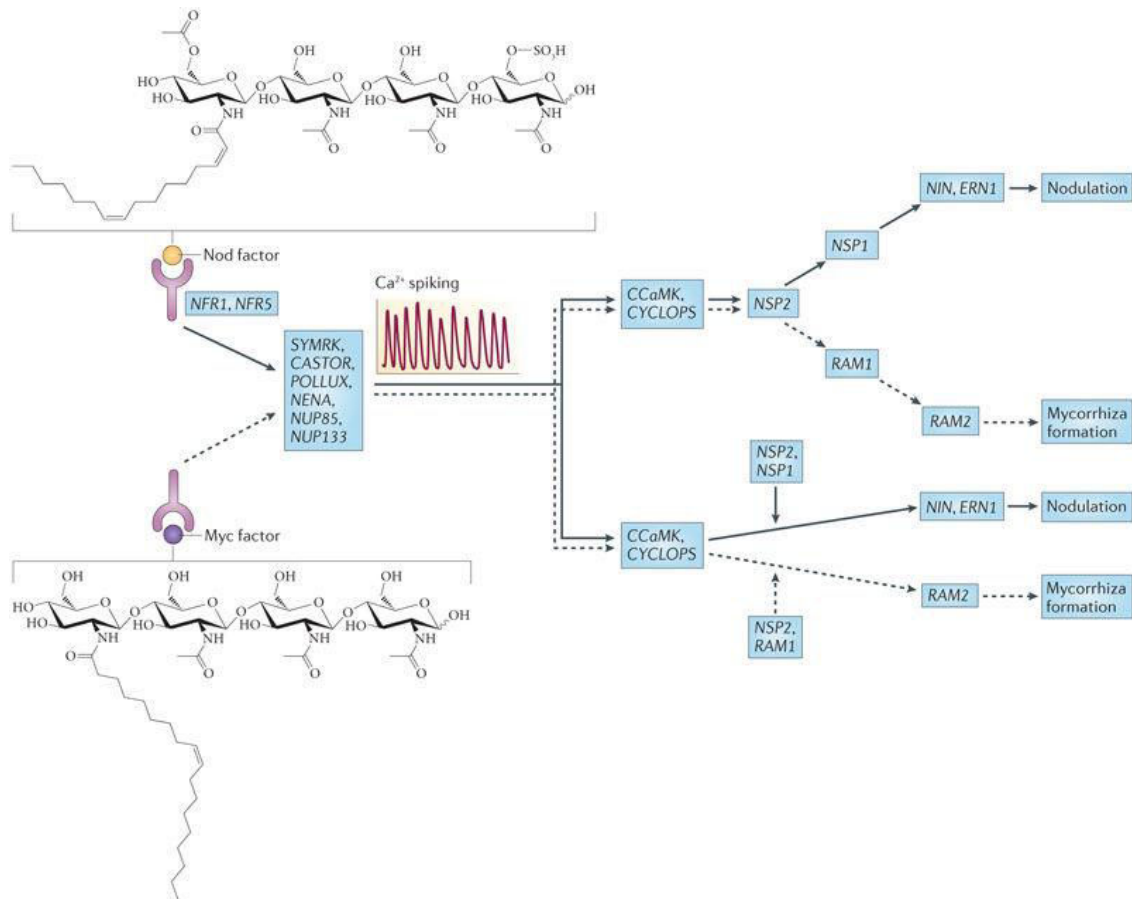
Les facteurs Nod ont une structure commune : ce sont des lipochito-oligosaccharides constitués d'un squelette de base composé de 3 à 5 résidus de N-acétyl-D-glucosamine, liés en  $\beta$ -1,4 et monoacylés sur le groupe amino de la glucosamine terminale non réductrice. Selon la bactérie, ce squelette porte des groupements chimiques variés (fucose, arabinose, carbamate, méthyl) sur les glucosamines situées aux deux extrémités ; ceux-ci ont un rôle clé dans les



mécanismes de reconnaissance entre la plante hôte et la bactérie (Broughton et al., 2003a). Chez *Bradyrhizobium japonicum*, les facteurs Nod présentent un sucre complémentaire, le 2-O méthylfucose, à l'extrémité réductrice impliquée dans la spécificité de la symbiose *Bradyrhizobium japonicum*–soja. Une double glycosylation est visible au niveau de facteurs Nod de *Bradyrhizobium alkanii* où un groupement glycérol est présent sur le carbone C1 de l'extrémité réductrice. Cependant, certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques capables d'induire la formation de nodules racinaires et caulinaires sur les tiges de certaines légumineuses tropicales : les *Aeschynomeneae*, sont dépourvues de gènes canoniques *nodABC*, remettant en question l'universalité de ce mécanisme symbiotique de nodulation rhizobium-légumineuses (Fabre et al., 2015).

### **I.5.2. Voies de signalisation des Facteurs Nod et Myc**

Chez les légumineuses, plusieurs composés sont essentiels pour la perception et la signalisation des facteurs Nod. Certains de ces composés sont également requis pour la symbiose mycorrhizienne, suggérant l'existence d'une voie commune de signalisation symbiotique (Figure 16). Trois gènes de la voie symbiotique ont été identifiés chez les légumineuses modèles *Medicago truncatula* et l'espèce végétale étroitement apparentées *Pisum sativum*. *Lotus japonicus* possède sept gènes impliqués dans la mycorrhization et la nodulation. *NFR1*, *NFR5* et *NFP* font partie des récepteurs des facteurs Nod. *DMI1/Castor*, *DMI2/SYMRK*, *Pollux*, *NUP133* et *SYM24* sont requis pour la mycorhization et la nodulation, et ont des fonctions dans l'activation des oscillations calciques, en réponse aux facteurs Nod. *DMI3/SYM15*, également requis pour la mycorhization et la nodulation, n'intervient pas dans l'induction des oscillations calciques. *Nsp1*, *NSP2* et *SYM35* se trouvent sur une branche spécifique de la nodulation, en aval des oscillations calciques, et il est probable que des composés mycorrhiziens spécifiques soient présents tant en amont qu'en aval de la voie symbiotique commune. *SYM6*, requis pour la nodulation et la mycorhization, permet l'induction des méristèmes nodulaires en réponse aux bactéries rhizobiennes, indiquant un fonctionnement soit en début ou en fin de signalisation (Oldroyd, 2013).



Nature Reviews | Microbiology

**Figure 16.** Signalétique des facteurs Nod et Myc

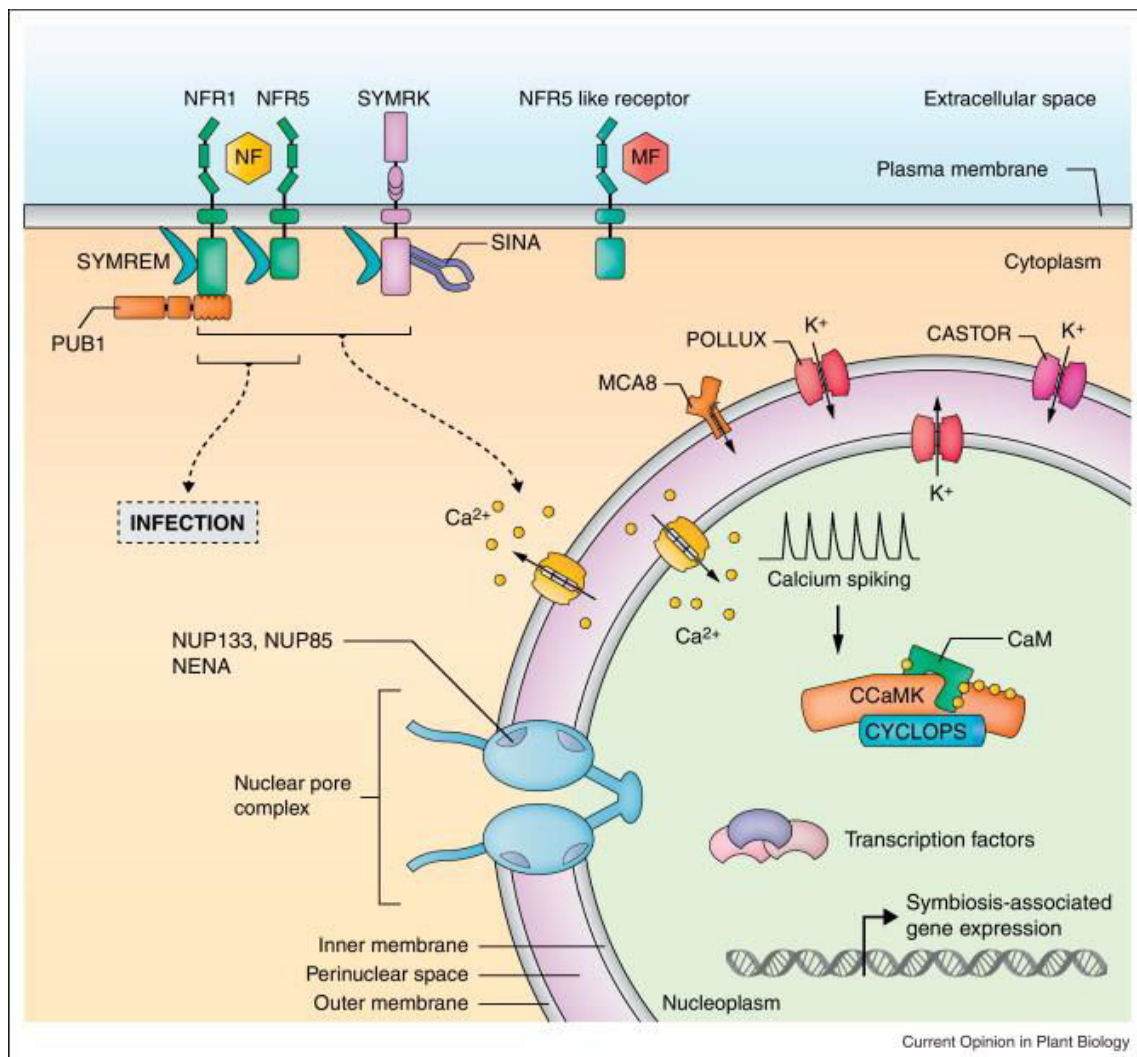
La structure des facteurs Nod de *Sinorhizobium meliloti*, symbionte de *Medicago truncatula*, (haut), est comparée à la structure des facteurs Myc, lipochitooligosaccharide non-sulphaté, produite par un champignon arbusculaire *Glomus intraradices* (bas) (Oldroyd, 2013).

### I.5.3. Signaux de reconnaissance des Facteurs Nod et Myc

Deux récepteurs kinase-likes, *NFR1* et *NFR5*, possédant respectivement deux et trois domaines LysM, sont requis pour la perception des Facteurs Nod (

Figure 17). Un équivalent de récepteurs kinase-likes est présumé exister pour la reconnaissance d'un signal mycorrhizien. *DMI2/SYMRK* est un récepteur kinase-like, comprenant trois domaines riches en leucine, qui est un composé de la voie symbiotique commune. La cascade de phosphorylation au niveau de la membrane plasmique qui suit la reconnaissance par les facteurs nod peut être liée à l'induction des changements calciques associés au noyau. Ceci nécessite probablement un messager secondaire qui pourrait être produit par des phospholipases C et D. Ces phospholipases pourraient être régulées par la phosphorylation et l'activité potentielle d'un canal cationique formé par *DMI1/POLLUX* et

*CASTOR*. Le pore nucléaire est nécessaire pour établir un lien entre la perception des facteurs Nod et l'induction des oscillations calciques au niveau de la membrane plasmique et pourrait permettre l'entrée dans le noyau du messenger secondaire. Le canal calcique interne de la membrane nucléaire, et peut-être externe à l'enveloppe nucléaire, pourrait être activé par le messenger secondaire. Des pompes calciques utilisatrices d'ATP pour le transport du calcium peuvent exister sur les membranes des canaux calciques et permettre le stockage du calcium. Les oscillations calciques de la membrane et du cytoplasme nucléaire associé à CCaMK activé ont lieu dans le noyau. Cette kinase activée par Ca régule l'expression de gènes d'induction de la nodulation (nodulines) via les régulateurs transcriptionnels NSP1 et NSP2 connus en tant que lipoprotéines liées à l'ADN. Une bifurcation de la voie de signalisation existe en aval de CCaMK, formant une branche de nodulation et certainement de mycorrhization spécifique (Oldroyd, 2013).



**Figure 17.** Transduction du signal symbiotique dans les cellules racinaires

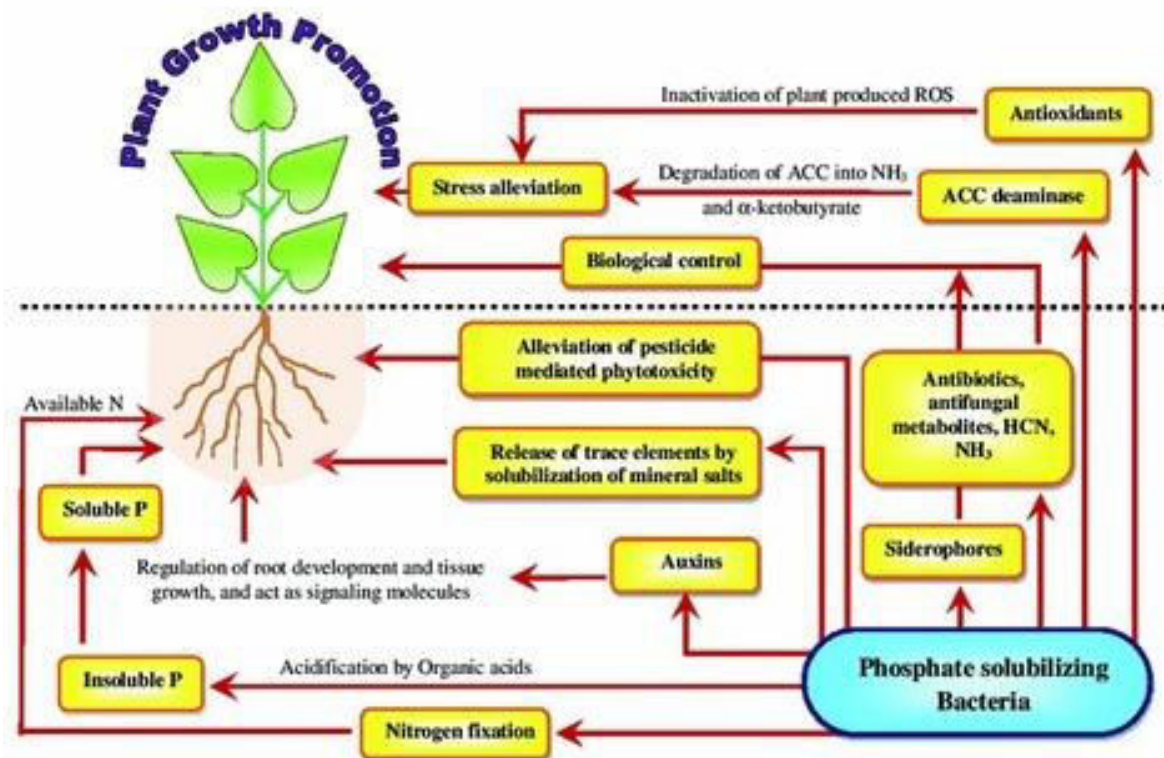
Perception probable des facteurs Nod (NFs), au niveau de la membrane plasmique (MP), liée à des récepteurs de type kinases (LYKs), dont les récepteurs de facteurs Nod (NFR1) et (NFR5) chez *L. japonicus* et LYK3 et NFP, chez *M. truncatula*. Un récepteur de type NFR5 semble impliqué dans la perception de facteurs Myc (MF) de champignons arbusculaires. PUB1 : protéine U-Box végétale de *M. truncatula*, est une E3 ubiquitine ligase qui interagit avec le domaine kinase de LYK3, et exerce une régulation négative sur la signalisation nodulaire. SINA interagit avec le domaine kinase de SYMRK entraînant sa relocalisation et sa dégradation. Les récepteurs symbiotiques de MP interagissent avec SYMREM1 surexprimé durant la nodulation et impliqué dans les étapes d'infection. Après quelques minutes, la perception LCO au niveau MP entraîne des oscillations calciques nucléaires. La génération, le décodage et la transduction de ce signal sont dépendants de composés communs aux deux types de symbioses. Ceux-ci sont génétiquement positionnés en amont (SYMRK/DMI2, CASTOR/POLLUX/DMI1, NUP85, NUP133, NENA) ou en aval (CCaMK/DMI3, CYCLOPS/IPD3) des oscillations calciques. Plusieurs facteurs de transcription tels que NSP1/2, NIN, sont impliqués dans l'expression de gènes symbiotiques. MCA8 : pompe Ca-ATPase de la membrane nucléaire (Singh and Parniske, 2012).

## **I.6. Les microorganismes fixateurs d'azote**

Les micro-organismes fixateurs d'azote ou diazotrophes appartiennent à deux des trois règnes primaires : les archaebactéries et les eubactéries. L'étude phylogénétique de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S) des eubactéries, montre que des fixateurs sont présents dans de très nombreux groupes bactériens. La propriété de fixation d'azote semble donc très ancienne et a certainement joué un rôle prépondérant dans l'établissement et le maintien de la vie sur terre. Chez les eubactéries, la fixation d'azote est associée à une large diversité de métabolismes : des anaérobies jusqu'aux aérobies, des bactéries photosynthétiques, des cyanobactéries et des actinomycètes. Certains fixateurs d'azote vivent à l'état libre dans le sol et les eaux et d'autres sont associés à des plantes (symbioses vraies ou associatives). Parmi les bactéries du sol qui forment des nodosités sur les racines des plantes (symbioses vraies) : les espèces rhizobiennes s'associent aux légumineuses et au seul genre *Parasponia* de la famille des Ulmacées (Raven and Edwards, 2001).

### **I.6.1. Les PGPRs**

Outre ces symbioses vraies, des bactéries du sol amélioratrices de la croissance des plantes ou “ Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria ” (PGPR) colonisent la rhizosphère et stimulent les interactions entre la microflore symbiotique et la plante-hôte (Masciarelli et al., 2014). Les PGPR protègent les plantes contre les phytopathogènes grâce à la production d'antibiotiques, phénazines et métabolites antifongiques (Figure 18). Certaines souches renforcent la nodulation des légumineuses et la fixation d'azote et/ou influencent positivement la symbiose mycorhizienne en augmentant la solubilisation et la minéralisation du phosphore du sol, la production de sidérophores (Ahemad, 2015), la sécrétion de phytohormones et la diminution du niveau d'éthylène (Jiang et al., 2008). *Azospirillum* s'associent aux racines de plantes sauvages et cultivées, telles que le riz, le blé et le soja, le millet et le maïs (Masciarelli et al., 2014).

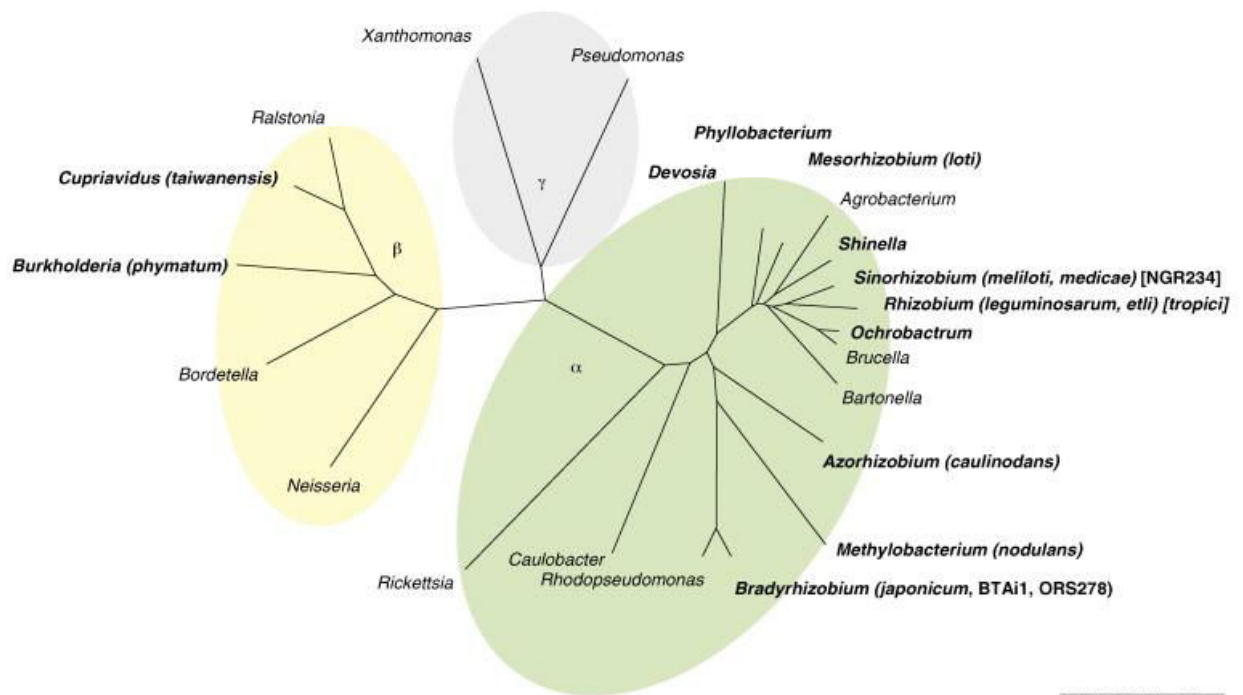


**Figure 18.** Mécanismes d'action des bactéries PGPR

Les bactéries PGPR favorisent la croissance des plantes. *ROS* reactive oxygen species, *ACC* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, *NH<sub>3</sub>* ammonia, *HCN* hydrogen cyanate, *IAA* indole-3-acetic acid, *P* phosphate (Ahemad, 2015).

## I.6.2. Les rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol et de la rhizosphère capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des légumineuses et de favoriser leur croissance dans les sols pauvres en azote (Sprent, 2009). Ainsi, les rhizobia sont utilisés comme engrais biologiques et en tant qu'inoculants dans l'agriculture depuis plus d'un siècle (Van Kessel et Hartley, 2000). *Rhizobium* désigne communément les bactéries fixatrices d'azote, symbiotes des légumineuses, alors que "*Rhizobium*" est un genre bactérien. L'introduction de la taxonomie numérique et l'analyse moléculaire de séquences multiloci (MLSA) de gènes de ménage tels que : ADNr 16S, *atpD* (ATP synthase F1, sous-unité  $\beta$ ), *recA* (recombinase A), *rpoB* (RNA polymérase, sous-unité  $\beta$ ), *glnI/glnA* (glutamine synthétase I), *glnII* (glutamine synthétase II), *thrC* (thréonine synthase), ont permis de distinguer des nouveaux genres et de décrire de nouvelles espèces parmi les *Rhizobium*, et de réviser la phylogénie des *Rhizobiaceae* (Mousavi et al., 2015). Sur la base du séquençage de l'ADNr 16S (Lindström et al., 2015), plus de 20 genres et 200 espèces sont actuellement définis, répartis dans les classes  $\alpha$  et  $\beta$  des Protéobactéries (Figure 19).



TRENDS in Microbiology

**Figure 19.** Arbre phylogénétique simplifié de l'ADNr 16S d' $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -protéobactéries

Arbre basé sur la comparaison de séquences de l'ADNr16S (Masson-Boivin et al., 2009). Les bactéries nodulant les légumineuses (en gras) sont classées parmi les  $\alpha$  et  $\beta$ -protéobactéries. Un nombre limité de  $\gamma$ -protéobactéries a été isolé de nodules de certaines légumineuses.



### I.6.2.1. Particularités du génome des rhizobia

Le génome des symbiotes de la famille des *Rhizobiaceae* se distingue de celui d'autres procaryotes, par la taille (6 à 9 Mb), la présence de plasmides dont la taille varie de 200 Kb à 1,5 Mb (méga-plasmides). Le séquençage complet des génomes ou plasmides de rhizobia montrent une localisation condensée des gènes de nodulation sur des régions symbiotiques (plasmidiques ou chromosomiques). Dans le cas de *Sinorhizobium meliloti*, le plasmide pSymA porte la majorité des gènes *nod* et *nif* impliqués dans le processus de nodulation et de fixation. Le plasmide pSymB possède une diversité importante de gènes dont les gènes de synthèse d'exopolysaccharides (*exo*) qui interviennent dans la mise en place de la symbiose. Le plasmide symbiotique de *Sinorhizobium sp.* NGR324 possède la majorité des gènes *nod* et une dizaine de gènes impliqués dans la synthèse de polysaccharides ; des homologues des gènes *exo* étant localisés sur le chromosome (Broughton et al., 2000). Chez *Mesorhizobium loti*, les îlots symbiotiques chromosomiques contiennent, outre les gènes *nod* et *nif*, des gènes impliqués dans des voies métaboliques du carbone ou la synthèse d'acides aminés.

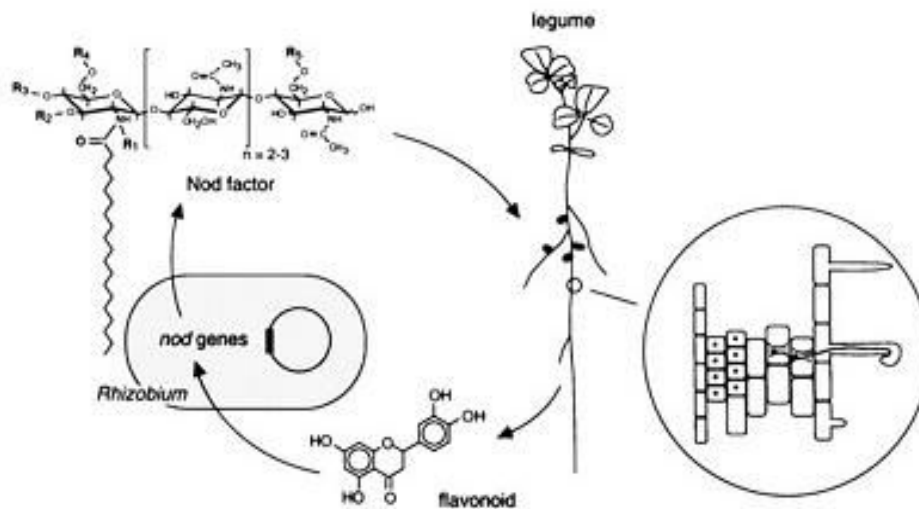
Il existe trois classes de séquences répétées : la première regroupe les duplications de gènes structuraux ou de loci symbiotiques, tel l'opéron *nifHDK* chez *Sinorhizobium sp.* NGR324, la seconde correspond à des séquences d'insertion impliquées dans l'acquisition de fonctions accessoires (gènes de résistance aux antibiotiques) et intervenant dans les réarrangements chromosomiques et l'intégration plasmidique. La troisième classe regroupe des éléments plus courts (inférieur à 300 Kb) correspondant à des séquences intergéniques, telles les "Rhizobium-specific Intergenic Mosaic Element" (RIME1 et RIME2) (Osterås et al., 1995). Très présents dans le génome des rhizobia, ces éléments seraient des sites de recombinaisons homologues issus de réarrangements génomiques, permettant ainsi une fluidité et une évolution génomique. Le séquençage du génome d'*Agrobacterium tumefaciens*, bactérie taxonomiquement proche de certains rhizobia, présente des similarités entre les déterminants de la pathogénicité et de la symbiose.

### I.6.2.2. Evolution et diversité des rhizobia

Les phénomènes qui influent sur la diversité des gènes symbiotiques reposent sur l'acquisition de gènes par transfert horizontal et la duplication de gènes et leur réquisition pour la fonction symbiotique, sous pression de sélection de la plante-hôte. Ces deux phénomènes expliqueraient la diversité d'organisation des gènes *nod* parmi les opérons symbiotiques et leur large distribution dans la diversité bactérienne. L'analyse des séquences des *pSymA* et *pSymB* de *S. meliloti* reflète ces deux mécanismes de variations alléliques. Le pourcentage GC du plasmide *pSymA* de *S. meliloti* (2,3 % inférieur à celui du génome) ainsi que son usage du codon (très différent du chromosomique) suggèrent une origine étrangère de ce plasmide, acquise lors de transferts horizontaux (Galibert et al., 2001). La localisation condensée des gènes *nod* et *nif* sur des plasmides ou des îlots symbiotiques suggère, là encore, un transfert horizontal de ces gènes parmi les populations rhizobiennes. De fait, le transfert du *pSym* a probablement eu lieu après conjugaison de souches et transferts latéraux entre différentes lignées chromosomiques de rhizobia (Broothaerts et al., 2005). *Agrobacterium tumefaciens*, désarmé de ses fonctions pathogènes, peut acquérir un phénotype de nodulation après insertion du *pSym* de *R. trifolii*, *R. tropici* et *S. meliloti*. Le transfert d'un îlot symbiotique de *Mesorhizobium loti*, symbiote de *Lotus corniculatus*, à des souches taxonomiquement différentes a été rapporté dans la nature. L'origine de cette découverte remonte à 1986, lorsque des graines de *Lotus* recouvertes de son symbiote *Mesorhizobium loti* ont été semées dans un sol de Nouvelle-Zélande ne possédant pas de symbiotes naturels de *Lotus*. Sept ans plus tard, au même endroit, les souches isolées des nodosités de *Lotus* présentaient une grande diversité taxonomique mais toutes avaient acquis le même îlot symbiotique chromosomique, provenant de la souche inoculée (Sullivan et al., 1995). Ce transfert était en fait lié à l'insertion de 502 kb de l'îlot symbiotique dans un gène codant un ARN de transfert (phénylalanine), grâce à une intégrase d'origine phagique (type P4), suivant un processus similaire à certains îlots de pathogénicité (Sullivan and Ronson, 1998).

## I.7. La Symbiose rhizobium-Légumineuses

Présents à l'état saprophytique dans la rhizosphère, les rhizobia répondent à un chimiotactisme positif induit par les exsudats racinaires de la légumineuse (Figure 20). Ils sont ainsi attirés par des acides organiques, des enzymes, des ions inorganiques mais également des acides aminés, des sucres, des acides dicarboxyliques de la rhizosphère, mais également par des composés plus spécifiques tels certains flavonoïdes présents en faible concentration dans les exsudats racinaires des légumineuses. Ces exsudats ont un effet direct ou indirect sur l'acquisition des éléments minéraux nutritifs nécessaires à la croissance des plantes et des microorganismes (Dakora and Phillips, 2002). Le catabolisme de ces substrats conduit à une prolifération des rhizobia au niveau racinaire de la plante et à un dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante-hôte (Lindström et al., 2010). Les flavonoïdes excrétés par la plante sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes (essentiellement NodD). L'interaction NodD-flavonoïde entraîne un changement de conformation de NodD qui peut ainsi se fixer aux *nodbox* promotrices des gènes *nod* (Spini et al., 2016). L'activation des protéines régulatrices conduit, par l'intermédiaire des boîtes régulatrices (*nodbox*) situées en amont des gènes *nod*, à l'expression de gènes bactériens (gènes *nod*, *noe* et *nol*). Ces gènes codent pour des enzymes (chitine synthase, déacétylase, N-acétyltransférase,...) qui interviennent dans la construction du squelette de base des facteurs de nodulation (facteurs Nod) et le greffage de groupements chimiques responsables de la spécificité d'hôte. Molécules " signal " reconnues de manière spécifique par la plante, les facteurs Nod (FNs) sont responsables des premières étapes de l'infection et de la morphogénèse nodulaire (Oldroyd, 2008).



**Figure 20.** Dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuses

Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire (Lindström et al., 2010).

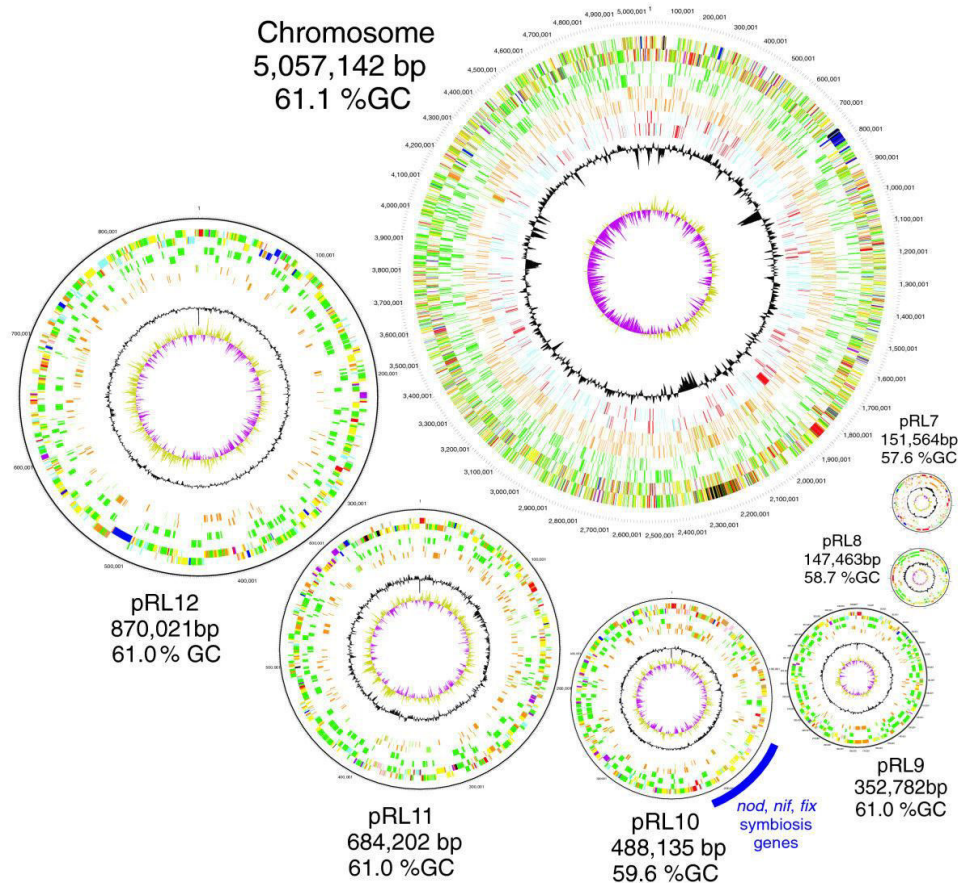
### I.7.1. Spécificité de la symbiose

La spécificité d'hôte est l'une des caractéristiques majeures de la symbiose rhizobium-légumineuse. Chaque espèce bactérienne possède un spectre d'hôte bien défini dont l'amplitude est très variable (Broughton et al., 2003a). Certaines souches bactériennes ont un spectre d'hôte très large, comme la souche d'*Ensifer sp.* NGR 234 isolée de *Lablab purpureus*, capable de s'associer à près de 120 genres de légumineuses et au genre *Parasponia*, ou celles du haricot qui s'associent à diverses légumineuses tropicales. Inversement, le spectre d'hôte est étroit chez *Sinorhizobium meliloti* qui ne s'associe qu'aux espèces végétales des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* ainsi que chez *Mesorhizobium huakuii*. La spécificité est très forte pour le partenaire bactérien *Azorhizobium caulinodans* qui s'associe à *Sesbania rostrata* et à d'autres *Sesbania sp.*. Alors que certaines espèces de  $\beta$ -rhizobia ont un spectre d'hôte étroit, par rapport à des rhizobia à large spectre d'hôtes (Wang et al., 2012). Certaines légumineuses dites à large spectre d'hôte acceptent plusieurs espèces de rhizobia, comme *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, Glycine, *Macroptilium atropurpureum* (Siratro), Acacia et *Sesbania*. D'autres espèces comme *Galega orientalis* et *Galega officinalis*, ne forment des nodosités qu'avec l'espèce *Rhizobium galegae* (Doyle and Luckow, 2003).

## I.7.2. Diversité des rhizobia associés à la féverole

Les légumineuses de la tribu des *Viciae* des genres *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* et *Lens* partagent, dans différentes régions du monde, un symbiote identique : *Rhizobium leguminosarum* (Laguerre et al., 2003; Riah, 2014). Ces légumineuses ont longtemps été considérées comme ne pouvant établir une relation symbiotique qu'avec une seule espèce rhizobienne : *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae*, symbiote originel de la lentille. Désormais, d'autres espèces rhizobiennes sont aptes à noduler les légumineuses de la tribu des *Viciae* telle que : *Rhizobium fabae*, isolé en Chine à partir de nodules racinaires de *Vicia faba* et capable de noduler le pois (Tian et al., 2008). *Rhizobium fabae* possède des gènes *nodC* semblables à ceux de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rogel et al., 2011). Une nouvelle espèce nodulant *Vicia faba* dans différents pays (Espagne, Pérou et Tunisie) est proposée dans le genre *Rhizobium* : *Rhizobium laguerreae*, ainsi nommée en hommage et à la mémoire de Gisèle Laguerre (Saidi et al., 2014). Une nouvelle espèce a été isolée, à partir de nodules effectifs de *V. faba* (fève) et *P. sativum* (pois) : *Rhizobium anhuiense* sp. nov. (Zhang et al., 2015).

L'origine des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, nodulant les légumineuses de la tribu des *Viciae*, se situe en Europe. Elles auraient ensuite migré à d'autres continents, où elles se sont diversifiées (Laguerre et al., 2003; Tian et al., 2010). De la classe des  $\alpha$ -protéobactéries, *Rhizobium leguminosarum* a fait l'objet de plus d'un millier de publications. Les gènes codant pour des interactions symbiotiques avec les plantes sont bien étudiés, mais ceux codant pour des adaptations favorables à la croissance et à la survie dans le sol sont mal définis. Le séquençage du génome de 7,75 Mb de la souche modèle *R. leguminosarum* biovar *viciae* 3841, se compose d'un chromosome et de six plasmides (Figure 21). Les gènes codant des protéines essentielles sont majoritairement chromosomiques alors que les gènes fonctionnels sont localisés au niveau plasmidique. Le plasmide pRL8 comporte notamment un grand nombre de gènes spécifiquement induits au niveau de la rhizosphère de la plante hôte. Des gènes orthologues de *R. leguminosarum* biovar *viciae* existent dans chacun des trois génomes apparentés : *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* et *Mesorhizobium loti* (Young et al., 2006).



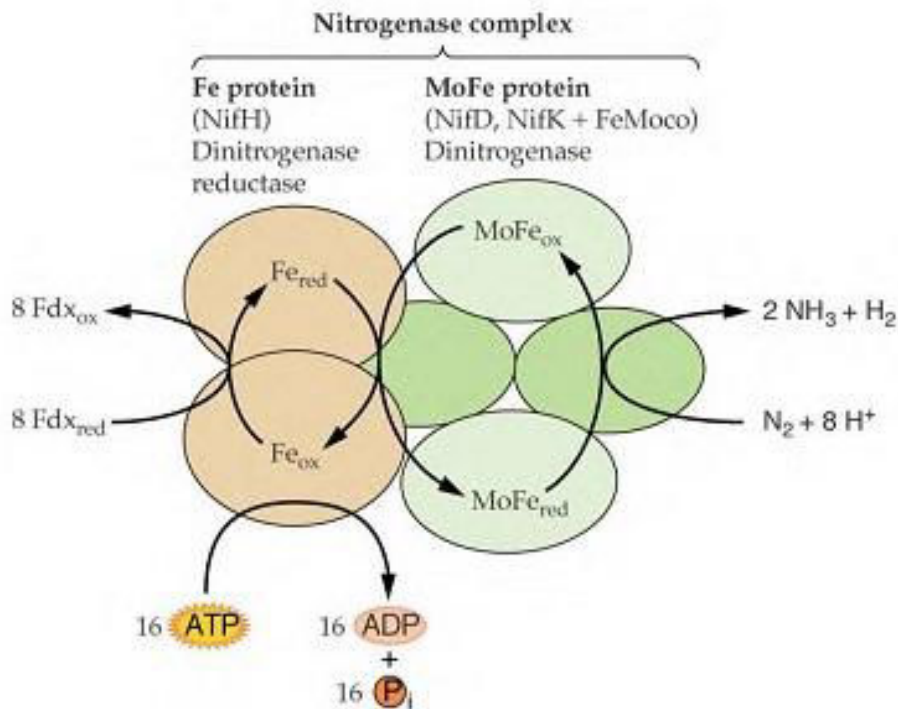
**Figure 21.** Chromosome et six plasmids de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841

L'échelle des plasmides est réelle et celle du chromosome est au  $\frac{1}{4}$ . Les cercles de la couche externe à la couche interne indiquent les orientations génétiques en sens et antisens : tous les gènes, protéines membranaires (vert fluo), conservés (brun) et non-conservés (vert pâle) hypothétiques, phage et transposons (rose, pour pRL7), et (pour le chromosome) hélicases/restriction/transcription du DNA (rouge) et régulateurs transcriptionnels (bleu). Le cercle interne indique les niveaux en G+C (blanc) et les faux G-C (olive/marron). La liste des couleurs standards de l'institut Sanger des unités fonctionnelles correspond à : blanc = pathogénicité/adaptation/chaperones (noir) ; vert foncé = métabolisme énergétique (glycolyse, transport d'électrons, etc) ; rouge = transfert d'informations (transcription/translocation + modification ADN/ARN) ; vert fluo = surface (membrane interne, externe, sécrété, structures des surfaces [lipopolysaccharide, etc]) ; bleu foncé = ARN stable ; turquoise = importante dégradation moléculaire ; rose/pourpre = dégradation de petites molécules ; jaune = métabolisme central/intermédiaire/miscellaire ; vert pâle = inconnu, bleu pâle = régulateurs ; orange/brun = hypo conservé ; brun foncé = pseudogènes et gènes partiels ; rose pâle = phage/séquences d'insertion ; gris clair = quelques informations miscellaires (par exemple, Prosite), sans fonction. Bp, base paires ; Rlv3841, *R. leguminosarum* biovar *viciae* souche 3841 (Young et al., 2006).

## 1.8. Fixation biologique d'azote

### 1.8.1. Généralités

La fixation biologique d'azote présente des avantages économiques et environnementaux, ainsi qu'une alternative aux engrais chimiques coûteux et polluants (Ferguson et al., 2010; Stoddard et al., 2009). Celle-ci a généralement lieu à température modérée par des organismes procaryotes diazotrophes, largement répandus dans la nature. La fixation d'azote par des bactéries diazotrophes et l'assimilation du gaz carbonique par des organismes photosynthétiques, sont les deux principaux phénomènes biologiques à la base du développement du monde vivant. Les bactéries diazotrophes possèdent le complexe enzymatique de la nitrogénase, responsable de la réduction d'azote moléculaire en ammoniac (Udvardi and Poole, 2013). Le complexe de la nitrogénase est constitué de deux métalloprotéines (Figure 22). La Protéine I est un hétérotétramère de 220 kDa, comprenant quatre sous-unités ( $Fe_4S_4$ ) et un cofacteur composé de fer et de molybdène (FeMo-Co) qui est le site catalytique de la réaction de réduction de  $N_2$ . La protéine II est un homodimère de 68 kDa comportant un simple groupe  $Fe_4S_4$  qui est réduit grâce à un donneur d'électron, le plus souvent la ferrédoxine. La fixation d'ATP provoque un changement de conformation de la protéine II, qui s'associe à la protéine I pour former la nitrogénase active. Les électrons sont transférés vers le composant I, grâce à l'hydrolyse du MgATP ; quatre cycles sont nécessaires pour la réduction d'un  $N_2$  en deux  $NH_3$ . La nitrogénase catalyse la réduction d'analogues stériques de l'azote, comme l'acétylène. L'éthylène produit est facilement dosable par chromatographie en phase gazeuse (test ARA). Structurellement, le système de fixation d'azote varie selon les différents genres bactériens. Deux nitrogénases alternatives à cofacteur vanadium (V-nitrogénase) ou fer (Fe-nitrogénase), sont fonctionnelles dans des environnements pauvres en molybdène. La fixation d'azote est activée par un déficit en azote, mais est limitée par la biodisponibilité de nutriments essentiels au fonctionnement de la nitrogénase tels que le fer (Fe), le molybdène (Mo) et le phosphore (P). Fe et Mo, cofacteurs du métabolisme de la nitrogénase, jouent un rôle déterminant dans son activité. P est un constituant de l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire au transfert d'énergie. P et Mo représentent les principaux facteurs limitants la fixation d'azote, en milieux continentaux (Newton and Dilworth, 2011).

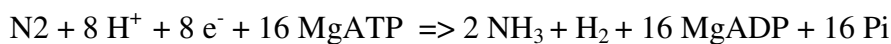


**Figure 22.** Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique

La réduction d'azote atmosphérique en ammoniac est réalisée par la Nitrogénase (lookfordiagnosis.com).

### I.8.2. Nitrogénase et gènes de fixation d'azote

Le complexe enzymatique de la nitrogénase permet la fixation d'azote, selon la réaction :



La structure du complexe nitrogénase et des séquences codant les différentes unités polypeptidiques sont très conservées chez les diazotrophes libres et symbiotiques (Franche et al., 2009). Ce sont les gènes *nif* et *fix* bactériens qui sont impliqués dans l'activité nitrogénase et la fixation d'azote. La caractérisation et l'organisation des gènes *nif* ont principalement été étudiées chez un fixateur libre : *Klebsiella pneumoniae*. Plus de vingt gènes *nif* organisés en opérons interviennent dans la synthèse et le fonctionnement du complexe nitrogénase (Glick, 2012) dont les gènes *nifHDK* qui représentent les gènes de structure. Les gènes *nifDK* codent les chaînes  $\alpha\beta$  de la protéine I, à cofacteur FeMo de la nitrogénase, responsable de la réduction de N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub>. Le gène *nifH* code pour la protéine II, ou réductase, qui assure le transfert d'électrons nécessaires à la réduction de N<sub>2</sub>. Parmi ces gènes, *nifH* est le plus largement séquencé et est devenu le marqueur de choix pour l'étude de l'écologie et de la



diversité des organismes fixateurs d'azote. L'assemblage complet de la nitrogénase nécessite les produits de gènes *nif* impliqués dans la synthèse de FeMo-Co, tels que : *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifY* et *nifH* ainsi que d'autres gènes *nif* : *nifS*, *nifU*, *nifW* et *nifZ*. *Klebsiella* porte également des gènes de transport d'électrons (*nifF* et *nifJ*), ainsi que des régulateurs transcriptionnels *nifLA* des opérons *nif* (Dixon and Kahn, 2004). Les gènes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, nécessaires à la synthèse et au fonctionnement de la nitrogénase, sont conservés chez tous les diazotrophes.

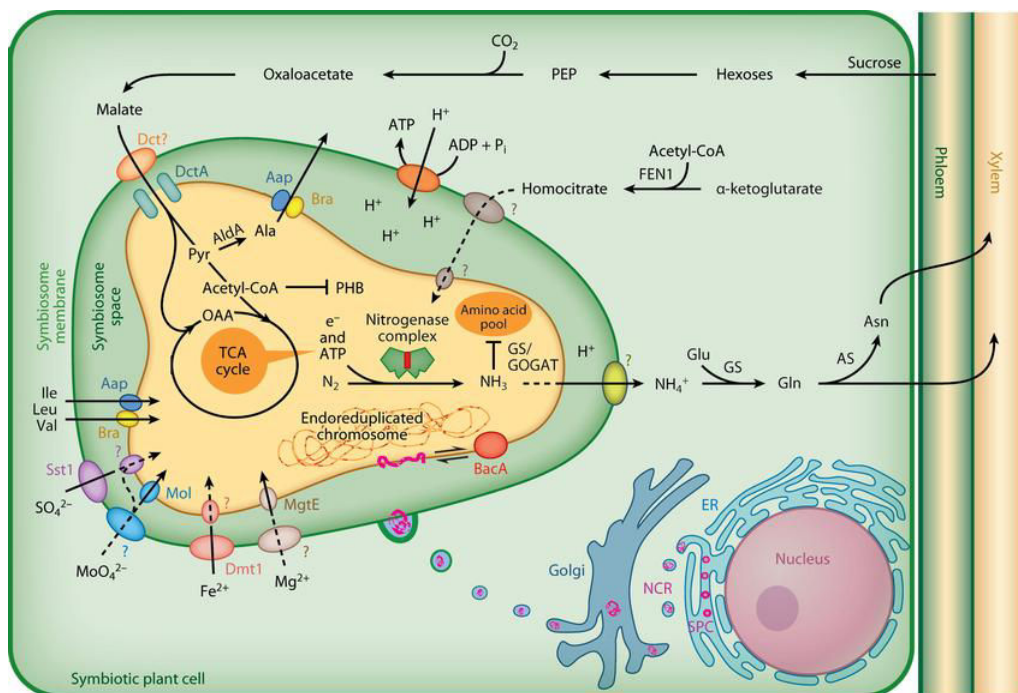
Bien que très conservés chez les micro-organismes fixateurs d'azote, les gènes *nif* diffèrent au niveau de leur localisation : soit plasmidique ou chromosomique ; de leur organisation et de la régulation de leur expression. L'activation symbiotique des gènes *nif* chez les rhizobia dépend de la concentration en oxygène ; elle-même régulée par une série de gènes *fix*. D'autres gènes (*rnfABCDGEF*) peuvent également être impliqués dans l'activité de la nitrogénase. Sous condition favorable limitée en oxygène, des souches rhizobiennes symbiotiques telles que : *B. japonicum*, *R. leguminosarum* et *A. caulinodans* sont aptes à exprimer une activité nitrogénase *in vitro*. Certaines bactéries telles qu'*Azotobacter* et plusieurs fixateurs d'azote photosynthétiques, incluant des cyanobactéries, possèdent des formes alternatives de nitrogénases à cofacteurs vanadium et fer (*Vnf*) ou fer (*Anf*) (Newton and Dilworth, 2011).

### **I.8.3. Métabolisme du carbone et de l'azote, lors de la fixation d'azote**

La symbiose fixatrice d'azote, coûteuse en énergie, nécessite 16 à 24 moles d'ATP pour la réduction d'une mole d' $N_2$  (Franche et al., 2009). Les photosynthétats de la plante et notamment le saccharose serait source d'énergie, transporté des parties aériennes aux nodules par le phloème (Udvardi et Poole, 2013). Ce saccharose est ensuite métabolisé, dans les cellules nodulaires, en acides dicarboxyliques C-4 (malate, fumarate, succinate). Ces acides dicarboxyliques sont, à leur tour, métabolisés au travers du cycle TCA (Acides TriCarboxyliques), fournissant de l'ATP et une capacité réductrice, nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase (Arsene et al., 1996). Deux transporteurs sont respectivement situés sur la membrane du symbiosome et la membrane du bactéroïde (*DctA*). L'activation de *dctA* serait sous dépendance d'un système à deux composants activé par les acides dicarboxyliques C-4. Le système enzymatique du TCA intervient, au niveau bactéroïdien, dans le métabolisme du carbone. L'inactivation de ce système enzymatique

conduit à une inefficience nodulaire. Les acides dicarboxyliques C-4 semblent, au niveau bactéroïdien, bloquer l'expression des gènes *nod*.

Le  $\text{NH}_3$ , produit par l'activité nitrogénase, diffuse dans l'espace pér bactéroïdien où il est converti en  $\text{NH}_4^+$  qui migre ensuite vers le cytoplasme de la plante, au travers de canaux de la membrane pér bactéroïdienne. La plante fournit la source de carbone nécessaire à la production d'ATP et au fonctionnement de la nitrogénase. Contrairement aux fixateurs libres qui utilisent l'azote, les rhizobia transmettent l'azote fixé à la plante. L'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  par les rhizobia est réprimée lors de la différenciation en bactéroïdes, au niveau de la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthétase (GOGAT). Chez la plante, l'activité GS est fortement stimulée au niveau des nodules par rapport aux racines (Udvardi and Poole, 2013). Au sein du bactéroïde, un cycle métabolique des acides aminés se couplerait au cycle du TCA, produisant de l'alanine et de l'aspartate (Prell and Poole, 2006). Le métabolisme de C et N des deux partenaires semble mutuellement dépendant (Figure 23).



Oldroyd GED, et al. 2011.  
Annu. Rev. Genet. 45:119–44

**Figure 23.** Mécanismes d'échange de carbone et d'azote dans une cellule nodulaire infectée



## I.9. Effet des facteurs biotiques et abiotiques sur la symbiose

### I.9.1. Facteurs biotiques

Lors de la symbiose rhizobium-légumineuse, les flavonoïdes émis par la plante induisent l'expression de gènes *nod* et la synthèse de facteurs Nod bactériens, ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca et al., 2004). Les rhizobia, qui se différencient par la structure de leurs facteurs Nod, constituent l'une des premières étapes de contrôle de la spécificité d'hôte. L'optimisation de la symbiose rhizobium-légumineuse exige donc la présence de souches bactériennes rhizosphériques compatibles, compétitives et infectives. Ces souches doivent être en nombre suffisant pour maximiser la nodulation et présenter une forte effectivité pour la fixation d'azote. A chaque espèce de légumineuses est attribuée une espèce de *Rhizobium* qui lui est inféodée mais (i) divers génotypes rhizobiens peuvent noduler une même plante hôte et (ii) certaines espèces rhizobiennes comme *R leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) sont aptes à noduler plusieurs espèces végétales telles que : le pois, la fève et la vesce. Le génotype bactérien et végétal influe donc sur le niveau d'efficacité de la fixation symbiotique (Laguerre et al., 2003; Saidi et al., 2014; Tian et al., 2010).

Dans les sols français, la plupart des légumineuses cultivées trouvent des souches rhizobiennes natives adaptées : le pois et la féverole, préférentiellement associés à des souches de *Rlv*, en sont des exemples. Cependant, dans le cas du soja associé à *B. japonicum*, ou dans quelques cas de pH basiques chez le lupin blanc, associé à *B. lupini*, ou de pH acides chez la luzerne, associée à *S. meliloti*, une inoculation par des espèces rhizobiennes adaptées est nécessaire. Des conditions environnementales défavorables (température élevée, pH faible), peuvent limiter la durée de survie des bactéries introduites dans le sol. L'un des défis pour l'agriculture est de sélectionner (i) des génotypes végétaux adaptés aux populations rhizobiennes natives locales et/ou (ii) des souches efficaces, adaptées aux conditions du milieu, possédant une capacité concurrentielle vis-à-vis de souches locales, moins efficaces. Certaines bactéries, vivant à l'état libre dans le sol, peuvent promouvoir la fixation symbiotique, en améliorant la nutrition de la plante, en éléments minéraux (Glick, 2012). Ainsi, les PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) augmentent la disponibilité du phosphore du sol et ont un effet positif sur la fixation d' $N_2$  (Rodríguez et Fraga, 1999). Les bactéries *Azospirillum* stimulent la croissance des racines et permettent donc une meilleure prospection du sol. Une relation positive avec ces micro-organismes de la rhizosphère a un coût

métabolique pour la plante, *via* la rhizodéposition de composés organiques, servant non seulement de nutriments pour les micro-organismes du sol, mais également de molécules signals (Li et al., 2016). La symbiose fixatrice d'azote peut également être limitée par des agents pathogènes ou des ravageurs comme les larves de sitones qui s'attaquent aux nodosités ou le pathogène *Aphanomyces eutreiches* qui provoque une pourriture racinaire chez des espèces comme le pois, la lentille et des vesces. C'est ainsi que dans certains systèmes culturaux, le pois est remplacé par la féverole moins sensible à ce pathogène. Les légumineuses à graines sont également peu compétitives vis à vis d'adventices, qui limitent la croissance et influent donc indirectement sur la fixation symbiotique de N (Renoud, 2016). La diversification des systèmes de culture avec l'introduction d'associations céréales-légumineuses est l'une des alternatives favorables à la lutte biologique et à l'amélioration nutritionnelle de la plante (Hinsinger et al., 2011; Malézieux et al., 2009).

### **I.9.2. Facteurs abiotiques**

Le pH du sol, la salinité, le stress osmotique et la température ont des effets majeurs sur la croissance, la survie des rhizobia et la symbiose rhizobium-légumineuse (Graham et Vance, 2000). Le réchauffement climatique et les pratiques agricoles entraînent une augmentation des sols acides et ont un impact négatif sur la productivité des légumineuses. L'acidité du sol (pH < 5) affecte tous les aspects de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote. L'acidité perturbe l'adhésion bactérienne à la surface des poils racinaires, lors de la phase d'infection. Une croissance et survie sont rapportées à des pH extrêmes, compris entre 1 et 2 (Richardson et al., 2009a). Les rhizobia produisant d'importantes quantités d'exopolysaccharides ont une survie accrue en milieu acide. La plupart des terres agricoles sont alcalines, avec des pH compris entre 7 et 8.5, engendrant une faible disponibilité des nutriments complexés au Ca. Le stress alcalin peut entraîner un retard de croissance chez certains rhizobia, ainsi que la viabilité symbiotique avec la légumineuse associée. Il est donc important d'isoler des rhizobia tolérants à des pH alcalins et aptes à noduler des légumineuses (Kaur et al., 2013). L'alcalinité des sols inhibe significativement la nodulation et la fixation d'azote chez *Vicia faba* inoculée avec *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Cependant, l'inoculation de cette souche associée à des champignons arbusculaires augmente la nodulation et la fixation d'azote, chez *V. faba*, sous stress alcalin (Abd-Alla et al., 2014). La mycorrhization favorise la nodulation rhizobienne (Sakamoto et al., 2013). La température a un impact sur la survie des rhizobia dans le sol ainsi

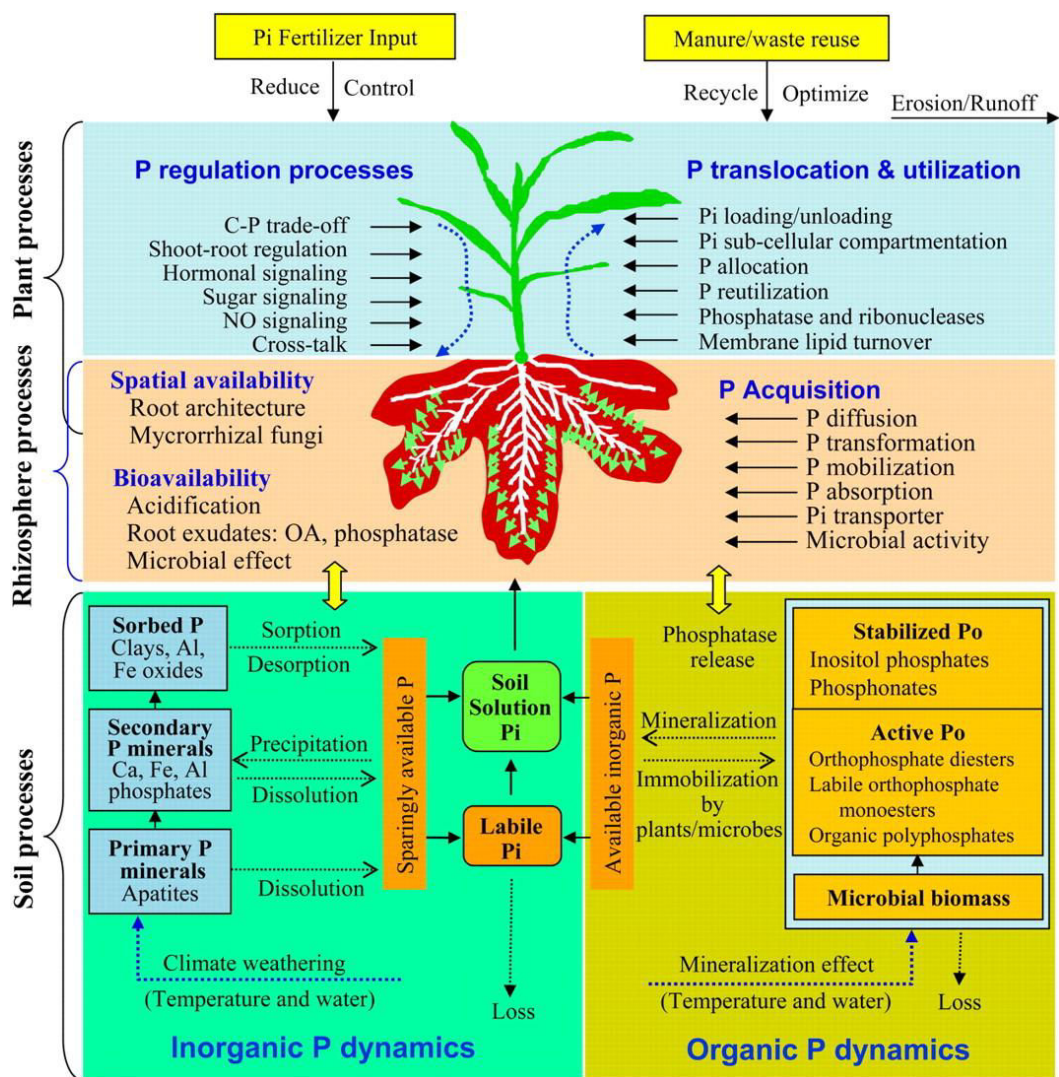
que sur la nodulation et l'ensemble des processus physiologiques, dont le fonctionnement de la nitrogénase (Graham et Vance, 2003). L'optimum de fonctionnement de la fixation symbiotique se situe entre 15 et 25°C pour les légumineuses tempérées. Chez les légumineuses tropicales, ce seuil de température maximal varie de 25 à 40°C, selon les espèces (Sprent, 2009). Après l'eau qui a un effet sur la survie des bactéries dans le sol et la fixation biologique de N, la disponibilité des éléments nutritifs du sol et plus particulièrement celle de N et P, impacte fortement la symbiose rhizobium-légumineuse. Alors qu'un lien négatif existe entre la fertilisation en N et la fixation biologique d'azote, une tendance inverse est rapportée dans le cas d'une fertilisation en P. Une fertilisation en N et plus particulièrement l'apport de nitrates entraîne une diminution du taux de fixation biologique d'azote chez les légumineuses (Voisin et al., 2013). Essentiel dans les mécanismes complexes de la symbiose fixatrice d'azote, hautement consommatrice d'énergie, le phosphore représente un élément majeur, notamment chez les légumineuses symbiotiques aux besoins en P supérieurs aux légumineuses dépendantes d'une fertilisation azotée (Graham et Vance, 2003).

### **I.9.3. Phosphore et légumineuses**

Pour satisfaire les demandes énergétiques de la fixation symbiotique d'azote, les légumineuses ont des besoins élevés en phosphore. Une faible mobilité du P de la fraction soluble du sol vers la rhizosphère ainsi qu'un système racinaire moins développé chez les légumineuses par rapport aux céréales, complexifient l'accessibilité des légumineuses au P du sol (Daoui, 2007). Une déficience en P chez les légumineuses affecte la croissance, mais également la nodulation et la fixation biologique d'azote (Tang et al., 2001). Les nodules renferment généralement deux à trois fois plus de P par unité de matière sèche que les racines. Une fertilisation en P améliore significativement les rendements et la qualité des grains chez *V. faba* (Bolland et al., 1999; Lewis and Hawthorne, 1996). Une déficience phosphatée chez la luzerne, perturbe le fonctionnement nodulaire (Tang et al., 2001). Sous déficience très élevée en P, la nodulation et la fixation biologique d'azote, chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.), sont régulées par feed back, suite à une demande moindre en N (Almeida et al., 2000). Le P et le Zn sont des éléments nécessaires à la croissance de la plante ainsi qu'à la fixation biologique de l'azote, la synthèse de leghémoglobine et à l'absorption des éléments nutritifs tels que Fe et K, par les nodules fixateurs (Thiyagarajan et al., 2003). Un déficit en P se traduit par une couleur vert foncé des feuilles, une diminution du nombre et de leur surface.

## I.10. Disponibilité du phosphore du sol

La faible disponibilité du P du sol limite les rendements sur environ 40% des surfaces cultivables mondiales (Amtmann et al., 2005), principalement dans les sols acides et calcaires. Bien que la concentration en P du sol soit importante et varie de 100 à 3 000 mg Kg<sup>-1</sup>, 30 à 60% de P se trouve sous forme complexée d'esters organiques, peu disponibles. Le P est l'élément nutritif le moins soluble et le moins mobile du sol et se compose de faibles concentrations en Pi (< 10 µmol.L<sup>-1</sup>), assimilable par les plantes (Hinsinger et al., 2011). Le Pi ou P minéral est présent au sein de structures biologiques vivantes ou mortes. Les formes de Po sont directement liées à un squelette carboné et proviennent essentiellement de processus biologiques d'assimilation d'orthophosphates ainsi que d'accumulation de composés libérés par les plantes, les microorganismes et les animaux. Environ 80% des apports de P sont immobilisés par adsorption, précipitation ou conversion en Po, le rendant indisponible pour la plante. Les plantes absorbent l'ion PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de la solution du sol, dont les très faibles teneurs sont rapidement renouvelées, après solubilisation des diverses formes de P et minéralisation de la matière organique. Au niveau de la rhizosphère, les racines augmentent la solubilisation du Po (Figure 24), en modifiant le pH ou en excréant des acides organiques tels que le citrate, le malate et l'oxalate (Hinsinger et al., 2015). Chez certaines plantes, le taux de sécrétion d'acides organiques augmente en conditions déficientes en P et certaines espèces végétales non-mycorhizées telles que le lupin de la famille des Fabaceae, colonisant la plupart des sols infertiles, excrètent d'importantes quantités d'acides organiques intervenant dans la minéralisation du Po du sol. Le Po solubilisé, est ensuite hydrolysé par des phosphatases permettant une libération de Pi, disponible pour la plante (Richardson et Simpson, 2011). La minéralisation du Po non disponible en Pi disponible pour la plante, peut être réalisée par minéralisation racinaire mais également par production de phosphatases microbiennes (Hansen et al., 2017). Plusieurs groupes enzymatiques interviennent dans cette minéralisation, notamment (i) les phosphatases non spécifiques, qui déphosphorylent les phospho-esters ou phospho-anhydrides obligatoires en matières organiques, (ii) les Phytases, qui interviennent sur le phytate et les phosphonates et (iii) les C-P lyases, enzymes qui clivent les liaisons C-P dans les organophosphonates (Rodríguez et al., 2007). La principale activité serait liée aux phosphatases acides et aux phytases, en raison de la présence prédominante de leurs substrats dans le sol. Par rapport aux processus conventionnels, la production d'acides organiques associée à l'hydrolyse permettraient une meilleure biodisponibilité du P.



**Figure 24.** Dynamique du P, dans le sol/rhizosphère de la plante

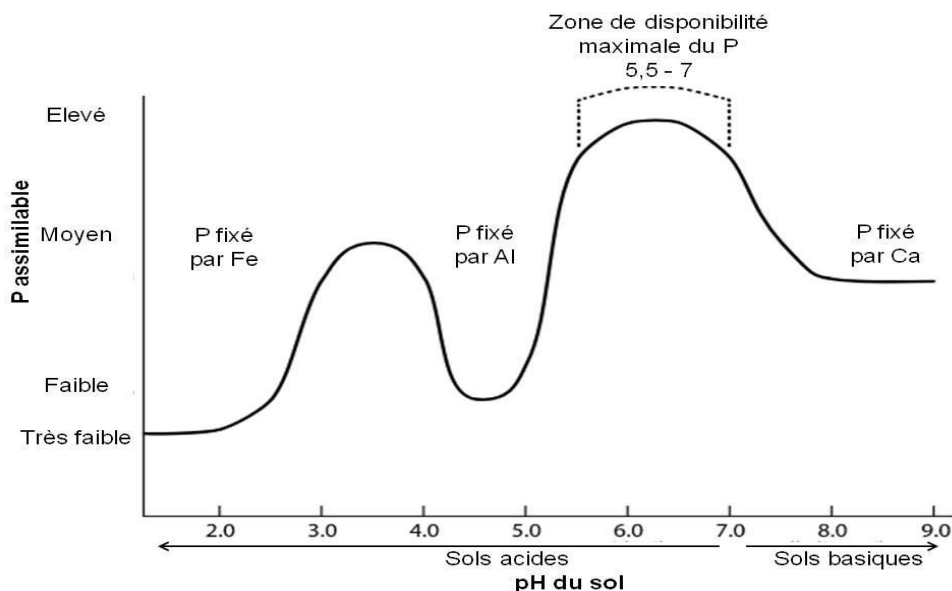
C-P, Carbon-Phosphore; NO, monoxyde d'azote; OA, acides organiques (Shen et al., 2011).



## I.10.1. Facteurs influençant la disponibilité du phosphore du sol

### I.10.1.1. Effet du pH et de la texture du sol

Le pH est le principal facteur déterminant la disponibilité de P du sol (Figure 25). La disponibilité de P est liée aux processus d'adsorption/désorption des ions phosphates sur les différents minéraux (argiles et oxydes) du sol. Les ions  $H^+/OH^-$  exsudés par le système racinaire des plantes ainsi que l'activité microbienne modifient les propriétés chimiques de la rhizosphère et influent sur le pH du sol (Devau, 2010). Différents processus, responsables de modifications des propriétés physiques, chimiques et biologiques déterminent la disponibilité de P du sol au niveau rhizosphérique tels que : l'exsudation de carboxylates (Li et al., 2016), de phosphatases et l'implication de microorganismes. Les plantes qui absorbent des ions  $NO_3^-$  entraînent une augmentation du pH rhizosphérique, alors que les plantes qui absorbent l'azote atmosphérique, telles les légumineuses, entraînent une diminution de ce pH et une amélioration de la disponibilité de P. L'absorption de P par la plante a majoritairement lieu à des pH compris entre 5.5 et 7 (Hinsinger, 2001).



**Figure 25.** Disponibilité du phosphore du sol en fonction du pH

La disponibilité maximale du P se situe dans une zone de pH comprise entre 5.5 et 7. A pH acide, le P du sol se fixe à des ions métalliques (Al, Fe) et à pH basique à du Ca.

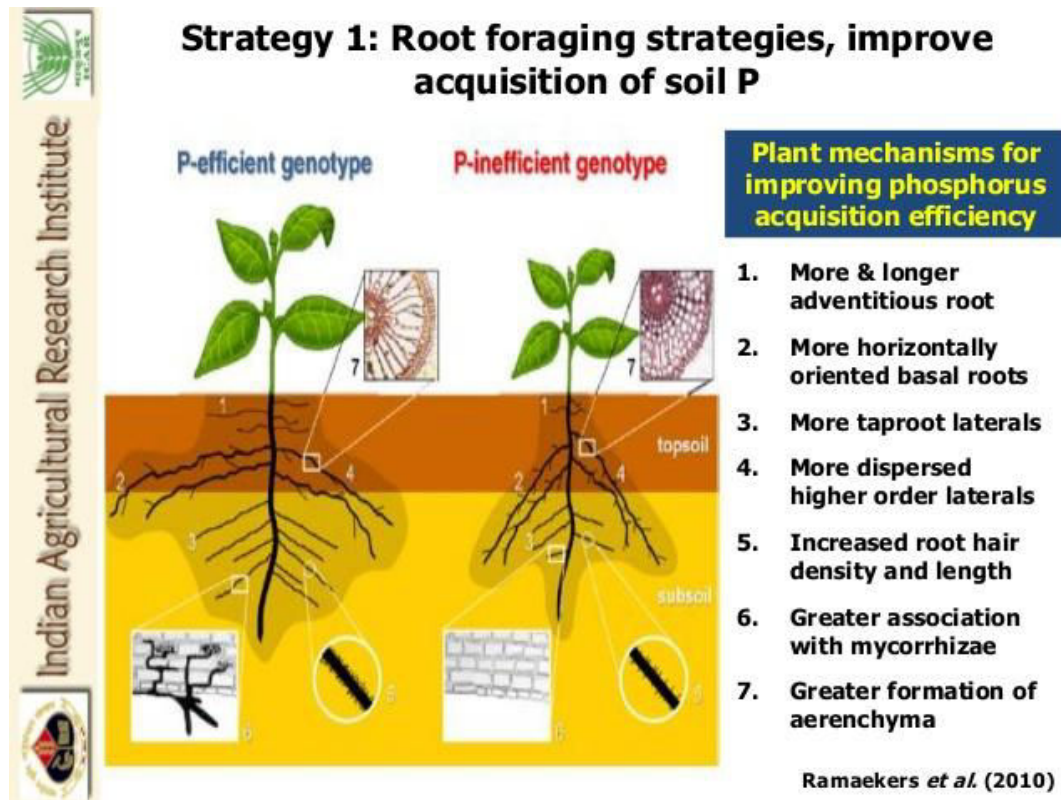
Source : (Demers, 2008)

### **I.10.1.2. Effet de la matière organique et de l'activité microbienne**

La matière organique du sol et l'humus, jouent un rôle important dans la disponibilité du phosphore, essentiellement présent sous forme organique, dans les couches supérieures des sols cultivés. La faible énergie de liaison de l'humus pour le phosphore, améliore sa disponibilité (Delgado et Torrent, 2001). Certains anions organiques issus de la décomposition de la matière organique peuvent se lier au fer, à l'aluminium ou au calcium et être défavorables à une fixation du phosphore. L'augmentation en phosphore du sol est dépendante de la teneur en matière organique, et est fonction des variabilités attribuées au type de sol et à l'historique de la parcelle (Laboski and Lamb, 2004). L'apport de fumier réduit la sorption d'apport de phosphore et favorise la fertilisation phosphatée. L'apport de phosphore et de fumier enrichit le sol en phosphore disponible pour le blé et le Soja (Reddy et al., 1999). L'utilisation de différentes sources de matière organique : fumier et compost, conduisent à une légère augmentation de P organique dans le sol. En agriculture intensive, favorisée par la disponibilité en eau d'irrigation, l'amendement en matière organique est possible aussi bien en apport de fumier ou de résidus de récoltes. Comparée aux céréales, la teneur supérieure en P des résidus des légumineuses permet une amélioration significative du P disponible, pour les rotations de cultures. Compte tenu des teneurs importantes de phosphore organique, en relation au phosphore total du sol, toute action visant à améliorer la minéralisation de la matière organique permettrait une meilleure mobilisation du P pour la nutrition des plantes. L'inoculation du sol par des champignons de type *Aspergillus* améliore la disponibilité du P du sol ainsi que la matière sèche et le rendement en grain chez le blé et le pois chiche (Tarafdar and Rao, 1996). L'inoculation du sol par des bactéries et des champignons à grand potentiel de production de phosphatases améliore la disponibilité du P du sol (Lidbury et al., 2017; Richardson et al., 2001).

## I.11. Réponse de la plante à la déficience en P

La réponse de la plante à une déficience en phosphore est complexe. Des modifications morphologiques, physiologiques, métaboliques, biochimiques et moléculaires, permettent à la plante de s'adapter à une faible disponibilité du phosphore inorganique du sol (Figure 26) et d'augmenter son efficacité d'utilisation (Hinsinger, 2001; Raghothama, 1999; Vance et al., 2003). La déficience en P chez la fève se caractérise par : des tiges courtes et minces, des feuilles droites et sans éclat avec une perte précoce et une floraison réduite. Chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la déficience phosphatée entraîne une réduction très importante de la croissance foliaire en affectant légèrement la photosynthèse. Sous carence en P, les plantes favorisent l'enracinement, augmentent le taux de prélèvement *via* le sol (Ramaekers et al., 2010). Lors d'une nutrition végétale adaptée en P et d'une absorption supérieure à la demande, différents processus permettent d'éviter l'accumulation toxique en cet élément, tels que la réduction de prélèvement en P, la libération de P minéral, le stockage de P minéral sous forme de P organique (phytate). Une étroite relation existe entre la carence phosphatée et la réduction du nombre de fleurs et le retard d'initiation florale. La fonction régulatrice du P inorganique dans la photosynthèse et dans le métabolisme des carbohydrates des feuilles peut être l'un des facteurs les plus importants limitant la croissance, particulièrement durant la phase reproductrice. Le niveau de phosphore disponible durant cette période régule le rapport amidon/sucrose au niveau des feuilles et la répartition des photo-synthétats entre les feuilles et les organes reproducteurs. L'effet du phosphore sur la répartition des assimilats serait en partie responsable de l'insuffisance d'apport de photo-assimilats aux racines nodulées des légumineuses déficientes en P, se traduisant également par l'apparition de symptômes de déficience en N (Marschner, 2012). Pour palier à la déficience phosphatée, il est montré que le phosphore migre des différents organes : racines, tiges et feuilles, pour alimenter les graines. En conditions limitantes, les racines de haricot accumulent le P, alors que les tiges et les feuilles le mobilisent vers les graines en conditions aussi bien efficientes que déficientes.



**Figure 26.** Caractéristiques de la plante et mécanismes favorables à l'efficacité d'absorption du phosphore

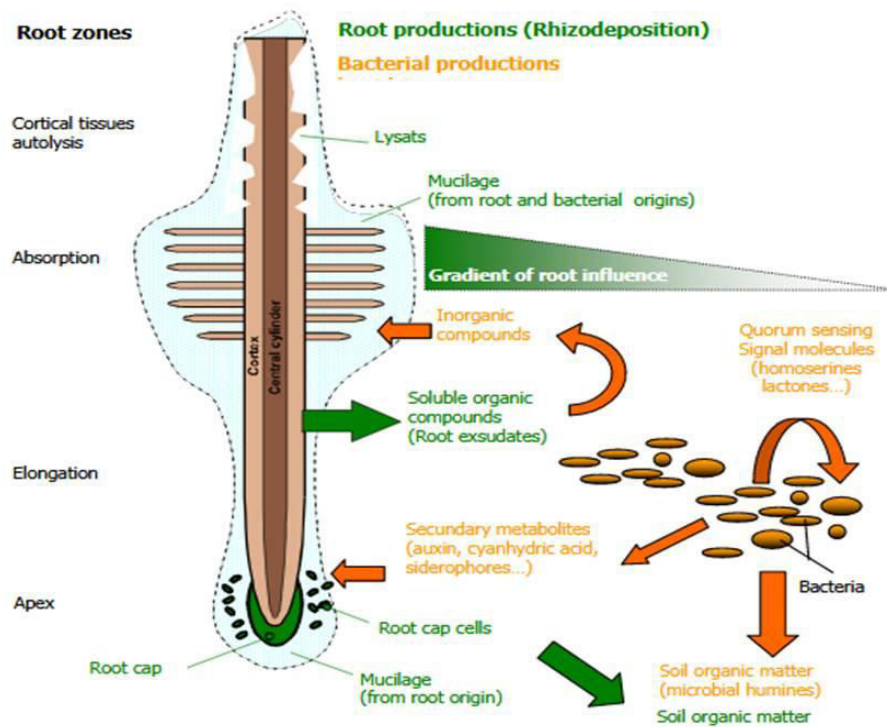
Les géotypes P-éfficients intègrent différentes caractéristiques et mécanismes, contribuant à l'adaptation à de faibles disponibilités en P et sont plus tolérants à la déficience en P, en comparaison à des géotypes P-inefficients (Ramaekers et al., 2010).

### I.11.1. Effet de l'espèce végétale et du géotype

Les mécanismes d'adaptation de la plante à la déficience phosphatée : développement racinaires et exsudats, mycorrhization et associations microbiologiques, dépendent entre autres du géotype végétal (Gobat et al., 2004). Une variabilité génétique de prélèvements du phosphore est observée chez le haricot (Attar et al., 2012) et la fève (Daur et al., 2011). Des géotypes de haricots ayant de plus grosses graines sont plus éfficients pour l'utilisation du phosphore, en conditions limitantes (Yan et al., 1995a). De même, l'arachide a un potentiel supérieur de prélèvement de P à celui du sorgho et du soja (Ae and Otani, 1997). Une différence entre espèces calcifuges (intolérantes au calcaire) et calcicoles (tolérantes au calcaire) est attribuée à la capacité des espèces calcicoles à sécréter des acides organiques favorables à la solubilisation du phosphore et/ou du fer. L'oxalate facilite l'extraction de P et le citrate est très éfficace dans l'extraction de Fe (Ström et al., 1994).

### **I.11.2. Effet de la morphologie racinaire**

En conditions de déficience en P, le nombre et la longueur des poils absorbants augmentent. L'adaptation à la déficience phosphatée chez le lupin se traduit par la production de racines protéoïdes (Figure 27) qui augmentent le contact de la surface racinaire avec le sol (Jossi, 2008). De plus, les racines protéoïdes sécrètent d'importantes quantités de citrate et de phosphatases dans la rhizosphère (Langlade et al., 2002). Le citrate dissout les phosphates de calcium insolubles, donnant du citrate complexe de Ca et du Pi. Les phosphatases permettent l'hydrolyse des formes organiques de phosphate du sol entraînant la libération de Pi (Mengel et al., 2001). Conjugué à une symbiose mycorhizienne, l'exploration racinaire et le prélèvement des formes solubles de P peuvent être améliorés. L'inoculation de fèves par des mycorrhizes seules ou combinée à un apport de phosphore augmente la matière sèche et les prélèvements du phosphore par la plante (El-Din and Moawad, 1988). Chez plusieurs espèces végétales, en condition de phosphore disponible, les prélèvements de P sont très corrélés à la longueur racinaire. Silberbush et Barber (1983) montrent que le taux d'élongation racinaire est un élément majeur de détermination du taux de prélèvement du P par les racines. La plupart des travaux corrélient les prélèvements du P à la surface ou à la longueur racinaire (Le Bot et al., 1998). Les poils racinaires sont les plus actifs dans l'absorption du P. Le système racinaire fin et l'abondance des poils absorbants chez le colza, permettent à la plante de mobiliser le phosphore, sans association avec des mycorrhizes (Hoffland et al., 1989).



**Figure 27.** Morphologie et production racinaire

Morphologie de la racine, rhizodéposition (vert), principale production bactérienne (orange) impliquée dans la croissance et la résistance des plantes (Jossi, 2008).

### I.11.3. Effet des exsudats racinaires

Divers types d'exsudats racinaires influent sur la solubilisation des nutriments (acides organiques, phénols ...), la restriction d'entrée de métaux toxiques (citrate, malate ...) et l'attraction de microorganismes bénéfiques (phénols, acides organiques et sucres) (López-Bucio et al., 2000a). La concentration des exsudats racinaires dans le sol ou dans la rhizosphère varie de quelques  $\mu\text{mol}$  à 80 mM. Dans les sols riches en calcaire, déficients en phosphore, les plantes sécrètent des acides organiques au niveau rhizosphérique mobilisant le phosphore fixé au Ca. Une forte capacité d'acidification du sol est observée chez le pois chiche (*Cicer arietinum*). Cette acidification, favorable à un meilleur prélèvement du P, est induite par l'exsudation d'acides organiques racinaires de type citrate (Wouterlood et al., 2004). La quantité d'acides organiques varie selon les espèces, les cultivars ou même les différents tissus végétaux. La biosynthèse, l'accumulation, le transport et l'exsudation racinaire augmentent en réponse au stress du milieu (López-Bucio et al., 2000a). Chez le

colza (*Brassica napus*), la libération d'acides organiques est localisée sur la zone apicale des racines (Hoffland et al., 1989) et se situe, chez le lupin, sur les racines protéoïdes (Gardner et Boundy, 1983). En sol calcaire ou neutre, les acides organiques : malate et citrate de la rhizosphère du maïs sont biodégradés plus rapidement que l'oxalate (Ström et al., 2001). L'efficacité des exsudats racinaires semble dépendre de plusieurs facteurs relatifs à l'acide libéré : sa nature, sa concentration, son pH et la durée de contact avec le sol. Comparé à d'autres acides tels que le citrate et le malate, l'oxalate semble le plus efficace, libérant plus de P (Ström et al., 2005). Des plants transgéniques de tabac capables de sécréter du citrate s'adaptent mieux à des sols calcaires déficients en P (López-Bucio et al., 2000b).

#### **I.11.4. Excrétion bactérienne d'acides organiques**

De nombreuses bactéries du sol excrètent des acides organiques (AOs) et produisent des phytases. Celles-ci peuvent jouer un rôle déterminant dans la solubilisation et la minéralisation du phytate insoluble (Gyaneshwar et al., 2002). Patel et al., 2010 ont étudié la diversité de bactéries rhizosphériques minéralisatrices de phytate, productrices d'acides organiques, afin de comprendre leur implication dans l'hydrolyse du Ca-phytate, forme prédominante des sols alcalins (Turner et al., 2006). Des études ont été réalisées sur des microbes racinaires solubilisateurs de P producteurs d'AOs (Rodriguez et al., 1999). Patel et al., 2010 ont montré que la sécrétion de AOs par des bactéries ayant une activité phytase favorise la libération de P du Ca-phytate et de sources de Po non disponibles pour la plante. La sécrétion d'acides organiques pourrait augmenter la minéralisation du phytate par dissolution du Ca-phytate et/ou avoir un effet positif sur l'activité phytase. Des isolats possédant des phytases acides (HAP), appartenant au genre *Pantoea*, *Citrobacter*, *Klebsiella* et *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* spp sécrètent des acides organiques (Patel et al., 2010). Tang et al., 2006 montrent que les acides citriques, oxaliques et maliques favorisent l'hydrolyse de phytates complexes comme le phytate d'aluminium et de fer. Les acides organiques, tels que l'acide citrique et malique, favorisent la libération de Pi d'une solution de phytate (Tang et al., 2006). Le malate et le succinate sont des sources d'énergie pour les rhizobactéries et les nodules. Le métabolisme du malonate est important pour la formation de nodules matures, en lien avec le bactéroïde. Les bactéries libres de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 ont des systèmes inductibles pour le catabolisme d'histidine, malonate. Schulze et al., (2002) ont montré que le malate était la principale source de carbone végétale utilisée par

les bactéroïdes. Ces acides organiques, exsudés de la racine peuvent augmenter la disponibilité de phosphate.

#### **I.11.5. Importance de la réserve en P des semences**

La réserve des semences en macro-éléments peut être essentielle à l'émergence et à la croissance des plantes (Tyler and Zohlen, 1998). Chez les légumineuses fourragères, le rendement en grain et la concentration en P dans le grain sont positivement corrélés (Bolland et Paynter, 1990). Stocké principalement sous forme de polyphosphates tels que les phytates, le phosphore est libéré par l'enzyme phytase avant d'être incorporé à d'autres molécules. Ces phytates constituent environ 50% du phosphore total des graines des légumineuses et 60 à 80% des graines de céréales (Al-Asheh and Duvnjak, 1995; Raboy, 1990). Les graines de féverole se composent de 50% de phytates, présents au niveau cotylédonaire chez les variétés à fleurs blanches et dans les téguments, sous forme complexée au fer, chez les variétés à fleurs colorées (Daoui, 2007). Une meilleure réserve en P chez le trèfle (*Trifolium subterraneum* L.) permet une meilleure émergence des plantes. La faible teneur en P dans la graine de lupin (*Lupinus albus* L.), couplée à la mise en place de cultures en conditions carencées en P, affecte négativement l'enracinement, la nodulation et la croissance de la plante (Wang et al., 2008). Chez le haricot, la nodulation est influencée par le niveau de P du sol et sa concentration dans la graine (Teixeira et al., 1999). En conditions déficiente en P et de stress hydrique, l'effet positif des réserves en P a été observé chez le riz et le blé (Burnett et al., 1997; Ros et al., 1997).

#### **I.12. Efficacité d'utilisation du phosphore**

Les cultures efficaces pour l'utilisation des éléments minéraux du sol et notamment le P (EUP), ont un rôle majeur en agriculture contemporaine. Dans les systèmes de production à faibles intrants, les cultures efficaces pour l'utilisation des éléments minéraux améliorent la productivité alors que dans les systèmes intensifs de production, notamment dans les pays développés, ces cultures sont très utiles pour réduire la pollution liée à des fertilisations excessives (Lynch, 1998). Des variabilités génétiques d'EUP existent chez différentes espèces végétales : la fève (Stelling et al., 1996), le pois cajan (Subbarao et al., 1997) et le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) (Vadez et Drevon, 2001). L'EUP est évaluée par rapport à la

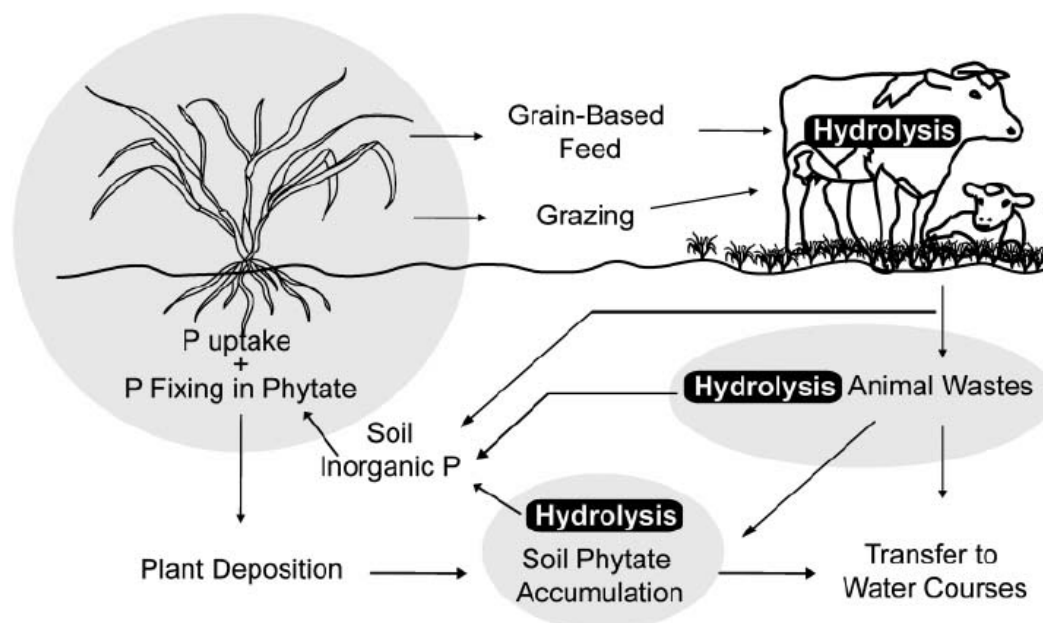


croissance de la plante (Yan et al., 1995a), au rendement en grain (Manske et al., 2001; Stelling et al., 1996; Yan et al., 1995b) ou aux processus physiologiques de fixation biologique d'azote (Vadez and Drevon, 2001). En condition limitante en P, l'EUP peut favoriser sa disponibilité, alors qu'en condition non limitante, celle-ci peut être liée à une meilleure efficacité d'absorption du P (Stelling et al., 1996). Les facteurs influençant l'efficacité d'absorption du P chez la plante, sont surtout liés à l'enracinement (López-Bucio et al., 2003), la sécrétion racinaire d'acides organiques, acidifiant le sol (Manske et al., 2001; Subbarao et al., 1997) et la colonisation par des mycorhizes (Jia et al., 2004) et des microorganismes, en général (Richardson et al., 2001).

### I.13. Le phytate

Le phytate, découvert en 1903, est un stéréoisomère d'inositol, composé de 6 atomes de Carbones et de un à six groupements phosphates, essentiellement présent sous forme de *myo*-inositol hexakisphosphate (*myo*\_InsP<sub>6</sub>, IP<sub>6</sub>) (Richardson et al., 2005). Le *myo*-inositol hexakisphosphate, avec ses groupements phosphates axialement localisés sur le C2 de l'inositol, se caractérise par une configuration très stable en forme de tortue (la numération C débutant de la nageoire droite, en sens inverse d'une aiguille de montre. Sa formule moléculaire est C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>P<sub>6</sub> et sa masse molaire est d'environ 660 g.mol<sup>-1</sup>. Le phytate est la principale réserve des tissus végétaux et du sol où il représente environ 80% du P total des graines et 60-80% du P organique du sol. Il constitue 1-5% de P organique des céréales, pollens, graines oléagineuses, légumineuses et noix (Singh and Satyanarayana, 2011) et est présent chez les microorganismes. Le phytate se trouve également dans les sédiments d'eau douce et salée. Au niveau rhizosphérique, le phytate est soumis à des processus d'adsorption/précipitation, avec une faible désorption, réduisant sa disponibilité pour la plante (Menezes-Blackburn et al., 2013). La plante ne peut quasiment utiliser le phytate rhizosphérique, comme source de Pi, du fait de sa faible activité d'hydrolyse racinaire (Richardson et al., 2009a). Malgré la capacité d'exsudation de phosphatases acides par les plantes, la minéralisation du Po est essentiellement régulée par la production de phosphatases extracellulaires de la microflore du sol (George et al., 2011; Nannipieri et al., 2011). La production de phosphatases acides est étroitement liée à la croissance et à l'activité enzymatique racinaire (Dinkelaker and Marschner, 1992; Krämer and Green, 2000). Nulle détection de phosphatase alcaline n'a eu lieu chez les plantes (Romanyà et al., 2017). Malgré l'abondance du phytate des sols, l'origine de celui-ci, sa dynamique et sa fonction écologique restent largement méconnues (Turner et al., 2006). En fonction de deux paramètres du milieu : le pH et la teneur en cations divalents de certains métaux (Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Mo, Zn), le phytate est présent sous deux principales formes, dans l'environnement. A pH acide, les groupements phosphates protoniques, conduisent à une forme non complexée et donc libre du phytate « metal-free phytate ». Par contre, de pH neutre à alcalin l'ionisation des groupements phosphates, par perte de protons, augmente leur affinité pour les cations divalents avec lesquels ils forment des complexes « phytate-metal » très stables et peu solubles. Pour la formation de ces complexes, les cations divalents à grands rayons ioniques comme le Ca<sup>2+</sup> peuvent se lier à deux groupements phosphates du phytate. Le phytate peut, non seulement,

chélater de nombreux métaux mais également fixer des peptides, protéines, et amino-acides, diminuant ainsi la biodisponibilité des métaux, protéines et minéraux d'importance nutritionnelle (Liu et al., 1998). Compte tenu de son affinité pour le fer, le phytate est particulièrement important en tant que sidérophore, surtout dans les tissus eucaryotes (Hawkins et al., 1993). Par absence ou insuffisance d'enzymes de dégradation, les animaux monogastriques (porcs, oiseaux, poissons) sont incapables de cataboliser les complexes phytates. La biodisponibilité du P et des minéraux dans l'alimentation végétale animale peut être augmentée par la dégradation des complexes métaux-phytate par des enzymes spécifiques nommées : phytases (InsP6\_phosphohydrolases). Le phytate du sol suscite donc un intérêt majeur par rapport à sa dynamique, sa disponibilité pour les plantes et son devenir dans l'environnement (Richardson et al., 2005). Turner et al. (2002) s'est intéressé au rôle et cycle de l'inositol phosphate dans l'environnement ; proposant un modèle conceptuel du cycle biogéochimique du phytate terrestre (Figure 28). L'information concernant le phytate est difficile d'accès, compte tenu de la complexité de son extraction, séparation et détection dans l'environnement.



**Figure 28.** Modèle conceptuel du cycle biogéochimique du phytate du sol

Cycle du phytate dans l'environnement (Turner et al., 2002).

## I.14. Le *Myo*-inositol

Le *myo*-inositol, alcool cyclique, composé de six atomes de carbone associés à des groupes hydroxyls, orientés axialement ou équatorialement dans l'espace, en fonction de leur position, possède neuf stéréoisomères (Turner et al., 2006). Chaque groupe hydroxyl de l'inositol peut s'associer uniquement à un résidu phosphate, produisant des composés de mono- à hexaphosphates d'inositol. Le *myo*-inositol est présent dans le sol et la rhizosphère. Il (Fry, 2000) est également localisé dans les tissus végétaux, y compris les nodules racinaires de légumineuses, telles que le pois et le soja, où il représente le principal composé isolé de son symbiote bactéroïdien : *Bradyrhizobium japonicum* (Kouchi and Yoneyama, 1986; Skøt and Egsgaard, 1984; Streeter, 1987; Streeter and Salminen, 1985). *Sinorhizobium meliloti*, symbiote de la luzerne, est capable d'utiliser le *myo*-inositol comme source de carbone (Kohler et al., 2010). Sur la base de similarité de séquences de gènes *iol* de *Bacillus*, des gènes potentiels du catabolisme de l'inositol (*iolA* et *iolRCDEB*) ont été identifiés chez *S. meliloti* et *Bacillus subtilis*. Les gènes impliqués dans le catabolisme des composés inositols ainsi que leur régulation, jouent un rôle important dans la nutrition et la signalisation de la symbiose rhizobium-légumineuses, lors de la compétition entre souches bactériennes et la nodulation de la plante hôte (Kohler et al., 2010). Trois loci nécessaires à la croissance de *R. leguminosarum* bv. *Viciae* sur *myo*-inositol ont été caractérisés. Deux correspondent à des loci cataboliques codant une malonate semialdéhyde déshydrogénase (*iolA*) et une acétolactate synthase (*iolD*). *IolD* fait partie de l'opéron *iolDEB*, alors que les fonctions des gènes *IolE* et *IolB* sont méconnues. Le troisième locus, *int*, code pour un système ABC transporteur, très spécifique du *myo*-inositol. Des mutants *idhA*, codant une *myo*-inositol déshydrogénase, chez *S. meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *viciae* nodulent leur plante hôte et fixent l'azote comme la souche sauvage (Fry et al., 2001; Galbraith et al., 1998; Poole et al., 1994). Chez *R. leguminosarum* bv. *viciae*, des tests de compétition avec la souche sauvage montrent que des mutants *iolA* et *iolD* ne sont pas compétitifs (Fry et al., 2001). L'activité inositol déshydrogénase, présente chez des souches de *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium fredii*, isolées de divers sols, laisse penser que l'inositol du sol représente un substrat majeur pour la nutrition et la survie des souches bactériennes (Wood and Stanway, 2001). Cependant, le *myo*-inositol ne représente pas une source de carbone pour la fixation d'azote au niveau du bactéroïde qui utilise les acides C-dicarboxyliques tels que le malate, le succinate et le fumarate fournis par la plante hôte (Fry, 2000). Enzymes cataboliques du *myo*-inositol, la

*myo*-inositol déshydrogénase et la 2-Kéto-*myo*-inositol déshydratase ne sont pas induites au niveau des bactéroïdes de *Rlv* 3841 (Poole et al., 1994). Les rhizopines sont des dérivées d'inositol spécifiques des nodules racinaires de légumineuses, pouvant être utilisées par les rhizobia comme source de carbone et d'azote (Heinrich et al., 2001). Leur structure est semblable à celle des opines, dont plusieurs formes ont été identifiées chez des espèces d'*Agrobacterium* (Tempé et al., 1977). Des souches bactériennes capables de synthétiser, dégrader et utiliser les rhizopines seraient plus compétitives dans la rhizosphère (Galbraith et al., 1998). Un test de 300 souches rhizobiennes montre qu'environ 10% des espèces de *S. meliloti* et de *R. leguminosarum* bv. *viciae* possèdent les gènes de synthèse et de dégradation des rhizopines (Heinrich et al., 2001). Des gènes impliqués dans la dégradation de *myo*-inositol, tel celui codant l'inositol déshydrogénase, interviennent également dans la dégradation des rhizopines (Fry, 2000).

## I.15. Les phytases

### I.15.1. Généralités

La biodisponibilité du P et des minéraux, pour la nutrition végétale et animale, est réalisable par dégradation enzymatique de complexes métal-phytates, par des phytases appartenant à une large classe de phosphatases spécifiques (*myo*-inositol- ou InsP6-phosphohydrolases), de type phosphomonoestérases (Oh et al., 2004). Les phytases hydrolysent les complexes inositol-phosphates, libérant des dérivés *myo*-inositol de moins en moins phosphorylés, du Pi (Greiner et al., 2007; Rodríguez et al., 2007). Ces enzymes sont présentes chez les micro-organismes (bactéries, champignons, levures), les grains de pollen des céréales, les légumineuses, les graines d'oléagineux et les noix ainsi que dans certains tissus d'organes animaux (Konietzny and Greiner, 2002). Une forte augmentation d'activité phytase est observée dans les graines en germination. Certaines phytases végétales racinaires se caractérisent par une faible activité enzymatique et une sécrétion rhizosphérique nulle. Des tests *in vitro*, sur milieu gélosé, montrent que la plupart des plantes sont incapables d'utiliser le phytate, comme seule source de P (Hayes et al., 2000; Richardson et al., 2001). Le sol, notamment rhizosphérique, héberge une diversité importante de micro-organismes aptes à synthétiser ces enzymes (Lidbury et al., 2017). Les phytases végétales et bactériennes sont généralement intracellulaires alors que les phytases fongiques sont extracellulaires. De nombreuses bactéries du sol Gram-positives et Gram-négatives, telles que : *Citrobacter braakii*, *Obesum-bacterium proteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Shewanella oneidensis*, *Serratia* sp., TN49, et *Yersinia intermedia* produisent des phytases (Jorquera et al., 2008a; Lim et al., 2007). Récemment, Pal Roy et al. (2017) ont mis en évidence une nouvelle phytase alcaline extracellulaire (3-phytase), chez *B. aryabhatai* RS1, isolée de la rhizosphère du pois chiche, active à basse température et bénéfique à la croissance végétale. Les phytases sont isolées par des techniques biochimiques classiques de précipitations par le sulfate d'ammonium/acétone, d'échanges ioniques et des étapes de gel-filtration chromatographiques (Konietzny and Greiner, 2002). Malgré de nombreuses études structurales et physico-chimiques des phytases, les données enzymatiques restent faibles et contradictoires (Balaban et al., 2017).

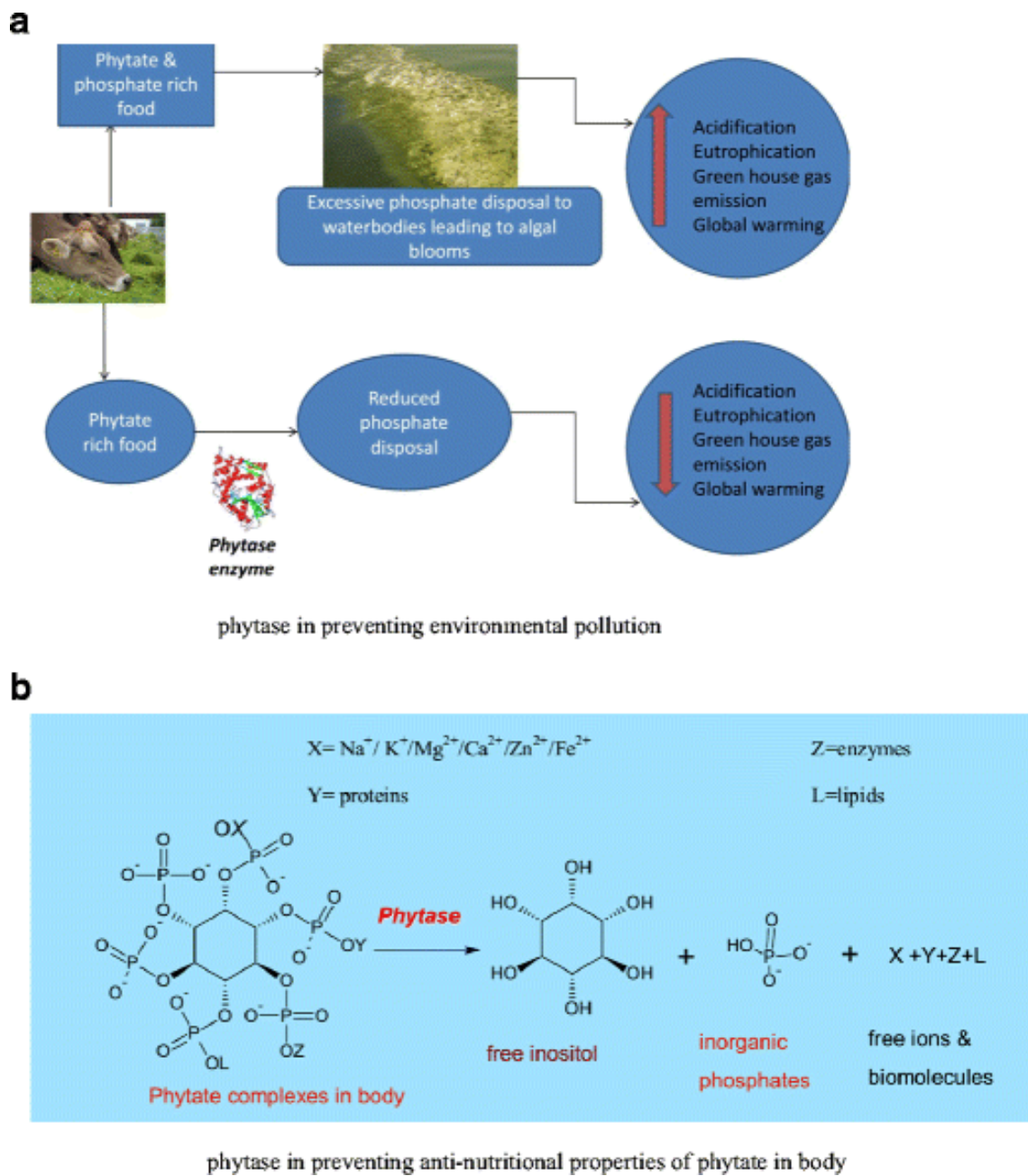
### I.15.2. Intérêt des phytases

Les phytases ont largement été étudiées en raison de leur principal intérêt dans la réduction de la teneur en phytates en alimentation animale, mais également pour leur rôle au niveau humain et écologique (Rebello et al., 2017). Ces enzymes sont utilisées comme additif alimentaire animal des monogastriques, les volailles et les poissons pour améliorer la nutrition végétale (Konietzny and Greiner, 2004). L'intérêt des phytases réside dans le fait que les animaux monogastriques sont incapables de dégrader le phytate pour satisfaire leur besoin en P, malgré l'utilisation d'une alimentation végétale à forte teneur en phytate. Le phytate, chargé négativement, est un facteur antinutritionnel apte à chélater les ions métalliques (Ca, Fe, K, Mg, Mn, Zn, ...), les rendant insolubles et donc indisponibles. Du fait d'une faible dégradation, les teneurs en phytates des fumiers de zones à forte densité animale pose de sérieux problèmes environnementaux tels que l'eutrophisation des cours d'eau (Figure 29). C'est ainsi que l'adjonction de phytases stables à l'alimentation du bétail et de la volaille permet une amélioration nutritionnelle en P minéral et en métaux, tout en réduisant les effets environnementaux liés à l'accumulation de déjections riches en phytates. D'un point de vue agronomique, les micro-organismes de la rhizosphère doivent entrer en compétition avec la plante pour certains éléments minéraux, dont le phosphore. Du fait d'une forte activité phosphatase dans la rhizosphère, les formes de P organique autres que le phytate sont souvent prioritairement minéralisées. La plupart des végétaux étant dépourvus de phytases extracellulaires, leur nutrition en P devient largement tributaire des micro-organismes producteurs de phytases et donc de la libération de P inorganique à partir de cette abondante source de P organique. En améliorant la disponibilité du phosphore et son utilisation par les plantes, les micro-organismes rhizosphériques à activités phytases sont considérés comme de potentiels promoteurs de croissance. Un certain nombre d'espèces bactériennes rhizosphériques telles que : *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* et *Burkholderia* ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes en augmentant la biodisponibilité du phosphore insoluble du sol (Singh and Satyanarayana, 2011). Des souches phytasiques d'*Enterobacter*, isolées de la rhizosphère de légumineuses, ont un effet positif sur la croissance et la nutrition en P. Des souches australiennes de *Pseudomonas* sp., à très forte activité phytase favorable au développement végétal, sont aptes à libérer 80% de  $P_i$  à partir de phytate (Balaban et al., 2017). Des souches bactériennes, à activité phytasique, de la famille des Burkholdéria, *Pseudomonas*, Entérobactéries, et *Pantoea* ont été isolées de la rhizosphère du lupin (*Lupinus albus*), au Japon (Jorquera et al., 2008a; Unno et al., 2005). Des

biofertilisants de type *Azotobacter/Azospirillum* et de Phosphobactéries, produits sous forme liquide, de poudre et de granules sont régulièrement utilisés en Inde, Chine, Iran et d'autres pays, pour augmenter les rendements. D'une utilisation aisée, non toxiques, écologiques pour l'environnement et d'un faible coût, les biofertilisants représentent une alternative aux fertilisants chimiques (Khan et al., 2014). Les effets positifs des biofertilisants microbiens sur la physiologie végétale et la croissance végétale est liée à (i) l'augmentation de la biodisponibilité de nutriments limitants tels que : N, P, vitamine B, acides-aminés et éléments chélatés par le phytate et (ii) la prévention et la suppression, par compétition, de maladies de pathogènes végétaux (Idriss et al., 2002). L'acquisition de connaissances concernant l'impact écologique, moléculaire et physiologique des communautés microbiennes natives sur la nutrition, la croissance et le rendement des plantes permettra une plus ample utilisation des biofertilisants microbiens favorables à une biodisponibilité d'éléments nutritifs essentiels. Les phytases ont fait l'objet d'études biotechnologiques pour la complémentation alimentaire animale, ainsi que chez les plantes ; parmi : des HAPs d'*Aspergillus niger*, *A. ficuum*, *A. fumigates*, de champignons et de levures (Yao et al., 2012). L'expression de gènes bactériens, tels que 168phyA de *Bacillus subtilis* et appA d'*E. coli*, a également été obtenue (Hong et al., 2008; Lung et al., 2005), notamment chez le tabac, le soja, le blé, la luzerne, la patate douce, *A. thaliana* et sont d'un grand intérêt biotechnologique dans la complémentation alimentaire des animaux monogastriques, les volailles et les poissons (Richardson et al., 2001). Malgré l'utilisation ancestrale de phytases fongiques en transgénèse végétale, l'utilisation récente de bactéries du sol, du genre *Bacillus*, présente un potentiel supérieur, suite à la caractérisation de l'unique  $\beta$ -propeller phytase aux nombreux avantages. La phytase alcaline bacillaire est spécifique du phytate et possède une forte activité à un pH physiologique spécifique et est résistante aux fortes températures et à la dégradation protéolytique. Des plantes transgéniques 168phyA de *B. subtilis* montrent une augmentation de biomasse aérienne, longueur de tiges, nombre de fleurs et de fruits, et teneur en P de 100%, par rapport au témoin (Lung et al., 2005; Yip et al., 2003). Malgré des résultats encourageants en laboratoire, tant au niveau des biofertilisants microbiens que transgénèses, les effets au champ ne sont pas toujours ceux escomptés (George et al., 2005). Plusieurs facteurs tels que l'interaction avec les microorganismes rhizosphériques, les propriétés physico-chimiques défavorables du sol, la faible capacité des souches microbiennes à coloniser les racines des plantes et d'autres facteurs environnementaux, tels que les températures élevées, les faibles précipitations, peuvent négativement affecter l'utilisation des biofertilisants. L'une des stratégies pour outre-



passer ces limitations est l'utilisation de microorganismes locaux adaptés aux conditions climatiques particulières de l'agro-système.



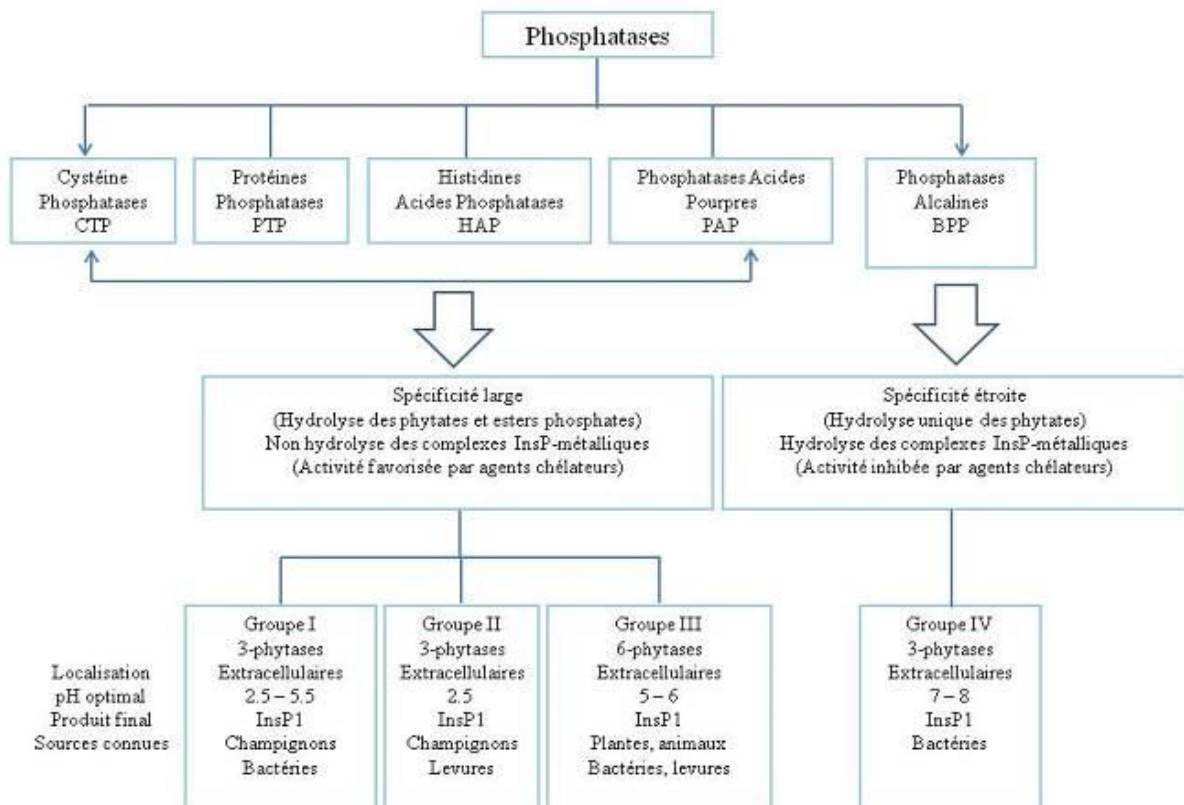
**Figure 29.** Intérêt des phytases

Au niveau a. Environnemental et b. Nutritionnel (Rebello et al., 2017).

### I.15.3. Nomenclature et classification des phytases

La classification des phytases est basée sur l'homologie de séquences protéiques, la structure tridimensionnelle, les propriétés biochimiques et les mécanismes catalytiques, la spécificité vis-à-vis du substrat, et du pH optimum d'activité enzymatique (Bohn et al., 2008; Mullaney and Ullah, 2003; Oh et al., 2004). La nomenclature internationale reconnaît deux principales classes de phytases : la classe I correspondant à des phytases acides, principalement de type Histidine acid phytases (HAPs), opposée à la classe II des phytases alcalines (Figure 30), dont la plus connue est la phytase  $\beta$ -hélicoïdale ou «  $\beta$ -propeller phytase » (BPP), présente chez des bactéries du genre *Bacillus* (Yao et al., 2012). Les phytases acides incluent également des cystéines phytases (CPs), des phytases acides pourpres (PAPs) et des protéines tyrosines phosphatases (PTP\_like polyphosphatases) (Chu et al., 2004; Fan et al., 2013; Lim et al., 2007; Mullaney and Ullah, 2003; Pal Roy et al., 2016). La classe des HAPs possèdent trois motifs conservés (i) au niveau du site actif (RHGXRXP), (ii) d'une cystéine associée à un pont dissulfure responsable de thermostabilité, et (iii) d'un dipeptide C-terminal catabolique (HD), permettant l'association au substrat (Mullaney et Ullah, 2005). Les PAPs, de divers règnes, possèdent des motifs phosphomonoestérases: DXG, GDXXY, GNH[E/D], VXXH, et GHXH composés de sept résidus amino acides de couplage à des ions métallique (Richardson et al., 2001; Singh and Satyanarayana, 2011). Les PAPs animales se composent de deux centres métalliques [Fe(III)\_Fe(II)], alors que les PAPs végétales sont essentiellement des protéines homodimériques comprenant un atome de Fe(III), associé à un atome de zinc ou de manganèse (Mukhametzyanova et al., 2012; Richardson et al., 2001). La phytase alcaline (Phy-Ast), de *Selenomonas ruminantium* du rumen de ruminants, a une séquence assez proche des phytases bactériennes; son site actif contient un site d'ancrage au P, un motif HCXXGXXR et un site WPD, formant une région de fixation au substrat, caractéristique des tyrosines phosphatases (PTPs) (Akhmetova et al., 2013; Gontia et al., 2012). Les phytases alcalines de *Bacillus*, dépourvues de motifs conservés caractéristiques des phytases acides, ont une architecture à six lames  $\beta$ -propeller. Substrat spécifique, ne pouvant hydrolyser que les complexes Ca-phytates et entièrement dépendantes de Ca, elles déphosphorylent stéréospécifiquement, par détachements successifs, chacun des seconds groupes P (Haefner et al., 2005; Yao et al., 2012). En fonction du premier site d'initiation de déphosphorylation du phytate, les phytases se subdivisent en trois groupes : (i) 3-phytases (*myo*-inositol

hexakisphosphate-3-phosphohydrolases, EC 3.1.3.8), (ii) 6-phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate-6-phospho-hydrolases, EC3.1.3.26), et (iii) 5-phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate-5-phosphohydrolases, EC 3.1.3.72). Les 3-Phytases, présentes chez les champignons et les bactéries, initient la déphosphorylation du phytate au niveau des C1 et C3 de l'inositol. Les 6-Phytases, présentes dans les grains des plantes supérieures et les 5-phytases isolées de légumineuses : haricot, pois et d'une bactérie du rumen des ruminants : *Selenomonas ruminantium* initient, respectivement, la déphosphorylation du phytate au niveau de C6 et C5 (Yao et al., 2012). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux deux principales phytases présentes chez les microorganismes : la Phosphatase Histidine Acide (HAP) et la  $\beta$ -Propeller Phytase (BPP), respectivement actives à pH acide et basique ; l'activité de la BPP étant calcium-dépendante.



**Figure 30.** Classification des phytases

Deux principales classes de phytases sont représentées : la classe I des phytases acides, de type Histidine acid phytases (HAPs), opposée à la classe II des phytases alcalines (Oh et al., 2004).

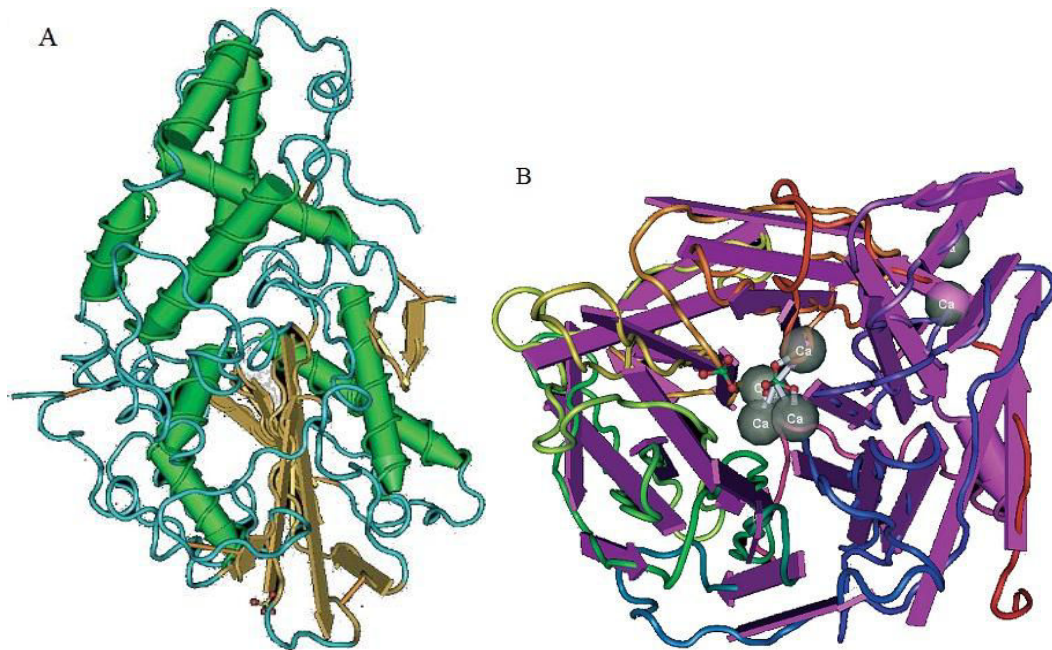
### **I.15.3.1. Les Histidines Acid Phosphatases (HAPs)**

La classe des HAPs (Figure 31A) regroupe la plupart des phytases bactériennes, fongiques et végétales. Leur principale signature est la présence, au niveau du domaine actif de l'enzyme, de deux motifs hautement conservés : un motif RHGXRXR du côté N-terminal et un motif HD du côté C-terminal. Ces motifs sont absents chez les autres classes de phytases. La classification par l'UIBBM (Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire) subdivise les HAPs selon leur site de clivage sur le phytate : le numéro de C portant le groupement PO<sub>4</sub> au niveau duquel est initiée le clivage, en 3-phytase (EC 3.1.3.8) et 6-phytase (EC 3.1.3.26). Ces enzymes sont peu spécifiques du substrat et peuvent donc catalyser l'hydrolyse de phospho-esters autres que les phytates et les déphosphoryler jusqu'à un inositol-monophosphate, avec libération de 5 Pi. Elles hydrolysent les phytates libres, non complexés à des cations et des ions métalliques, elles sont peu thermostables (Wyss et al., 1999). Cependant, en lien à une forte thermostabilité et spécificité de substrat ainsi qu'à une capacité à dégrader les liaisons phytates métalliques, des HAP d'espèces bactériennes telles que : *B. subtilis* représentent de réelles alternatives de complément alimentaire. Les HAP catalysent l'hydrolyse du phytate en deux étapes (i) une attaque nucléophile de l'histidine du site actif de l'enzyme de la liaison phosphoester scissible du phytate (Oh et al., 2004) et (ii) la protonation du groupe partant du résidu acide aspartique du motif HD (Ostanin et Van Etten, 1993).

### **I.15.3.2. Les β-propeller phytases (BPPs)**

Les phytases β-hélicoïdales (Figure 31B) ou β-propeller phytase (BPP) font partie des phytases alcalines relativement bien étudiées, notamment chez les bactéries du genre *Bacillus*. Ce sont des 3-phytases (coupure initiale en position 3 du cycle *myo*-inositol), dépendantes de Ca<sup>2+</sup>, indispensable à leur stabilité et à leur activité catalytique. Elles sont dépourvues de la séquence RHGXRXR des HAPs et semblent exclusivement exister chez les bactéries, malgré une gamme de pH et des traits communs à certaines phytases végétales dont la structure moléculaire est méconnue (Mullaney et Ullah, 2003). Elles sont définies en relation à l'architecture de leur domaine actif qui se présente sous forme d'une hélice à 6 lames incluant deux sites spécifiques. Le premier est un site d'affinité, facilitant le contact entre l'enzyme et le substrat et le second est un site de clivage correspondant au site d'hydrolyse. Alors que les

HAPs sont capables de déphosphoryler l'acide phytique jusqu'à un inositol-monophosphate, les BPPs produisent un inositol-triphosphate *ins* (2, 4, 6) P<sub>3</sub> (Greiner et al., 2007), libérant 3 Pi par molécule de phytate. Contrairement aux HAP, les BPP sont très spécifiques du phytate ; elles sont thermostables et capables de dégrader des liaisons métalliques (Lei et al., 2013). Compte tenu de leur intérêt biotechnologique ainsi que de leur utilité, en tant que complément alimentaire animal, des phytases alcalines ont été massivement produites dans des systèmes bactériens (Elkhalil et al., 2007). Les  $\beta$ -propeller phytases sont des enzymes dont le nom est caractérisé par leur unique configuration spatiale. Ces enzymes sont trouvées chez des bactéries du genre *Bacillus* isolées du sol et des grains de riz et chez *B. amyloliquefaciens* DS11, qui produit la phytase sur un milieu contenant de l'hydrolysate de caséine et du blé. Une forte activité phytase est également trouvée chez *B. laevolacticus* et *Bacillus* sp. KHU-10 sous conditions optimales de culture (Fu et al., 2008). Les gènes de phytases alcalines de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, et *B. subtilis* ont été clonés et séquencés ; le poids moléculaire des produits protéiques est de 38-44 kDa (Fu et al., 2008). La phytase alcaline PhyP de *Pedobacter nyackensis* MJ11 CGMCC 2503 possède une séquence en acides aminés différente de *B. subtilis* et d'autres  $\beta$ -propeller phytases (Huang et al., 2009). La récente  $\beta$ -propeller 3-phytase PhyB extracellulaire, isolée de la rhizosphère du pois chiche, chez *B. aryabhatai* RS1a a été purifiée chez *B. subtilis* (Kerovuo et al., 1998). L'inoculation du pois chiche par *B. aryabhatai* RS1, en sol/milieu de culture Pi déficients et présence de phytate, favorise la germination et la croissance des jeunes plantes, l'augmentation des longueurs racinaires et caulinaires, ainsi que de la biomasse aérienne. L'inoculation par *B. aryabhatai* RS1 pourrait favoriser la biodisponibilité du P et/ou de cations essentiels à la plante, après hydrolyse du phytate par la phytase bactérienne (Pal Roy et al., 2016). A la différence des HAPs, les phytases alcalines sont dépourvues du motif RHGX<sub>2</sub>RP, du dipeptide catalytique HD et du pont disulfure, nécessaire à la stabilité structurale et l'activité catalytique. Toutes les phytases alcalines connues ont des propriétés biochimiques et des mécanismes d'activité catalytique communs (Zeng et al., 2011).



**Figure 31.** Structure des phytases HAP et BPP

Structures moléculaires informatisés du Centre National d'Information des Biotechnologies (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) de deux classes de phosphatases: (A) la phytase acide HAP et (B) la phytase alcaline BPP, qui nécessite un complexe spécifique Ca-phytate pour son activité (Mullaney et Ullah, 2003).

#### **I.15.4. Caractéristiques moléculaires et activité phytase**

L'activité enzymatique des phytases eucaryotes et procaryotes est déterminée par les sites conservés de l'enzyme alors que les autres sites, composés de résidus d'acides aminés, forment des motifs uniques spécifiques des familles de phytases. Ces motifs sont impliqués dans les changements et l'évolution fonctionnelle de la voie métabolique des phytases (Fan et al., 2013). La première phytase caractérisée chez *Aspergillus niger* (PhyA) a une masse moléculaire de 80 kDa, avec 10 sites de glycosylations et est codée par un fragment d'ADN de 1,4 kb (Lei et Porres, 2003; Rodriguez et al., 1999). La masse moléculaire des phytases bactériennes se situent entre 40 et 55 kDa, alors que celle des phytases fongiques se situent entre 80 et 120 kDa. Les différences de glycosylation expliquent une masse supérieure des phytases fongiques (Choi et al., 2001; Kerovuuo et al., 1998; Lei et Porres, 2003; Ullah et al., 2000). La masse moléculaire de phytases végétales isolées du maïs, du blé, du lupin, de l'avoine et de l'orge se situent entre 47 et 76 kDa (Greiner, 2002).

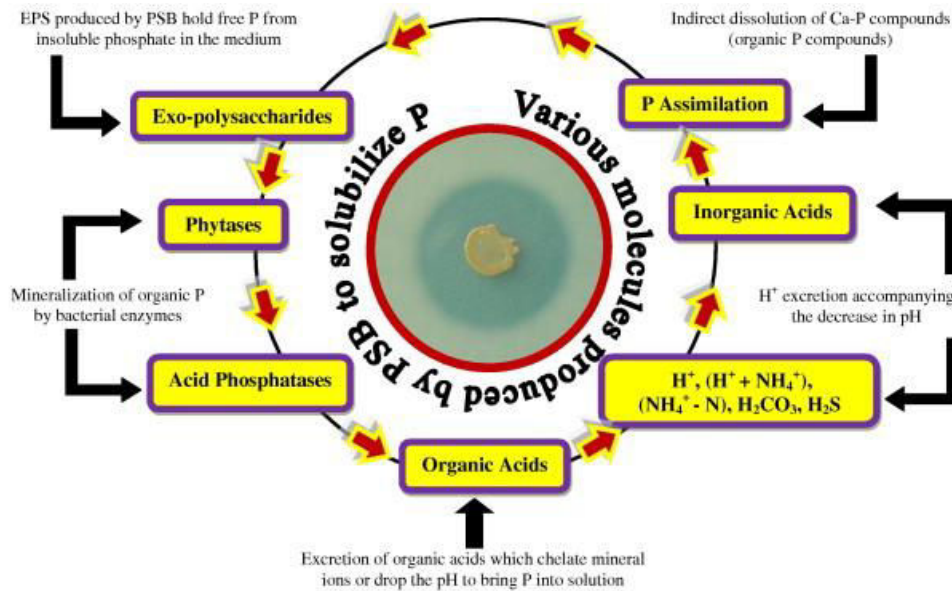
Les phytases les plus connues ont un pH optimal d'activité compris entre 4,5 et 6. Les phytases isolées de *Bacillus sp.* ont un pH optimal d'activité neutre ou alcalin (Choi et al., 2001). La phytase d'*A. niger* (phyA) se caractérise par deux valeurs optimales de pH : 2,5 et 5,5 et par une baisse d'activité entre ces deux points (Rodriguez et al., 1999). La température optimale d'activité chez la plupart des phytases végétales et microbiennes se situe entre 45° et 60°C. La thermostabilité d'une phytase est liée à sa résistance à la dénaturation thermique, tel le cas d'organismes hyperthermophiles et/ou, sa capacité de repliement après dénaturation thermique (Wyss et al., 1999). Cette caractéristique est affectée par les conditions environnementales (Rodriguez et al., 2000). Un inconvénient majeur des enzymes thermostables est leur faible activité spécifique à température ambiante, associée à une grande rigidité diminuant la flexibilité protéique. Certaines HAPs ont un pH optimal d'activité faible et sont très spécifiques du substrat. Par contre, de nombreuses BPPs, essentiellement bacillaires, sont uniquement spécifiques du phytate et de ses complexes.

Des recherches intensives ont été réalisées au niveau de différentes phytases par rapport à la spécificité et à l'affinité de substrats (Greiner, 2002; Wyss et al., 1999). Les phytases microbiennes, chez certaines espèces microbiennes telles que : *A. Niger*, *E. coli*, *Bacillus sp.*, semblent avoir une grande affinité pour le phytate, alors que les phytases végétales et fongiques, telles que celle de *A. fumigatus*, ont une spécificité de substrat plus large (Wyss et al., 1999) et sont capables de dégrader des phosphates d'inositol inférieures.

L'activité phytase est généralement déterminée et dosée à partir d'un substrat spécifique et libération de Pi par min, à pH et température donnés. Sur milieu phytate gélosé, indispensable à un premier screening bactérien, la présence d'un halo translucide plus ou moins développé (Figure 32) et le calcul de l'indice de minéralisation du phytate traduisent l'importance de l'activité phytase (Kumar and Narula, 1999). La présence d'un halo sur milieu gélosé pouvant être liée à une réaction aspécifique et la production d'acides organiques n'est pas le seul critère de définition d'une activité enzymatique de minéralisation du phytate. Un second test en milieu liquide ainsi que le dosage de la production de Pi sont nécessaires pour étayer les premiers tests en milieu gélosé (Restrepo-Franco et al., 2015). La recherche *in silico* d'homologies de séquences génomiques et protéomiques, dans des banques de données, permet le design d'amorces spécifiques pour la caractérisation de gènes phytases, *in vitro* et *in situ* et leur isolement (Balaban et al., 2017; Bergkemper et al., 2016; Kumar et al., 2012, 2017). Des séquences conservées d'acides aminés sont rapportées chez de nombreuses phytases acides et alcalines (Mullaney et Ullah, 2003, 2005). Des séquences protéiques d'importance industrielle ont été caractérisées *in silico*. Des études biochimiques, la recherche



de motifs et d'homologies, l'alignement de séquences multiples, la construction d'arbres phylogénétiques, la distribution des superfamilles de phytases a été analysée grâce à des outils bioinformatiques (Malviya et al., 2011; Morya et al., 2012).



**Figure 32.** Produits organiques et inorganiques bactériens de solubilisation du P du sol

Différents substances organiques et/ou inorganiques sont produites par les bactéries solubilisatrices de phosphore du sol (Ahemad and Kibret, 2014).



## Présentation de l'étude

Les légumineuses représentent un défi majeur pour l'agriculture de demain, au niveau économique, environnemental et pour assurer la sécurité alimentaire. Au delà du projet FABATROPIMED, le développement de cultures de légumineuses en Europe et en France permettrait, par exemple, de limiter l'import de soja : source de déprises forestières au Brésil, pour la génération de terres agricoles.

Ce travail s'intitule « Diversité fonctionnelle de rhizobia associés à la féverole, en agro-écosystème Sud de France ». Néanmoins, au-delà de la fixation d'azote traditionnellement associée aux rhizobia, nous avons rapidement fait évoluer la partie de recherche vers la capacité des mêmes souches à minéraliser le P organique.

Les objectifs spécifiques de cette thèse visent à (i) réaliser un diagnostic nodulaire sur féverole, en agro-écosystème Sud de France, en vue d'isoler et de sélectionner des rhizobia locaux, aptes à minéraliser le phosphore organique du sol, afin de le rendre disponible et biodisponible pour la plante associée, (ii) tester sur féverole au niveau phénotypique, les souches rhizobiennes minéralisatrices et/ou solubilisatrices de phosphore, en conditions de culture hydroaéroponique sous serre, (iii) amplifier *in vitro* des gènes phytases, à l'aide d'amorces générées *in silico*, à partir de séquences disponibles dans les banques de données, (iv) immuno-localiser ces gènes *in situ*, au niveau de nodules indéterminés de féverole, (v) caractériser la diversité des isolats rhizobiens d'intérêt, au niveau génotypique (ADNr 16S et/ou *recA*), et symbiotique (*nodD*).

Afin d'atteindre ces objectifs, le manuscrit de thèse se compose de trois chapitres, suivis de la liste des références bibliographiques et des annexes.

Le chapitre 1 présente une synthèse bibliographique descriptive sur (i) l'importance des légumineuses en général et de la féverole, en particulier, dans les systèmes de culture, en agro-écosystème Sud de France, (ii) l'association symbiotique des légumineuses à des microbiotes du sol (bactéries, champignons), favorables à la nutrition azotée et phosphatée de la plante associée, (iii) la problématique de disponibilité et de biodisponibilité pour la plante, du phosphore du sol ; sa solubilisation et sa minéralisation ainsi que les conséquences plus particulières de sa carence, sur les légumineuses fixatrices d'azote.

Le chapitre II est consacré à la présentation des résultats relatifs à l'aptitude des isolats rhizobiens de féverole Sud de France à (i) solubiliser le P minéral complexe (P tricalcique)

et/ou (ii) minéraliser le P organique (phytate). Dans cette partie du travail, des isolats rhizobiens sont phénotypés en relation à leur capacité de solubilisation et/ou de minéralisation du P minéral et/ou organique. Ils sont phénotypiquement testés pour leur capacité à renoduler *Vicia faba* en culture hydroaéroponique sous serre en conditions suffisantes ou déficientes en P. La présence de rhizobia locaux symbiotes de *Vicia faba*, est déterminé après diagnostic nodulaire au niveau de placettes de l'agro-écosystème Sud de France, sur mesure des biomasses aériennes, nodulaires et racinaires. L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) est déterminée au champ et sous serre, par test de corrélation des biomasses aériennes et nodulaires. Les activités phytases des isolats sont déterminées, *in vitro*, sur test de minéralisation du phytate en culture libre ainsi qu'au niveau nodulaire, en association à *Vicia faba*. La diversité des isolats d'intérêt est déterminée au niveau (i) fonctionnel sur la recherche de gènes phytases pouvant intervenir dans la dégradation du phytate ; (ii) phylogénétique et symbiotique. Nous avons ainsi sélectionné des isolats rhizobiens, capables de minéraliser le phytate, pouvant être des candidats d'intérêt en tant que biofertilisants dans les systèmes de culture Sud de France, capables de libérer du phosphore disponible pour la plante hôte *Vicia faba* et, selon toute hypothèse, favoriser la croissance et le rendement en grains.

Le chapitre III est dédié au matériel et méthodes.

La dernière partie du manuscrit présente une conclusion générale et les perspectives.

## Chapitre II : Résultats et discussion

### II.1. Impact de l'agroécosystème sur la nodulation et la croissance de *Vicia faba*

#### II.1.1. Généralités

Le diagnostic nodulaire vise à répondre à trois principales questions posées au champ :

1. La symbiose fixatrice d'azote (SFN) couvre-t-elle les besoins de la culture en azote ?
2. Quels facteurs biotiques ou abiotiques limitent la croissance de la plante dans les systèmes de culture de la légumineuse : la féverole ?
3. Quels sols hébergent des rhizobia efficaces pour la symbiose fixatrice d'azote et l'utilisation du phosphore ?

Ce diagnostic peut s'appliquer aux cultures de légumineuses spontanément nodulées par des souches de rhizobia présentes dans le sol, ou inoculées. Les résultats du diagnostic nodulaire permettent de définir la nécessité d'une inoculation, dans le cas d'une absence de nodules ou de la présence de nodules inefficaces induits par des rhizobia inadaptés. Si la SFN s'avère plutôt limitée par des conditions édapho-climatiques défavorables, des adaptations du matériel biologique (micro- et macro-symbiotes) et de l'itinéraire technique sont envisageables.

En raison de la variabilité de taille des nodules de type indéterminé de *V. faba* (Figure 33), y compris au niveau d'un même plant, le paramètre d'évaluation de la nodulation en fonction des biomasses sèches nodulaires, sans prise en compte de la numération, est une méthode fiable. Des coupes nodulaires permettent de vérifier la couleur de la zone centrale infectée et révélatrice du bon fonctionnement de la nitrogénase à la couleur rose, rouge ou rougeâtre liée à la présence de leghémoglobine : une hémoprotéine uniquement synthétisée par des nodules fixateurs d'azote.



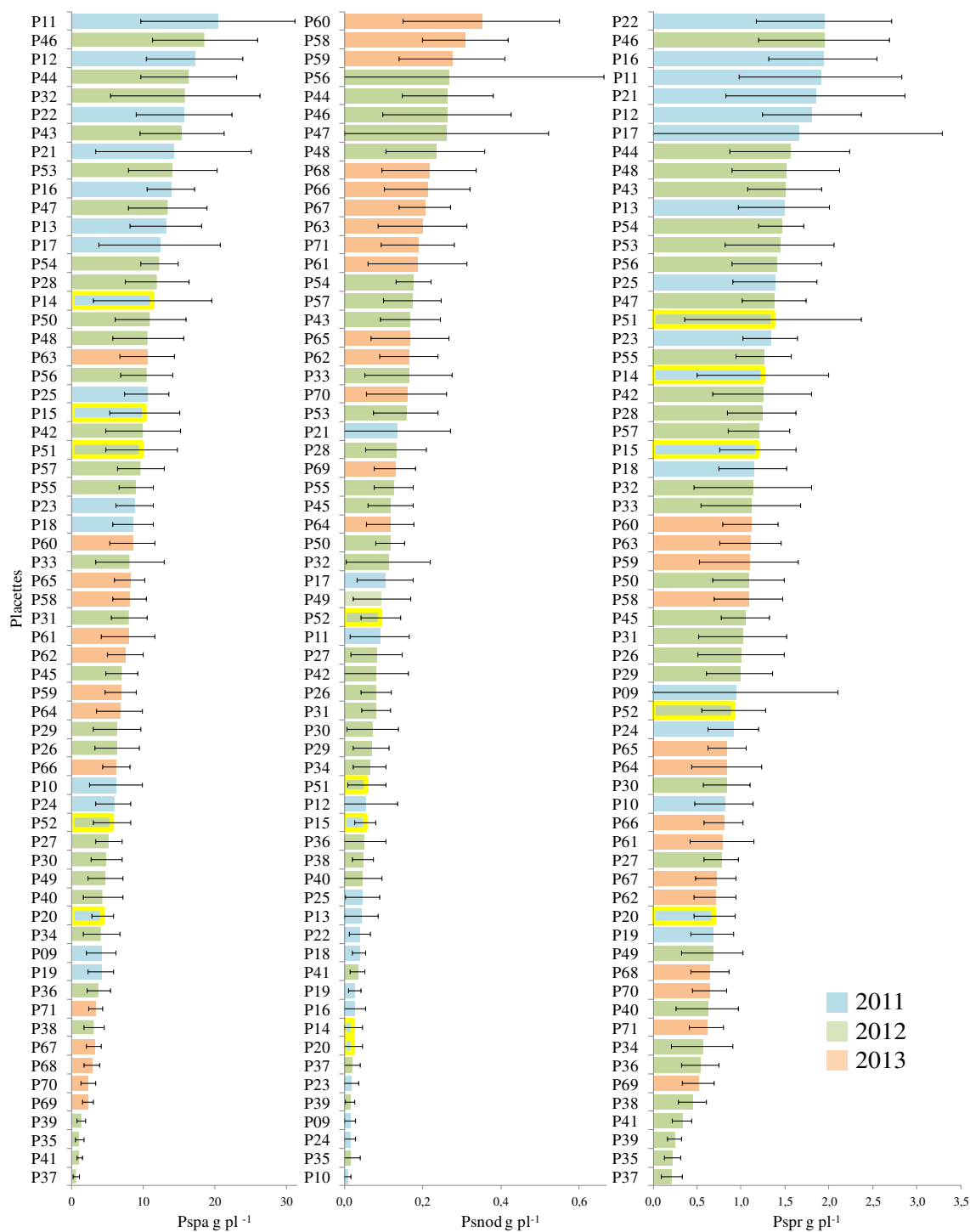
**Figure 33.** Nodules de racine de féverole, de type indéterminé  
Source : Odile Domergue.

### **II.1.2. Variation des biomasses nodulaires, aériennes et racinaires, en fonction des placettes**

Les valeurs moyennes des biomasses nodulaires sèches ( $P_{snod} \text{ g pl}^{-1}$ ), aériennes ( $P_{spa} \text{ g pl}^{-1}$ ) et racinaires ( $P_{sr} \text{ g pl}^{-1}$ ), sont établies sur 10 à 20 plants de féveroles prélevés à floraison, pour chacune des 63 placettes (P9 à P71) échantillonnées. L'échantillonnage porte sur : 17 placettes (P9 à P25) en 2011, 32 placettes (P26 à P57) en 2012 et 14 placettes (P58 à P71) en 2013, différenciées par les couleurs bleu (2011), vert (2012) et orange (2013), au niveau des deux histogrammes générés (Figure 34 et Figure 35). Ces histogrammes sont établis selon tri différentiel des données (*i*) ordre croissant des biomasses nodulaire, aérienne et racinaire moyennes de chacune des 63 placettes (Figure 34), permettant de déterminer les seuils minimums et maximums de nodulations, croissances (aériennes et racinaires), au niveau de chacune des placettes et les tendances en fonction des années d'échantillonnage (*ii*) ordre croissant des seules biomasses nodulaires (Figure 35), permettant de raisonner les biomasses aériennes et racinaires de la plante, en fonction de la nodulation et d'établir un lien entre les niveaux d'infectivité (nodulation), d'effectivité (croissance aérienne) et de déduire l'efficacité symbiotique des souches rhizobiennes locales. De fortes variabilités de nodulation, de croissances aérienne et racinaire, sont à noter au niveau inter- et intra-placettes (Erreur Standard) et selon les années (2011, 2012, 2013).

### II.1.2.1. Classification selon un ordre croissant de chacune des moyennes

L'analyse des histogrammes classifiés selon un ordre croissant de chacune des valeurs de biomasses nodulaires, aériennes et racinaires (Figure 34) situe (i) le poids sec nodulaire le plus faible = 0.01 Psnod g pl<sup>-1</sup>, au niveau des placettes P10, P24, P9 (2011) et P35, P39 (2012) et le plus fort = 0.35 Psnod g pl<sup>-1</sup> au niveau de la placette P60 (2013). Les biomasses nodulaires moyennes de l'année 2013, comprises entre 0.12 (P64) et 0.35 (P60) Psnod g pl<sup>-1</sup>, montrent une nodulation supérieure à celle de 2012 avec des biomasses nodulaires moyennes comprises entre 0.01 (P39, P35) et 0.27 (P56) Psnod g pl<sup>-1</sup> et celle de 2011 aux biomasses nodulaires moyennes les plus faibles, comprises entre 0.01 (P10, P24, P9) et 0.13 (P21) Psnod g pl<sup>-1</sup>; (ii) Le poids sec des parties aériennes le plus faible = 0.64 Pspa g pl<sup>-1</sup> au niveau de la placette P37 (2012) et la plus forte = 20.41 Pspa g pl<sup>-1</sup> au niveau de la placette P11 (2011). Les biomasses aériennes moyennes de 2013 comprises entre 2.2 (P69) et 10.5 (P63) Pspa g pl<sup>-1</sup> montrent, hors placettes P37, P41, P35, P39, aux biomasses moyennes respectives de 0.64, 1.06, 1.08, 1.34 Pspa g pl<sup>-1</sup>, une croissance aérienne inférieure à 2012, aux biomasses aériennes moyennes comprises entre 0.64 (P37) et 18.6 (P46) Pspa g pl<sup>-1</sup>. L'année 2011 affiche les plus fortes croissances aériennes, comprises entre 4 (P19) et 20.4 (P11) Pspa g pl<sup>-1</sup>; (iii) le poids sec des parties racinaires le plus faible = 0.21 Pspr g pl<sup>-1</sup> au niveau des placettes P37, P35 (2012) et le plus fort = 1.94 Pspr g pl<sup>-1</sup> au niveau de la placette P22 (2011). Les biomasses racinaires moyennes de 2013, comprises entre 0.51 (P69) et 1.10 (P60, P63) g Psr g pl<sup>-1</sup>, sont inférieures à celles de 2012 aux biomasses racinaires moyennes comprises entre 0.21 (P35, P37) et 1.94 (P46) Pspr g pl<sup>-1</sup> et de 2011 aux biomasses racinaires légèrement supérieures à celles de 2012, comprises entre 0.67 (P19) et 1.94 g (P22) Psr g pl<sup>-1</sup>. Cependant, nous notons une très forte variabilité des erreurs standards sur l'ensemble des données.

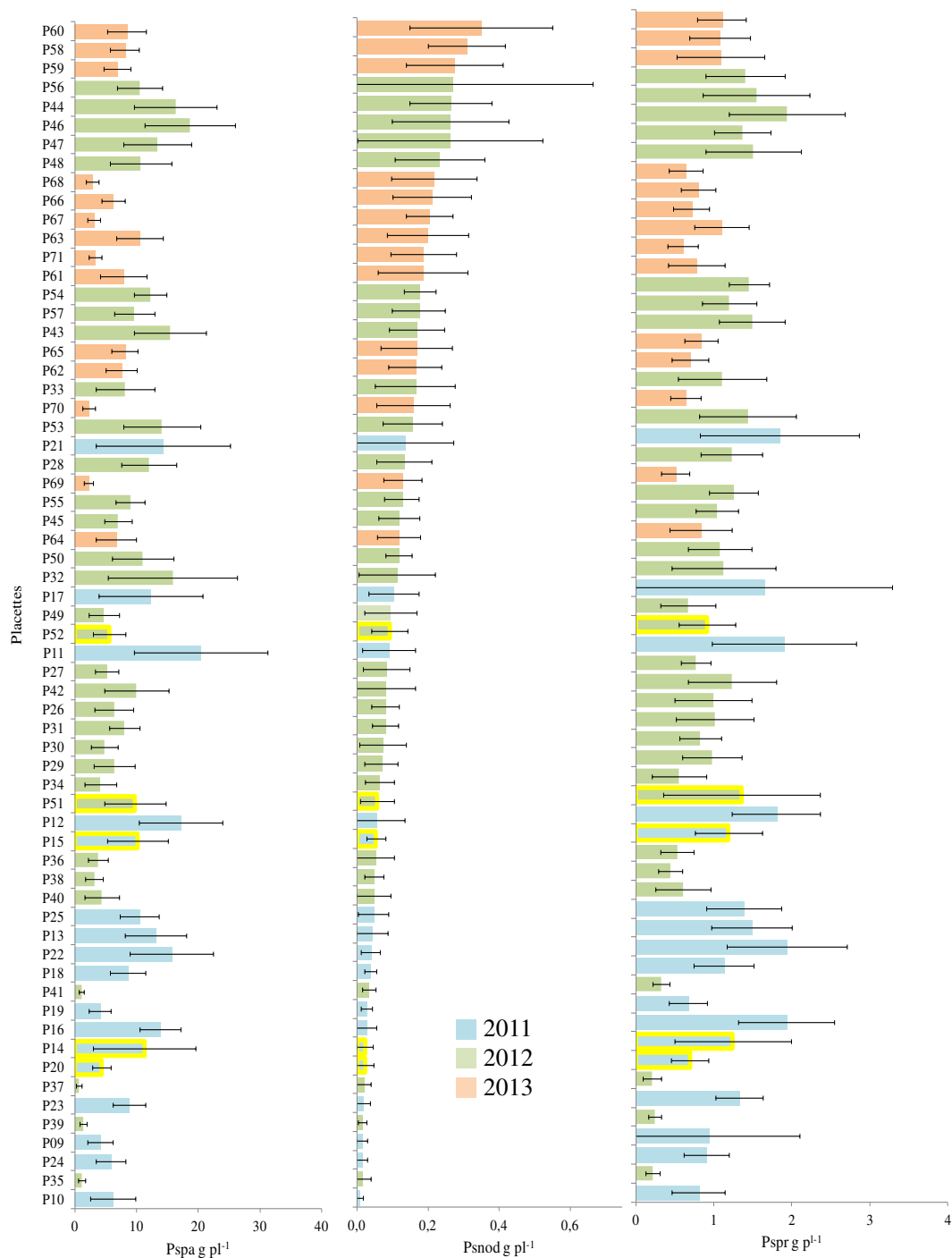


**Figure 34.** Variation des biomasses aériennes, nodulaires et racinaires, en fonction des placettes

Les histogrammes, représentant les biomasses moyennes nodulaires de plants de féverole (Psnod g pl<sup>-1</sup>), aériennes (Pspa g pl<sup>-1</sup>) et racinaires (Pspa g pl<sup>-1</sup>) sont obtenus sous Xcel, après tri des moyennes selon un ordre croissant. Le trait vertical, au sommet des barres, correspond à l'erreur standard de chacune des moyennes. L'échantillonnage, réalisé sur 3 années (2011, 2012, 2013) porte sur 63 placettes, dont : 17 placettes (P9 à P25) en 2011 (bleu), 32 placettes (P26 à P57) en 2012 (vert) et 14 placettes (P58 à P71) en 2013 (orange). Les contours jaunes des barres matérialisent des cultures associées à des céréales (orge ou blé dur).

### **II.1.2.2. Classification selon un ordre croissant des biomasses nodulaires**

Les biomasses aériennes ( $P_{spa} \text{ g pl}^{-1}$ ) et racinaires ( $P_{spr} \text{ g pl}^{-1}$ ) se raisonnent ainsi en fonction des biomasses nodulaires ( $P_{snod} \text{ g pl}^{-1}$ ). L'analyse des histogrammes classifiés selon un ordre croissant des seules valeurs de biomasses nodulaires (Figure 35) montre des hétérogénéités au niveau des biomasses aériennes et racinaires par rapport aux biomasses nodulaires. Les biomasses nodulaires peuvent être faibles pour des biomasses aériennes fortes et inversement. Les biomasses nodulaires de l'année 2011 se regroupent préférentiellement dans le premier tiers des plus faibles valeurs de biomasses moyennes. Trois des 17 placettes, (11, 17, 21) affichent des biomasses nodulaires moyennes supérieures. Les biomasses moyennes nodulaires de 2012 se répartissent sur l'ensemble de l'histogramme au sein des faibles, médianes et fortes valeurs. Les biomasses nodulaires moyennes de 2013 se situent parmi les valeurs les plus fortes.



**Figure 35.** Variation des biomasses aériennes, nodulaires et racinaires, en fonction des placettes

Les histogrammes, représentant les biomasses moyennes nodulaires de plants de féverole ( $P_{snod} \text{ g pl}^{-1}$ ), aériennes ( $P_{spa} \text{ g pl}^{-1}$ ) et racinaires ( $P_{spr} \text{ g pl}^{-1}$ ) sont obtenus sous Xcel, après tri des moyennes selon un ordre croissant des seules moyennes nodulaires ( $P_{psnod} \text{ g pl}^{-1}$ ). Le trait vertical, au sommet des barres, correspond à l'erreur standard de chacune des moyennes. L'échantillonnage, réalisé sur 3 années (2011, 2012, 2013) porte sur 63 placettes, dont : 17 placettes (P9 à P25) en 2011 (bleu), 32 placettes (P26 à P57) en 2012 (vert) et 14 placettes (P58 à P71) en 2013 (orange). Les contours jaunes des barres matérialisent des cultures associées à des céréales (orge ou blé dur).

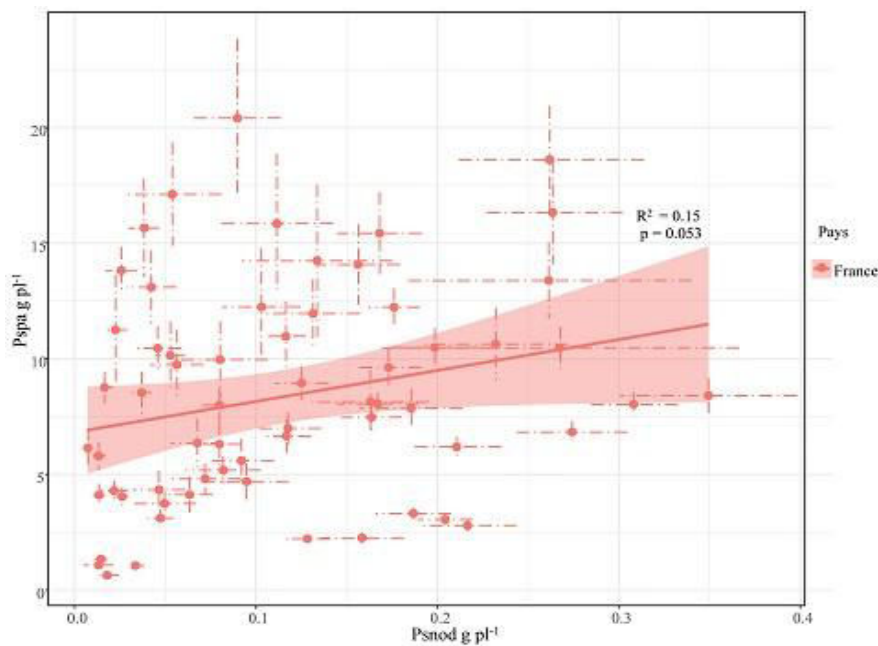


## II.2. Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne

L'Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne (EURS) est déterminée par la pente de la relation : Biomasse aérienne = f (Biomasse nodulaire). Ces corrélations sont définies en rapport à : (i) l'ensemble des 63 placettes de l'agro-écosystème Sud de France (Figure 36) ; (ii) des quatre départements : Aude, Tarn, Gers, Hérault (Figure 37) ; (iii) des années d'échantillonnages (Figure 38) ; (iv) de chacune des 63 placettes (annexe).

### II.2.1. Variation des croissances aériennes, en fonction de la nodulation

Sur l'ensemble des 63 placettes de l'agro-écosystème Sud de France la corrélation, entre la croissance aérienne et la nodulation de la féverole est globalement positive (Figure 36), avec des coefficients :  $R^2 = 0.15$  et  $p = 0.0534$ .



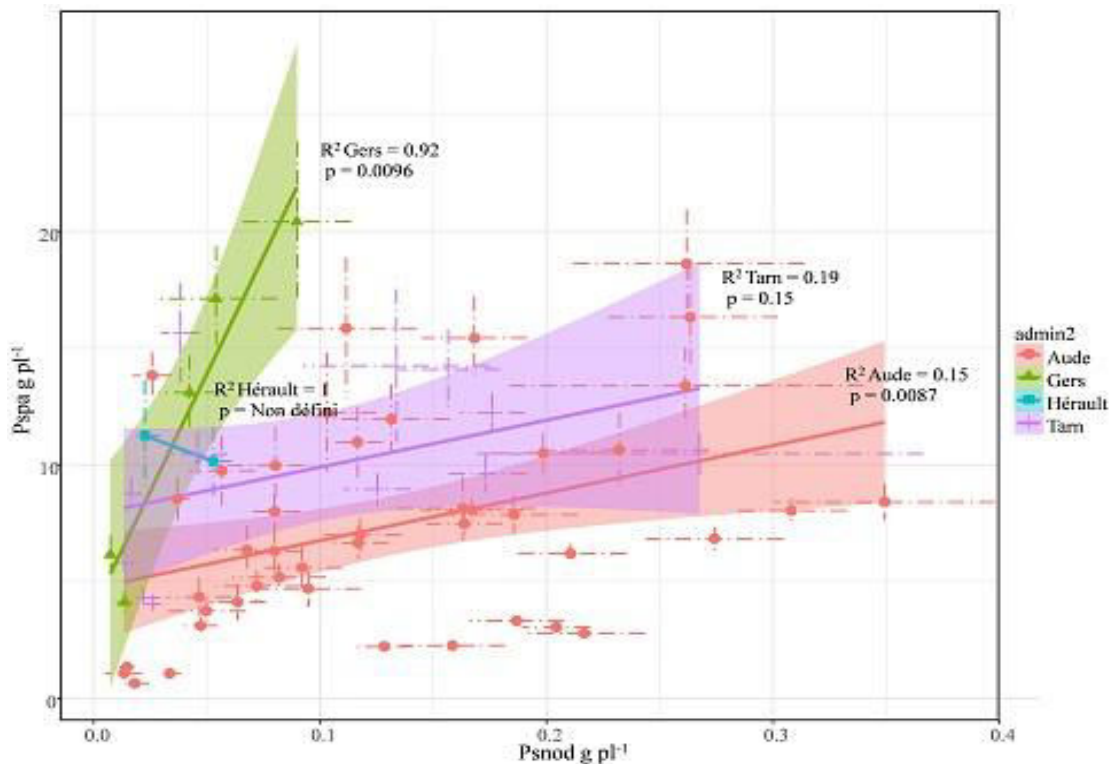
**Figure 36.** Corrélation entre croissance et nodulation de la féverole, sur l'ensemble des placettes

Traitement statistique R des données moyennes de croissance de la féverole ( $Pspa \text{ g pl}^{-1}$ ), en fonction de la nodulation ( $Psnod \text{ g pl}^{-1}$ ), au niveau des 63 placettes de l'agro-écosystème Sud de France et des années 2011, 2012, 2013. Les erreurs standards sont représentées sur la figure pour les différentes moyennes, par des traits horizontaux et verticaux.

## II.2.2. En fonction des départements

Sur l'ensemble des 63 placettes de l'agro-écosystème Sud de France la corrélation de la croissance aérienne en fonction de la nodulation de la féverole est analysée au niveau des quatre départements : Aude, Tarn, Gers et Hérault (Figure 37). Avec des valeurs (i)  $R^2 = 0.15$  et  $p = 0.0087$  dans l'Aude ; (ii)  $R^2 = 0.92$  et  $p = 0.0096$  dans le Gers ; (iii)  $R^2 = 0.19$  et  $p = 0.15$  dans le Tarn ; et (iv)  $R^2 = 1$  dans l'Hérault, justifié sur deux placettes.

Avec des coefficients  $p < 0.01$ , une corrélation significative de la croissance en fonction de la nodulation de la féverole est à noter dans l'Aude et le Gers.



**Figure 37.** Corrélation entre croissance et nodulation de la féverole, par département

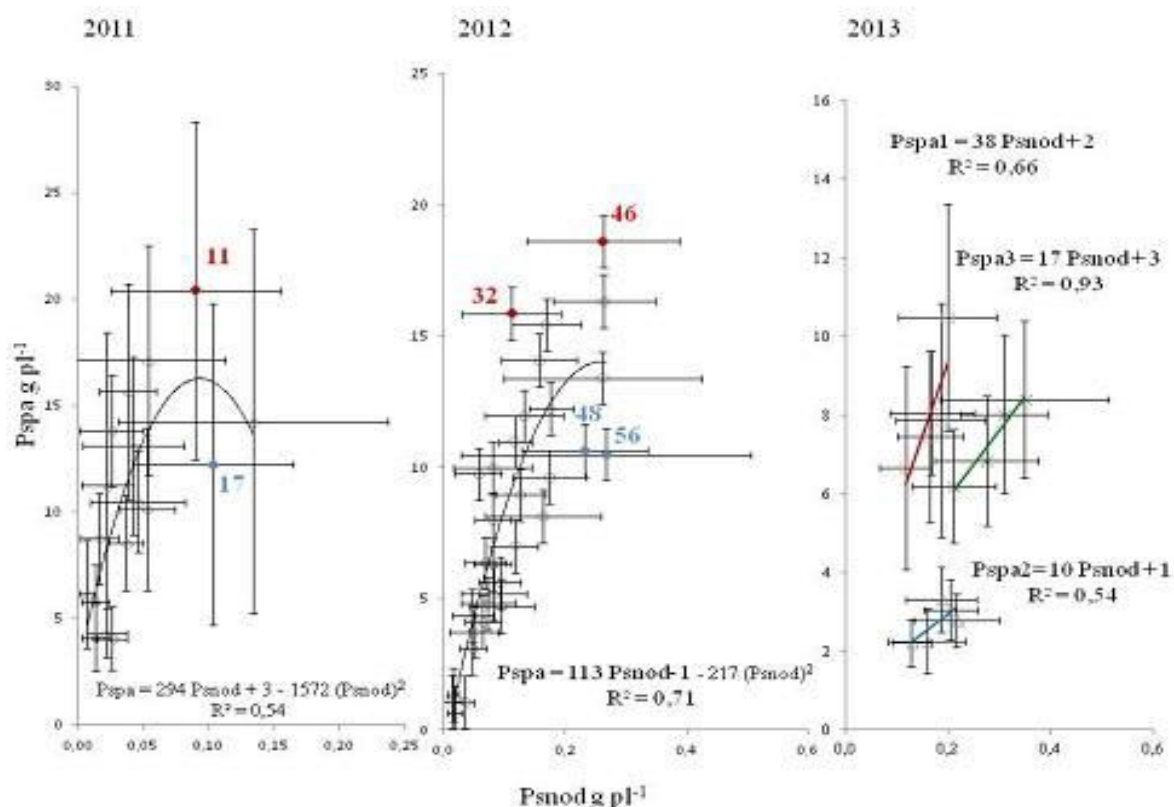
Traitement statistique R des données moyennes de croissance de la féverole ( $Pspa \text{ g pl}^{-1}$ ), en fonction de la nodulation ( $Psnod \text{ g pl}^{-1}$ ), obtenues au niveau des 63 placettes des quatre départements : Aude, Tarn, Gers et Hérault de l'agro-écosystème Sud de France et des années 2011, 2012, 2013. Les erreurs standards sont respectivement représentées par un trait horizontal et vertical pour les différentes moyennes  $Psnod$  et  $Pspa \text{ g pl}^{-1}$ .

### II.2.3. En fonction des années

Sur l'ensemble des 63 placettes de l'agro-écosystème Sud de France, la croissance aérienne et la nodulation sont positivement corrélées (Figure 38), au niveau des trois années d'échantillonnage (2011, 2012, 2013).

En 2011 et 2012, les relations curvilinéaires significatives affichent respectivement des valeurs de coefficient de détermination :  $R^2 = 0.54$  et  $0.71$ . Pour 2013, trois modèles significativement corrélés affichent respectivement des coefficients de détermination  $R^2 = 0.54$ ,  $0.66$  et  $0.93$ . Les erreurs standards des années 2011 et 2012 attestent de fortes variations des biomasses aériennes et nodulaires, chez la féverole. De plus, pour ces deux années, les placettes : 11, 32 et 46, représentées par des points rouges, affichent des biomasses aériennes moyennes supérieures à l'ensemble des placettes, alors que les placettes : 17, 48 et 56, représentées par des points bleus, affichent des biomasses aériennes moyennes, inférieures.

L'existence de relations curvilinéaires visibles pour les années 2011 et 2012 laisse penser qu'au-delà d'un certain seuil la nodulation n'a plus d'effet sur la croissance voire, serait coûteuse pour la plante. Pour la courbe  $P_{spa} = f(P_{snod})$  de la féverole des différentes placettes, il semble que le seuil se situe vers  $0.1$  et  $0.3 \text{ g P}_{snod} \text{ pl}^{-1}$ , respectivement pour 2011 et 2012 (Figure 38). Or, à l'échelle intra-placette, le seuil de nodulation apparaît beaucoup plus tôt pouvant, pour certaines placettes, atteindre des nodulations nulles accompagnées d'une faible croissance végétale (Figure 34 et Figure 35). Nous pouvons penser que d'autres facteurs biotiques ou abiotiques limitent l'efficacité de la fixation symbiotique d'azote. Certaines populations rhizobiennes de l'échantillonnage 2011 de la placette 11 sont peut-être plus efficaces que celles de la placette 17, tout comme pour 2012 où, par rapport aux placettes 48 et 56, les placettes 32 et 46 peuvent héberger des rhizobia plus efficaces. Les composantes physico-chimiques telluriques, associées à divers facteurs environnementaux, climatiques et culturels peuvent également affecter la nodulation et avoir un impact sur le développement et la production végétale. Certaines placettes telles que les placettes : 19, 35, 37, 38, 41 affichent de fortes corrélations nodulation/croissance, alors que la croissance végétale sur d'autres placette, telles que 21, ne sont pas impactées par la nodulation (Figure 34 et Figure 35). Dans ce cas (i) les rhizobia ainsi que l'association symbiotique peuvent être très efficaces pour la FSN et/ou (ii) les composantes telluriques, notamment minérales (N, P), sont favorables à la croissance végétale, sans association symbiotique, énergétiquement coûteuse pour la légumineuse associée.



**Figure 38.** Corrélation entre croissance et nodulation de la féverole, en fonction des années

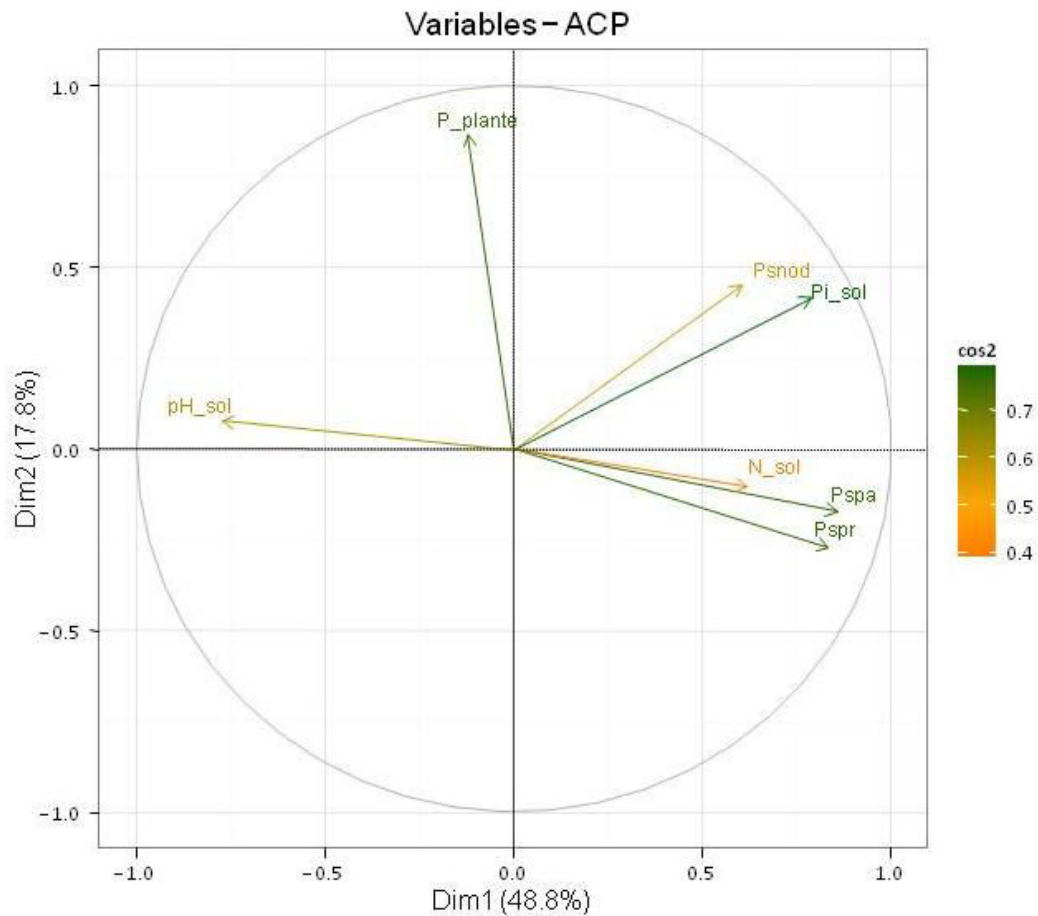
Traitement statistique Xcel des données moyennes de croissance de la féverole ( $P_{spa} \text{ g pl}^{-1}$ ), en fonction de la nodulation ( $P_{snod} \text{ g pl}^{-1}$ ), au niveau des 63 placettes de l'agro-écosystème Sud de France et en fonction des années (2011, 2012, 2013). Les erreurs standards des différentes moyennes  $P_{snod}$  et  $P_{spa} \text{ g pl}^{-1}$  sont respectivement représentées par un trait horizontal et vertical. Une regression polynomiale de type 2 est appliquée pour les années 2011 et 2012, alors qu'une régression linéaire est appliquée pour 2013. L'échantillonnage porte sur 10 à 20 plants par placette.

## **II.3. Analyse des relations entre variables des plantes et variables du sol**

La capacité d'une légumineuse à fixer l'azote et la disponibilité des éléments nutritifs du sol, sont deux facteurs étroitement liés. Dans le sol, les rhizobia et la plante hôte disposent d'éléments nutritifs nécessaires à l'initiation et au maintien de l'activité symbiotique permettant la fixation d'azote. Une déficience en éléments nutritifs peut affecter le développement de la plante, des rhizobia et l'activité symbiotique, et par conséquent impacter la fixation d'azote. Khan et Yoshida (1994) montrent une grande variabilité de fixation d'azote chez l'arachide (*Arachis hypogea*), en fonction des variations des teneurs en éléments nutritifs du sol. Le phosphore améliore la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses, en augmentant la nodulation et l'activité de la symbiose (Tang et al., 2001). L'activité fixatrice des nodules est dépendante du phosphore (Ribet et Drevon, 1996).

### **II.3.1. Analyse exploratoire par ACP**

Pour effectuer une analyse exploratoire des relations possibles entre variables du sol et variables de nodulation et de croissance (aérienne et racinaire) de la plante, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) afin d'obtenir une projection de variables sur le plan factoriel 1x2 (Figure 39). Les variables physico-chimiques des sols prises en compte ont été la teneur en P inorganique disponible ( $P_i$  Olsen en  $\text{mg kg}^{-1}$ ), la teneur en azote du sol ( $N_{\text{sol}}$  en  $\text{g. 100 g}^{-1}$ ) et le pH. Au niveau de la plante, ont été prises en compte les variables de nodulation ( $P_{\text{snod}}$   $\text{g pl}^{-1}$ ), de croissance aérienne ( $P_{\text{spa}}$   $\text{g pl}^{-1}$ ) et racinaire ( $P_{\text{spr}}$   $\text{g pl}^{-1}$ ), ainsi que la teneur en phosphore des parties aériennes de la plante ( $P_{\text{plante}}$   $\text{mg g pl}^{-1}$ ). Les individus analysés correspondent à 29 placettes en 2011 et 2012 (sur les 63 placettes étudiées) pour lesquelles nous disposons de données complètes pour toutes les variables retenues.



**Figure 39.** Analyse en composante principale (ACP) *V. faba*/sol de l'agroécosystème Sud de France

Représentation de 7 variables *V. faba*/sol de l'agroécosystème Sud de France sur le plan factoriel 1x2 comprenant 4 variables Féverole (i) biomasse aérienne (Pspa g pl<sup>-1</sup>); (ii) biomasse nodulaire (Psnod g pl<sup>-1</sup>); (iii) biomasse racinaire (Pspr g pl<sup>-1</sup>); (iv) P plante (P mg g pl<sup>-1</sup>) et 3 variables physico-chimiques des sols; (ii) Pi sol Olsen (Pi mg kg<sup>-1</sup>); (ii) N sol (g. 100 g<sup>-1</sup>) et (iii) pH sol. Les individus pris en compte dans l'ACP correspondent à 29 placettes (parmi les 63 placettes étudiées au total) qui ont été échantillonnées au cours des années 2011 et 2012 et pour lesquelles nous disposons de données complètes pour les 7 variables prises en compte dans l'ACP.

### **II.3.1.1. Qualité de la représentation des variables sur le plan factoriel 1x 2 de l'ACP**

La qualité globale de la représentation des variables sur le plan factoriel est mesurée par le pourcentage du nuage initial projeté sur ce plan factoriel, soit ici, pour le plan factoriel 1x2, environ 67 % (48.8% pour l'axe 1 et 17.8% pour l'axe 2). Ce pourcentage signifie que 67 % de la variabilité des données est exprimée sur le plan factoriel principal 1x2.

### **II.3.1.2. Corrélation entre variables sur le plan factoriel 1x2 de l'ACP**

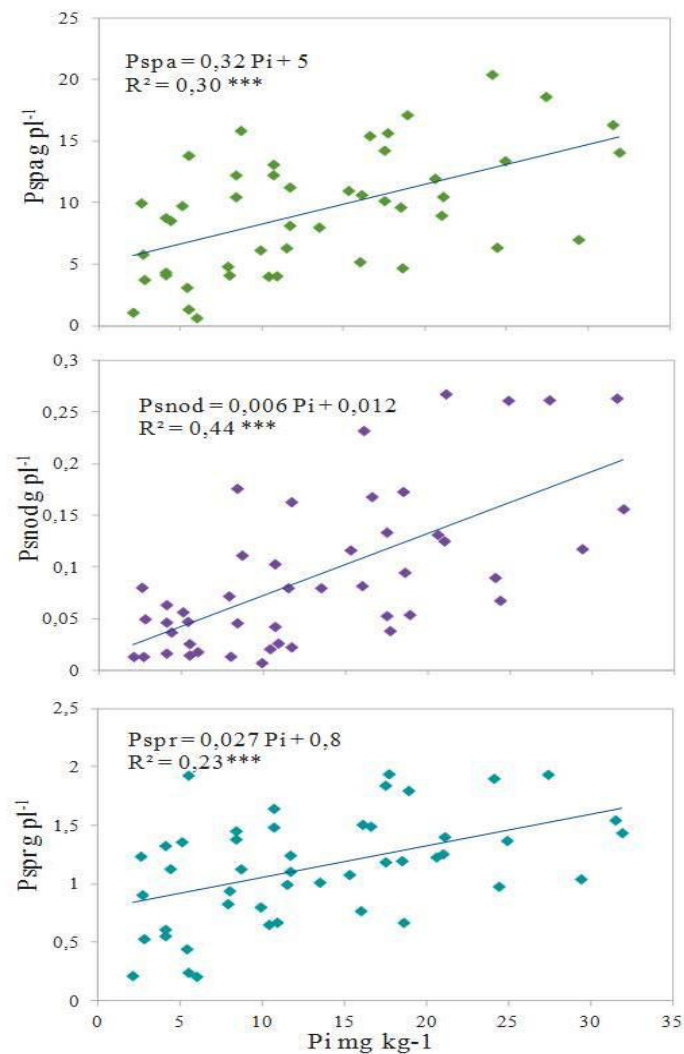
La Figure 39 montre que la plupart des variables étudiées sont correctement corrélées au plan factoriel 1x2 (pointe des flèches relativement proche du cercle des corrélations, avec  $\cos^2 > 0.5$ ). La variable N sol ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) est la moins bien représentée sur ce plan factoriel ( $\cos^2 = 0.4$ ). L'axe factoriel 1 est principalement constitué de toutes les variables sauf la teneur en P de la plante ( $\text{P plante mg g pl}^{-1}$ ), qui pour sa part est la principale variable contribuant à l'axe 2. Les variables biomasse sèche aérienne ( $\text{Pspa g pl}^{-1}$ ), racinaires ( $\text{Pspr g pl}^{-1}$ ), et N sol ( $\text{N g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) sont corrélées positivement entre elles. La biomasse sèche nodulaire ( $\text{Psnod g pl}^{-1}$ ) et le Pi Olsen du sol ( $\text{Pi sol mg kg}^{-1}$ ) qui correspond au P assimilable ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) du sol sont également corrélés positivement. Ces deux variables ( $\text{Psnod g pl}^{-1}$  et  $\text{Pi sol mg kg}^{-1}$ ), ainsi que la teneur en N du sol ( $\text{N sol g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) sont inversement corrélées au pH du sol qui dépend de la teneur en carbonate des sols étudiés. Par contre, la teneur en P de la plante ( $\text{P plante mg g pl}^{-1}$ ) n'apparaît pas fortement corrélée avec les autres variables.

### **II.3.2. analyse statistique des relations entre les biomasses nodulaire, aérienne, racinaire et le phosphore du sol et des plantes**

Afin de préciser l'analyse exploratoire, nous avons réalisé des analyses statistiques entre les biomasses aériennes ( $\text{Pspa g pl}^{-1}$ ), nodulaires ( $\text{Psnod g pl}^{-1}$ ) et racinaires ( $\text{Pspr g pl}^{-1}$ ), en fonction du phosphore du sol et des plantes. Ces analyses correspondent à 46 placettes (parmi les 63 étudiées au total) échantillonnées, au cours des années 2011 et 2012.

### II.3.2.1. Relation entre les biomasses aériennes, nodulaires et racinaires et la teneur en P inorganique du sol disponible

Les coefficients de détermination  $R^2 = 0.30$  \*\*\*,  $R^2 = 0.44$ \*\*\*,  $R^2 = 0.23$ \*\*\*, respectivement obtenus pour les 47 placettes, pour les relations entre le phosphore inorganique disponible du sol ( $P_i$  Olsen  $\text{mg kg}^{-1}$ ) et les biomasses (Figure 40), aériennes ( $P_{spa}$   $\text{g pl}^{-1}$ ), nodulaires ( $P_{snod}$   $\text{g pl}^{-1}$ ) et racinaires ( $P_{spr}$   $\text{g pl}^{-1}$ ) montrent des corrélations linéaires significatives, pour les années 2011 et 2012 considérées (Figure 40). Ceci est cohérent avec les résultats obtenus lors de l'analyse exploratoire effectuée par l'ACP.



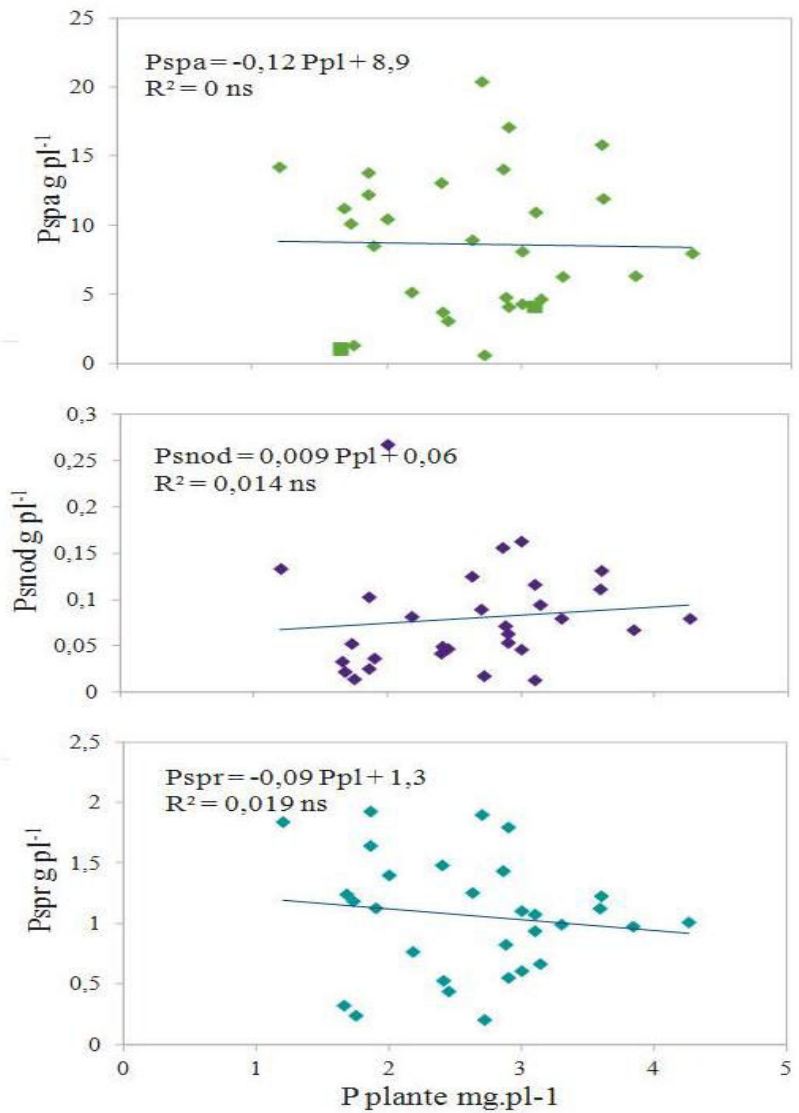
**Figure 40.** Régressions linéaires entre le P inorganique disponible du sol et les biomasses aériennes, nodulaires et racinaires

Traitement statistique des données moyennes de biomasse aérienne ( $P_{spa}$   $\text{g pl}^{-1}$ ), vert ; biomasse nodulaire ( $P_{snod}$   $\text{g pl}^{-1}$ ), violet et biomasse racinaire ( $P_{spr}$   $\text{g pl}^{-1}$ ), bleu en fonction du P inorganique du sol ( $\text{mg Pi kg}^{-1}$ ), au niveau de 31 placettes de l'agro-écosystème Sud de France, pour les années 2011 et 2012.



### II.3.2.2. Relation entre les biomasses nodulaires, aériennes et racinaires et la teneur en P de la partie aérienne de la plante

Les coefficients de détermination  $R^2 = 0.014$  (ns),  $R^2 = 0.000$  (ns) et  $R^2 = 0.019$  (ns), respectivement obtenus pour les relations entre le phosphore de la plante ( $P \text{ mg pl}^{-1}$ ) et les biomasses aériennes ( $P_{\text{spa}} \text{ g pl}^{-1}$ ), nodulaires ( $P_{\text{snod}} \text{ g pl}^{-1}$ ) et racinaires ( $P_{\text{spr}} \text{ g pl}^{-1}$ ) montrent l'absence de corrélation significative, pour les années 2011 et 2012 considérées (Figure 41). Ceci est cohérent avec les résultats obtenus lors de l'analyse exploratoire effectuée par l'ACP.



**Figure 41.** Régressions linéaires entre la teneur en P de la partie aérienne de féverole et les biomasses aériennes, nodulaires et racinaires

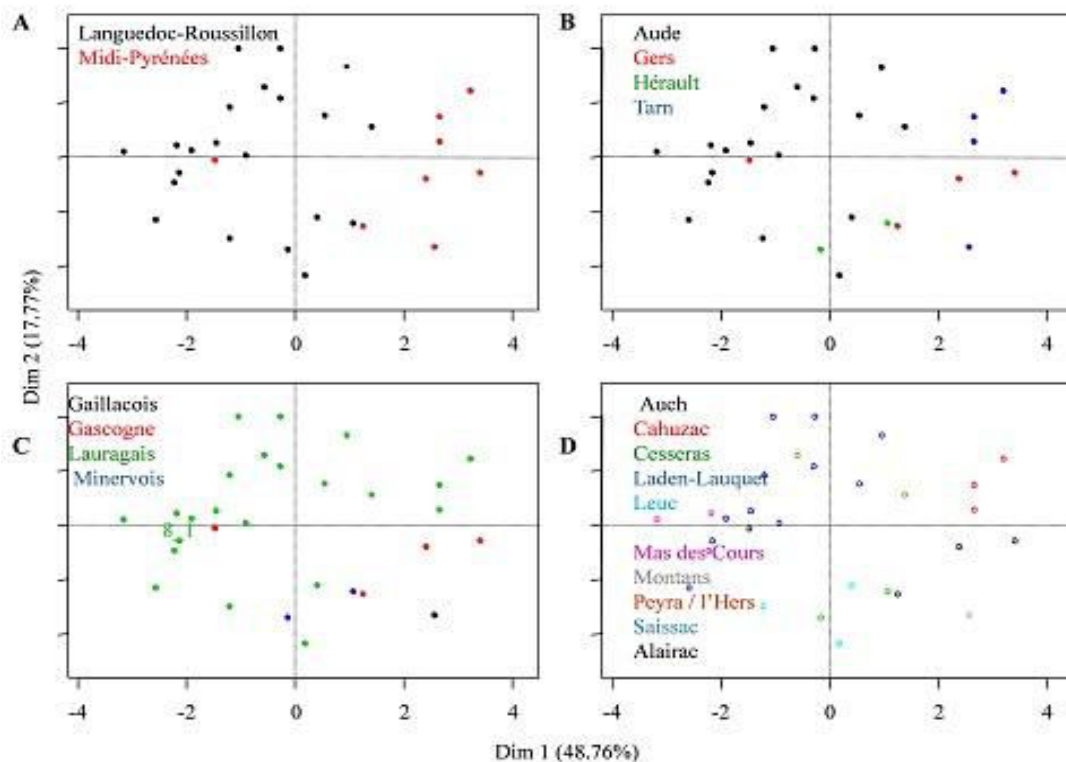
Traitement statistique des données moyennes de biomasse aérienne ( $P_{\text{spa}} \text{ g pl}^{-1}$ ), vert ; biomasse nodulaire ( $P_{\text{snod}} \text{ g pl}^{-1}$ ), violet et biomasse racinaire ( $P_{\text{spr}} \text{ g pl}^{-1}$ ), bleu en fonction du P accumulé dans la plante ( $\text{mg P pl}^{-1}$ ), au niveau de 31 placettes de l'agro-écosystème Sud de France, pour les années 2011 et 2012.

## II.4. Analyse des 29 placettes ayant fait l'objet d'une l'ACP

### II.4.1 Analyse exploratoire par projection des individus (placettes) sur le plan factoriel 1x2 de l'ACP

La Figure 42 montre la façon dont se répartissent les 29 placettes considérées dans l'ACP sur le plan factoriel 1 x 2. Cette répartition n'est pas aléatoire et les placettes s'agrègent vis-à-vis des variables sol et plante étudiées, selon la situation géographique. Ceci s'observe nettement lorsque l'on compare les données par région (Figure 42A). En effet, la Figure 42A montre que les placettes du Languedoc-Roussillon s'opposent le long de l'axe 1 à celles de la sous-région Midi Pyrénées.

D'après la Figure 39 (projection des variables sur le plan factoriel 1x2 de l'ACP), cette distinction entre régions porte sur le pH et - en sens inverse au pH - sur les données Pi Olsen du sol, Psnod, Pspa (et Pspr).



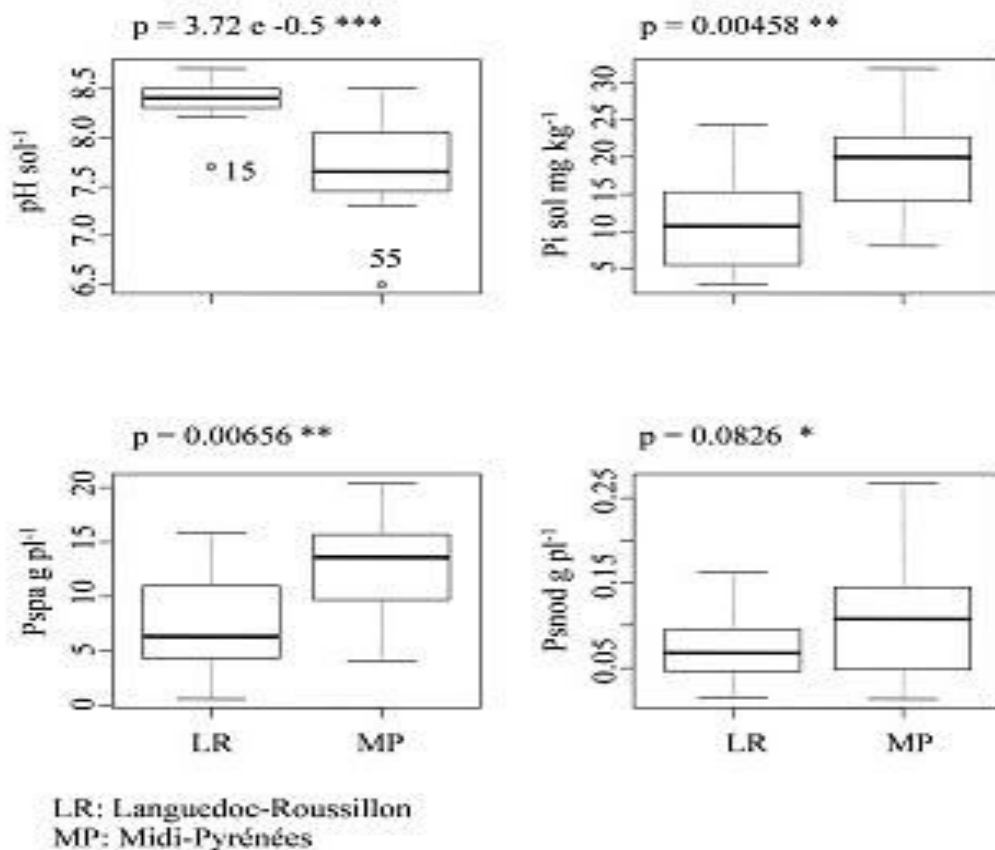
**Figure 42.** Projection des individus (29 placettes) sur le plan factoriel 1x2

Les couleurs sont réparties, selon Sous-région (A), Département (B), Région naturelle (C) et Lieux dits (D). A : noire (Languedoc-Roussillon), rouge (Midi Pyrénées) ; B : noire (Aude), bleue (Tarn), verte (Hérault), rouge (Gers) ; C : noire (Gaillacois), rouge (Gascogne), bleue (Minervois), verte (Lauragais) ; D : noire (Auch), rouge (Cahuzac), bleue (Lader-Lauquet), verte (Cesserois), rose (Mas des Cours), bleu ciel (Leuc), gris (Montans).

## II.4.2 Comparaisons de moyennes selon les régions pour les placettes étudiées par ACP

L'analyse des 29 placettes à l'aide de l'ACP se confirme bien par les comparaisons de moyennes présentées en Figure 43, On observe en effet, pour les 29 placettes étudiées, un pH du sol en moyenne significativement plus élevé en Languedoc-Roussillon qu'en Midi-Pyrénées, mais aussi des valeurs moyennes de Pi Olsen, et de Maer significativement plus faibles, et une tendance à des nodulations plus faibles en Languedoc-Roussillon.

Une des interprétations que l'on peut faire de ceci est que (i) le pH est globalement plus élevé sur les placettes étudiées en Languedoc-Roussillon en raison de sols plus calcaires et que (ii) ce calcaire complexe une partie du Phosphore assimilable du sol (Pi Olsen), ce qui (iii) réduit la disponibilité du P et finalement (iv) réduit la nodulation et la croissance nodulaire de la plante.



**Figure 43.** Comparaison statistique de moyennes de données sur les placettes en fonction de sous-régions Occitanie

Comparaison de moyennes obtenues entre les deux sous-régions Occitanie (Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées) pour les variables s'exprimant sur l'axe 1 de l'ACP (données sur 29 placettes).

## II.5. Discussion

Le diagnostic nodulaire, réalisé en agro-écosystème Sud de France durant les années : 2011, 2012, 2013, met en évidence la présence de rhizobia natifs locaux aptes à noduler la féverole, sur l'ensemble des 63 placettes échantillonnées. Une variabilité de nodulation et de croissances (aérienne et racinaire) de la féverole est à noter sur l'ensemble des 63 placettes, au niveau intra- et inter-placettaire et en fonction des années et du stade phénologique d'échantillonnage. Une nodulation relativement plus faible au stade post-floral, début de formation de gousses est notable en 2011, par rapport au stade floraison de 2012 et 2013. Une variabilité spécifique d'efficacité de la symbiose rhizobienne se traduit par une variabilité d'effectivité (biomasse aérienne) et d'infectivité (biomasse nodulaire) intra-placettes. Les critères généralement considérés comme déterminants dans la sélection des bactéries symbiotiques portent sur (i) les relations de la bactérie avec la plante (compatibilité) ou avec le sol (adaptation), ainsi que (ii) la compétition des bactéries vis-à-vis des souches locales (compétitivité). La compatibilité des souches par rapport à la plante hôte est définie en fonction de l'infectivité et de l'effectivité, variables en fonction du génotype bactérien mais également végétal. Certaines souches rhizobiennes peuvent être infectives et non effectives mais seules sont dites compatibles les souches à la fois infectives et effectives. Des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (*Rlv*), natives des sols français et présentes à des densités de l'ordre de  $10^3$  à  $10^5$  bactéries par g de sol sont aptes à noduler spontanément la féverole (Depret, 2008). Ces souches de *Rlv* peuvent survivre durant plusieurs années dans les sols, en l'absence de plante hôte. Les rhizobia, en tant que PGPR, peuvent également cohabiter dans la rhizosphère de céréales telles que le blé, le maïs, l'orge (Hilali et al., 2001; Riggs et al., 2001; Schmalenberger and Tebbe, 2003). Une forte variabilité d'infectivité et d'effectivité de populations rhizobiennes natives de sols du sud de la France est observée chez le pois chiche et le haricot (Drevon et al., 2015). L'échantillonnage post-floraison, peut expliquer des biomasses nodulaires inférieures en 2011, par rapport à 2012 et 2013 en lien à un impact du stade phénologique de la plante sur la nodulation. En effet, l'activité fixatrice à floraison est considérée comme optimale avant déclin post-floral en lien à une remobilisation des assimilats vers la graine, au détriment du nodule (Kyei-Boahen et al., 2002). Ce stade phénologique correspond à une fin de période végétative où il est admis que se fait l'essentiel d'acquisition de P.

Malgré une variabilité d'efficacité spécifique intra-placettes (Annexe 2), une efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) s'observe statistiquement par une corrélation globale significative entre croissance et nodulation des plants. Les corrélations significatives entre la croissance et la nodulation de la féverole, au niveau des 63 placettes, montrent que la biomasse sèche aérienne dépend essentiellement de la nodulation. La pente de régression constitue donc un indicateur d'EUSR pour la nutrition azotée de la féverole. Rupela et Dart dans Drevon et Sifi (2003), montrent l'existence d'une corrélation significative entre l'augmentation des biomasses sèches aériennes et des nodules. Une corrélation significative entre la croissance du haricot et sa nodulation est également montrée en Lauragais (Drevon and Sifi, 2003; Drevon et al., 2015).

La variabilité spatiale de nodulation et de croissance, au niveau intra- et inter-placettes de l'agro-écosystème, prouve qu'il est difficile de bâtir un modèle ou de tirer des conclusions en observant la nodulation sur une seule placette. Chaque placette possède des spécificités propres qui influent sur la nodulation des légumineuses. Le sol, la physico-chimie, la géomorphie, les précédents culturaux, l'environnement, le climat, la plante, les microorganismes sont autant de facteurs édapho-climatiques, microbiologiques et physiologiques qui influent sur les interactions rhizobium-légumineuse.

Un diagnostic nodulaire se doit donc d'être bâti sur plusieurs années de campagnes de terrain et au niveau multi-localisé, sur plusieurs placettes. Les recherches conduites sur les diagnostics et observations doivent être répétées et poursuivies, avec un respect de normes strictes d'échantillonnage et des stades phénologiques de la plante, afin de construire une image représentative des atouts et contraintes de la culture des légumineuses.

Un autre aspect primordial de ce type de travail, réside dans la recherche alliée des chercheurs et des producteurs. Ce travail commun participatif permet de juger, en condition réelle de production, la valeur d'un résultat scientifique. Il semble fondamental de connaître les avis, les contraintes et propositions des producteurs, afin de fournir les outils les plus efficaces et les plus proches de leurs attentes.

## **II.6. Isolement et caractérisation des rhizobia associés à *V. faba***

### **II.6.1. Collection des isolats bactériens**

Nous avons isolé 59 souches bactériennes à partir de 100 broyats de nodules racinaires de féverole, conservés à -80°C en glycérol 30 %. Les nodules proviennent de l'échantillonnage de l'année 2011, réalisé sur féverole au stade de floraison-début gousses, en agroécosystème Sud de France.

Un premier criblage, basé sur l'observation du temps de génération de ces isolats bactériens sur milieu YEMA, nous a permis de visualiser des souches à croissance plus ou moins rapide, généralement capables de se développer en 24 h. Ces isolats bactériens sont disponibles en collection au LSTM, pour des études génotypiques et phénotypiques ultérieures, ainsi que pour la préparation d'inoculants.

### **II.6.2. Diversité fonctionnelle des isolats bactériens**

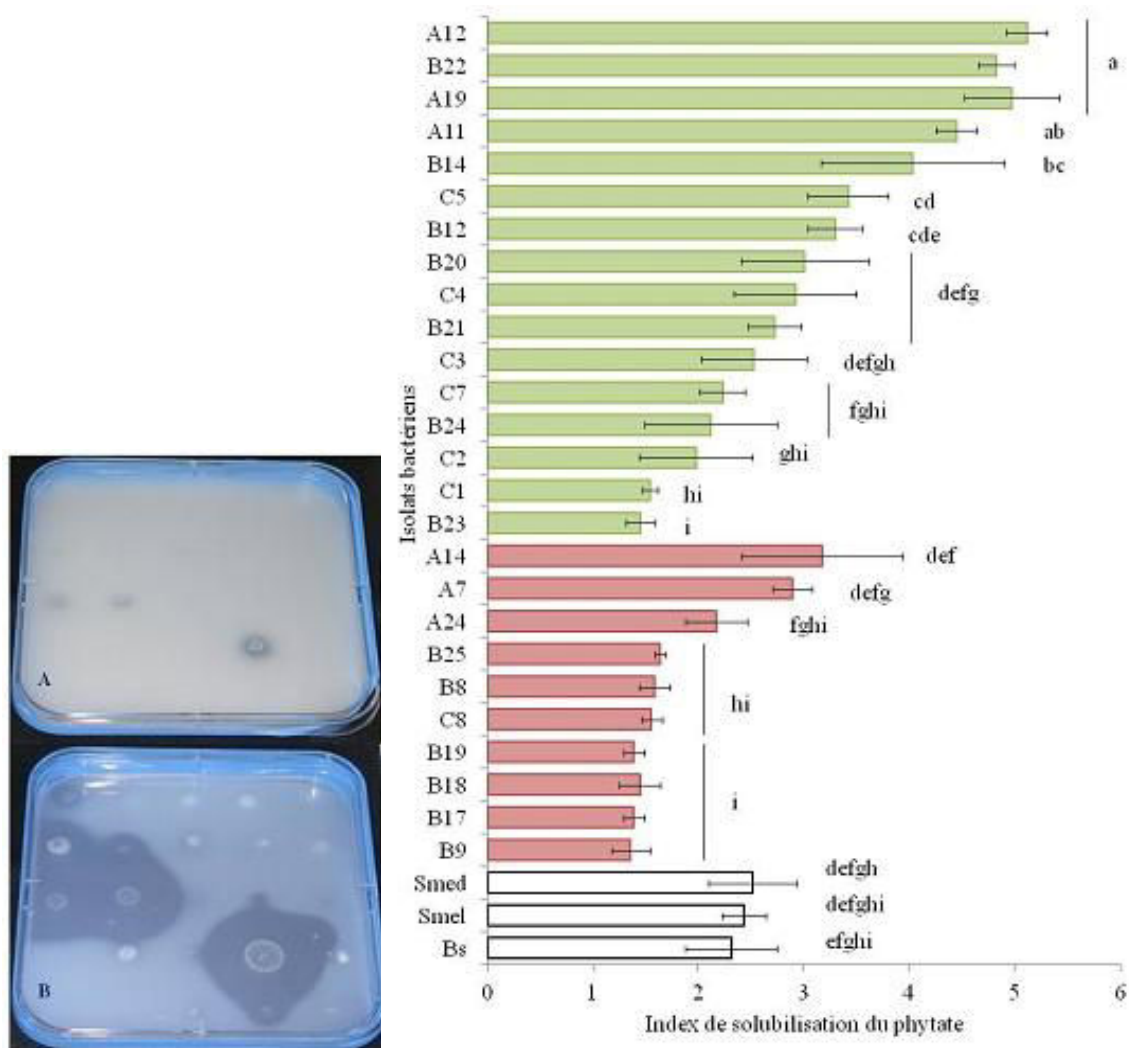
La diversité fonctionnelle des isolats de nodules de féverole est évaluée sur leur capacité à minéraliser le phosphore organique de forme phytate après criblage sur milieu phytate solide. Certaines bactéries ont la propriété de minéraliser et solubiliser les deux types de phosphore : organique (Po) et minéral (Pi). Nous avons donc parallèlement testé l'aptitude des isolats bactériens à minéraliser le phytate (Po) et à solubiliser le phosphore minéral de type Tri-Calcium Phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Pi) qui se traduit par la formation d'un halo sur milieux solides de culture. Le rapport du diamètre total du halo sur le diamètre de la colonie définit l'indice de minéralisation (ISM) du Po et de solubilisation (ISM) du Pi (Premono et al., 1996), respectivement. Les souches capables de minéraliser le phytate sont définies en tant que Phy+ et celles capables de solubiliser le TCP en tant que TCP+. L'ensemble des souches minéralisatrices de phytate (Phy+TCP+, Phy+TCP-) sont testées sur la plante hôte, en culture hydroaéroponique, afin de déterminer leur capacité de nodulation et de définir leur EUSR (Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne), ainsi que leur EUP/FSN (Efficacité d'Utilisation du P/Fixation Symbiotique d'Azote) en conditions suffisantes ou déficientes en P. Les souches nodulant efficacement la féverole et minéralisatrices strictes de phytate (Phy+TCP-) sont inoculées sur milieu phytate liquide afin d'évaluer : (i) la cinétique de

croissance bactérienne ; (ii) la libération de Pi ; (iii) le changement du pH du milieu de culture.

#### **II.6.2.1. Minéralisation du phytate et/ou solubilisation du TCP sur milieu solide**

Parmi les 59 isolats de nodules racinaires de féverole, 26 sont capables de produire un halo sur milieu phytate solide (non montré). Parmi ces derniers, 16 sont également aptes à produire un halo sur milieu Tri-Calcium Phosphate (TCP). Ainsi, parmi les 26 isolats capables de solubiliser le phytate, sont identifiés : 16 TCP+ et 10 TCP- (Figure 44) avec des moyennes d'indice de solubilisation du phytate (ISP) des 26 isolats de féveroles variant entre 1,4 et 5,1 pour A12 (Phy+ TCP+) et B9 (Phy+ TCP-), respectivement. L'ISP des trois souches Phy+ de référence : Smed, Smel et Bs est d'environ 2,5. Aucun halo n'est observé avec la souche de référence Rlv 3841.

En fonction de leur ISP, les isolats peuvent être classés en trois catégories : (i) quatre isolats Phy+ TCP+ (A12, B22, A19, A11) d'un ISP variant entre 4,4 et 5,1 ; (ii) dix isolats Phy+ TCP+ (B14, B12, B20, C4, B21, C3, C5, C7, B24, C2) et trois isolats Phy+ TCP- (A14, A7, A24) d'un ISP variant de 1,9 à 4,0 ; (iii) deux isolats Phy+ TCP+ (C1, B23) et sept Phy<sup>+</sup> TCP<sup>-</sup> (B25, B8, C8, B18, B19, B17, B9) d'un ISP variant de 1,3 à 1,6.



**Figure 44.** Minéralisation du Phytate et solubilisation du Tri-Calcium Phosphate des isolats bactériens de féverole, sur milieu solide

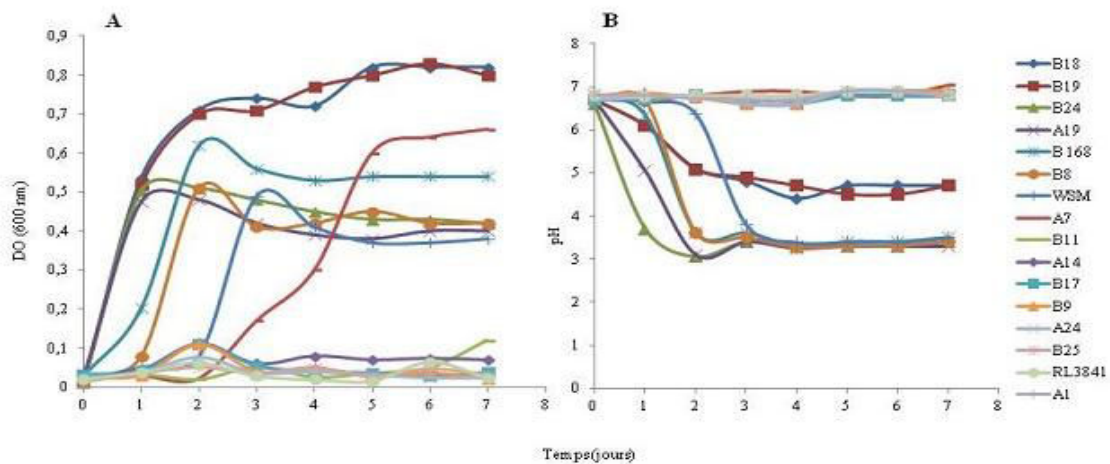
Solubilisation et minéralisation du Tri-Calcium Phosphate (A) et de phytate (B), sur milieu solide. L'histogramme, sous forme de barres, représente les isolats aptes à (i) minéraliser le phytate, Phy+ (rose) ; (ii) minéraliser le phytate (Phy) et solubiliser le Tri-Calcium Phosphate (TCP), Phy+ TCP+ (vert). Les barres blanches correspondent aux souches de références : *S. medicae* WSM419 (Smed), *S. meliloti* 2011 (Smel) et *B. subtilis* 168 (Bs). Les données correspondent à des moyennes de 3 réplicats  $\pm$  erreur standard, représentée par un trait vertical, au dessus des barres. Les lettres identiques au dessus des traits indiquent des valeurs moyennes significativement semblables, selon le test de Newman-Keuls à  $p = 0.05$ .



## II.6.2.2. Croissance sur milieu phytate liquide

### II.6.2.2.1. Cinétique de croissance

Afin de vérifier l'aptitude des isolats formant un halo sur milieu phytate gélosé à utiliser le phytate comme source de P pour leur croissance, les 10 isolats Phy+ TCP- (A14, A7, A24, B25, B8, C8, B19, B18, B17 et B9) sont testés sur milieu phytate liquide. Trois souches Phy+ de référence, sont incluses : Bs (*B. subtilis* 168), Rlv (*R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841) et Smed (*S. medicae* WSM419), ainsi que deux isolats Phy+TCP+ (A19, B24) du genre *Serratia* parmi lequel la littérature rapporte la présence de gènes phytases. Deux isolats Phy-TCP- (B11, A1) ont été ajoutés en tant que témoins négatifs. Chaque isolat se caractérise par une cinétique de croissance (Figure 45) permettant de mesurer : (i) la durée de la phase de latence (LAG), avant croissance exponentielle (Figure 45A) ; (ii) l'évolution de pH durant la croissance (Figure 45B) et (iii) le Pi libéré, en phase stationnaire de culture (Figure 46). Les isolats bactériens capables de minéraliser le phytate en milieu liquide, dont quatre des 10 isolats bactériens Phy+TCP- A7, B8, B19, B18, les deux isolats Phy+ TCP+ A19, B24, ainsi que les souches de références : Bs, Smed, Smel (autre test) ont été prises en compte pour la suite de l'étude (Figure 46).

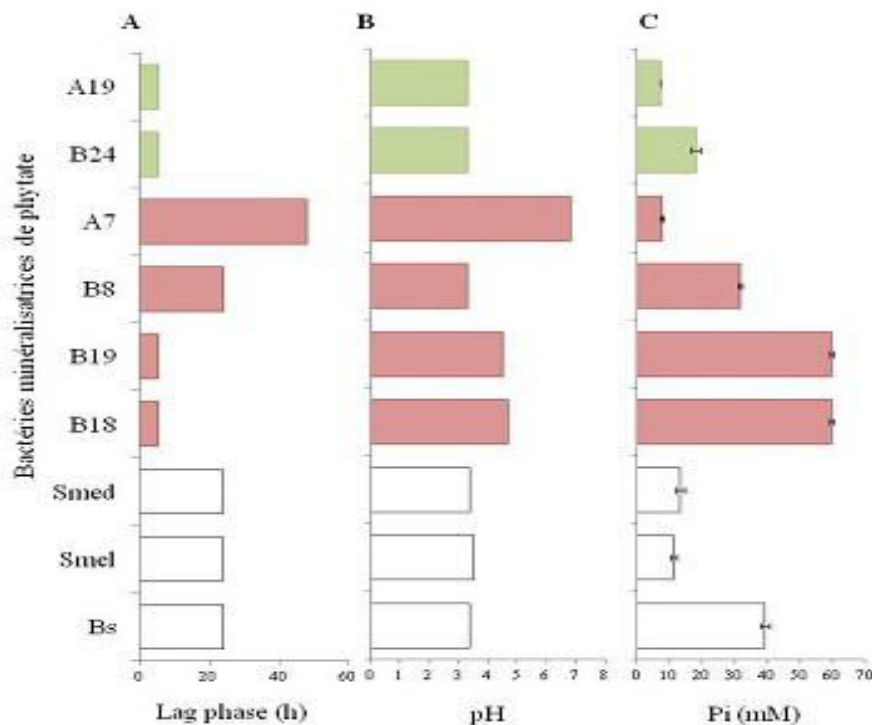


**Figure 45.** Cinétique de croissance et de pH de cultures liquides de bactéries minéralisatrices de phytate

Cinétique de croissance (A) et de pH (B) obtenues en milieu phytate liquide sur (i) 9 isolats Phy+TCP- (B18, B19, B8, A7, A14, B17, B9, A24, B25) ; (ii) deux isolats Phy+TCP+ (A19, B24) ; (iii) deux isolats Phy-TCP- (B11, A1) et ; (iv) trois souches de références *S. medicae* WSM419 (WSM), *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (R13841) et *B. subtilis* 168 (B168).

### II.6.2.2.2. Phase de latence, pH et Pi

Les données de la Figure 46 montrent que la durée de la phase de latence (A) varie de 3 h pour A19, B24 (Phy+TCP+) et B18, B19 (Phy+TCP-) à 48 h pour A7. Pour B8, la phase de latence dure 24 h comme pour Smed et Bs. La valeur du pH du milieu de culture (B) décroît avec le temps de 7 à 5 pour B18 et B19 (Phy+TCP-) et jusqu'à 3 pour B8 (Phy+TCP-), A19, B24 (Phy+TCP+) et pour Bs et Smed alors qu'aucun changement de pH n'est observé pour A7. La concentration finale de Pi à l'état stationnaire (C) est de 60  $\mu\text{M}$  pour B19, B18 ; 40  $\mu\text{M}$  pour Bs ; 30  $\mu\text{M}$  pour B8 ; 15  $\mu\text{M}$  pour Smed ; 10  $\mu\text{M}$  pour A7.



**Figure 46.** Croissance des bactéries minéralisatrices de phytate, en milieu liquide

Les histogrammes, sous forme de barres, correspondent à 6 isolats aptes à (i) minéraliser le phytate, Phy+ (rose) ; (ii) minéraliser le phytate et solubiliser le TCP, Phy+ TCP+ (vert). Les barres blanches correspondent aux trois souches de références : *S. medicae* WSM419 (Smed), *S. meliloti* 2011 (Smel) et *B. subtilis* 168 (Bs). Les données sont obtenues de moyennes de 3 réplicats + 1/2 erreur standard. Les histogrammes représentent la phase de latence des bactéries minéralisatrices de phytate (A) et, en stade final de culture, le pH (B) et la concentration en Pi (C).

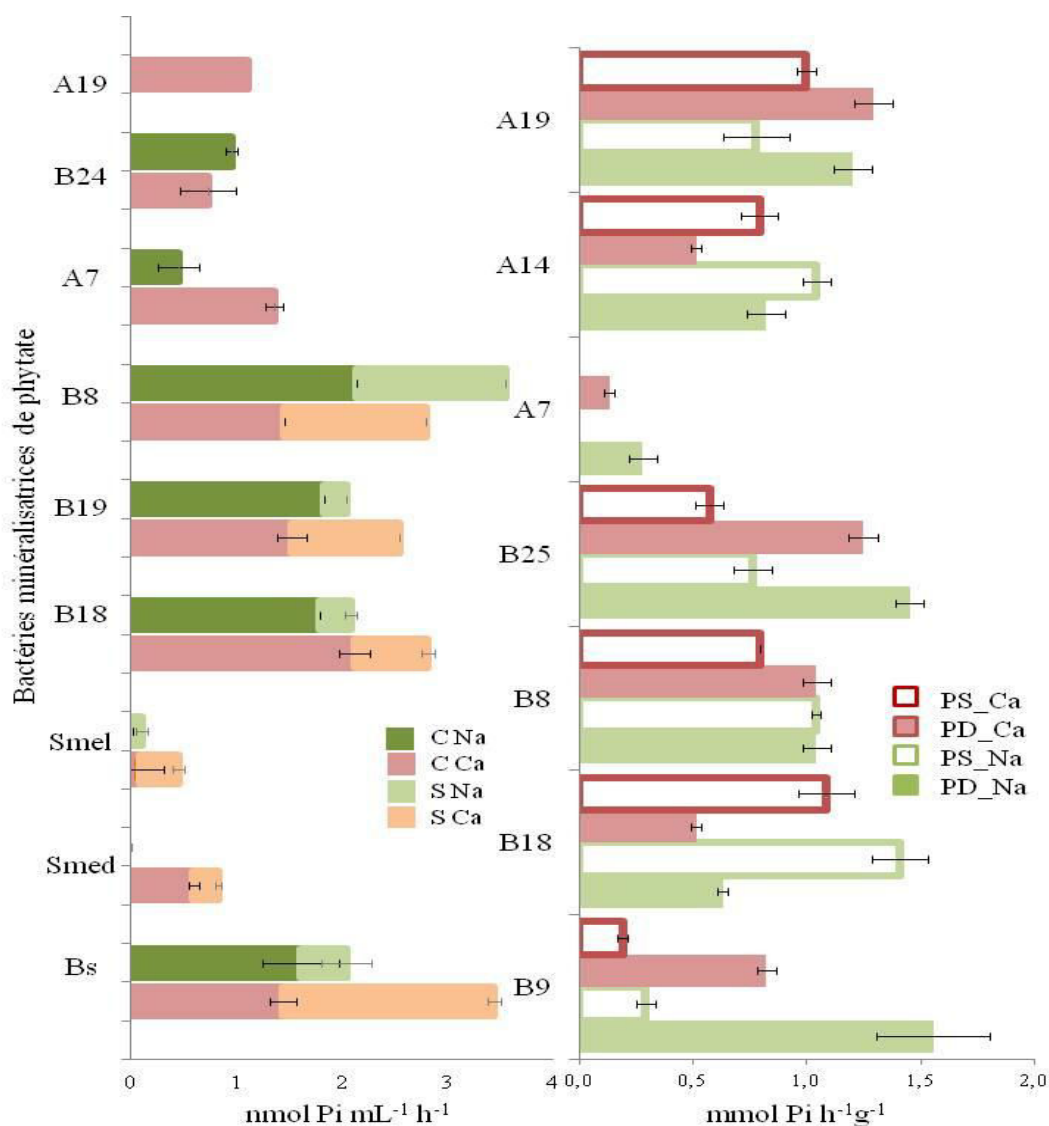
### **II.6.2.3. Propriétés enzymatiques d'isolats Phy<sup>+</sup> bactériens de féverole**

#### ***II.6.2.3.1. au niveau bactérien***

Afin de tester une activité phytase chez les isolats bactériens de féverole aptes à minéraliser le phytate en milieux solide et liquide, avec libération de Pi, nous avons réalisé un dosage enzymatique phytase en phase stationnaire de culture liquide (Figure 47, gauche). Ces isolats affichent soit une activité associée aux cellules dans le culot (C) après centrifugation, soit une activité phytase extracellulaire dans le surnageant (S). Les isolats Phy+TCP- (A7, B8, B19, B18) affichent une activité phytase totale (culot + surnageant) comprise entre 0,4 (A7) et 3,6 (B8) nmol Pi ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figure 47A). Les activités phytases de B8, B18 et B19 sont du même ordre de grandeur que celle de *B. subtilis*. Tout comme *B. subtilis*, ces trois isolats affichent deux types d'activité phytase : cellulaire et extracellulaire. En revanche, A7, A19 et B24, affichent uniquement une activité phytase cellulaire. Une activité phytase BPP dépendante de Ca ayant été préalablement observée chez *B. subtilis* (Shimizu, 1992), nous avons testé une activité phytase dépendante de Ca. L'activité phytase pour A7 et B24 a lieu en présence et en absence de Ca. L'activité phytase pour A19 a lieu sans ajout de Ca. *Smed*, souche rhizobienne de référence, affiche une faible activité extracellulaire inférieure à 0,5 nmol Pi ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, avec ou sans ajout de Ca.

#### ***II.6.2.3.2. au niveau nodulaire en condition P suffisant et P déficient***

Après détection d'une activité phytase en culture libre nous nous sommes intéressés aux activités phytases au niveau nodulaire, en conditions de culture hydroaéroponique suffisante ou déficiente en P pour A19 (Phy+TCP+), A7 et B8 (Phy+TCP-), ainsi que pour A14, B25 et B9 (Phy+TCP-), pour lesquelles nous disposons de nodules obtenus dans les mêmes conditions de culture (Figure 47, droite). Au même titre que pour les bactéries libre, nous avons testé une activité phytase dépendante de Ca sur les extraits nodulaires. Parmi les 7 souches testées, quatre affichent des profils similaires d'activité phytase en condition déficiente en P et en présence ou en absence de Ca, avec (i) une augmentation d'activité pour A19 (Phy+TCP+) et B25, B9 (Phy+TCP-) et (ii) une diminution d'activité pour B18 et A14 (Phy+TCP-). B8 (Phy+TCP-) affiche une activité phytase similaire sous P suffisant et P déficient, en absence de Ca et une activité supérieure sous P déficient, en présence de Ca. Non testé en P suffisant, A7 affiche une activité phytase supérieure, en absence de Ca.



**Figure 47.** Activité phytase d'isolats bactériens de féverole, à l'état libre et nodulaire

Activité phytase bactérienne, en phase stationnaire de croissance (gauche) et nodulaire (droite), au stade floraison, après culture hydroaéroponique en P-suffisant (PS) et P-déficient (PD). Le Na-phytate (Na) est utilisé comme substrat, en présence (Ca) ou en absence de calcium (activité BPP-phytase). Les bactéries sont testés au niveau du culot (C) et du surnageant (S). Bs (*B. subtilis*), Smed (*S. medicae* WSM419), Smel (*S. meliloti* 2011) sont des souches de référence. Les données correspondent à des moyennes  $\pm$  déviation standard de trois réplicats, sont représentées par un trait vertical au sommet des barres. Les tests enzymatiques sur bactéries libres sont réalisés en phase stationnaire de culture bactérienne, en présence de phytate.

### II.6.3. Caractérisation phylogénétique et symbiotique

Le séquençage de l'ADNr 16S est largement utilisé pour l'évaluation de la diversité phylogénétique des rhizobia. Cependant, ce gène est d'efficacité limitée pour la différenciation d'espèces proches puisque des organismes présentant moins de 97% d'homologie de séquences d'ADNr 16S appartiennent à deux espèces différentes. Le séquençage de plusieurs gènes de ménage est donc requis pour la différenciation et l'identification de différentes espèces de *Rhizobium* (Young, 2016; Zakhia and De Lajudie, 2001; Zakhia and de Lajudie, 2006).

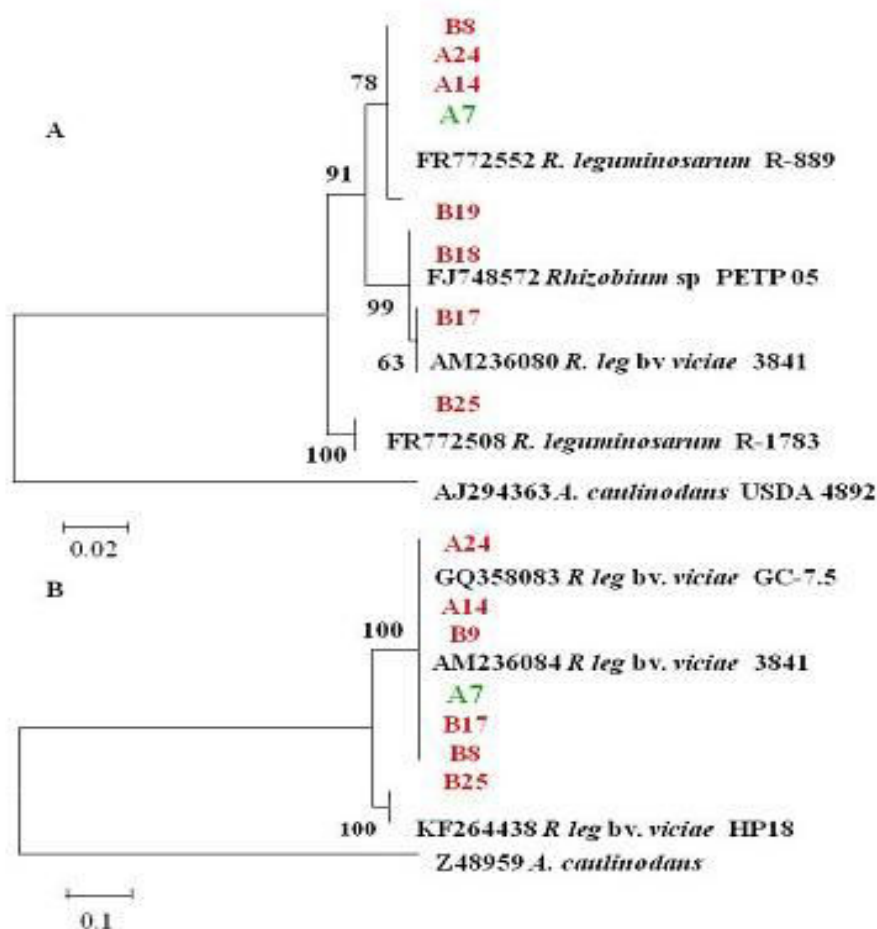
Afin de caractériser nos isolats bactériens aux niveaux phylogénétique et symbiotique, nous avons choisi respectivement les gènes *recA* et *nodD* (Figure 48A et B). Le gène *recA* code pour le système de réparation et de recombinaison d'ADN. De plus, pour les bactéries, les phylogénies de *recA* et de l'ADNr 16S sont compatibles (Eisen, 1995; Gaunt et al., 2001). Le gène *nodD* est un gène régulateur qui code pour des récepteurs spécifiques de signaux de la plante, impliqués dans la spécificité d'hôte (Spaink, 2000).

L'amplification et le séquençage d'un fragment d'environ 500 pb du gène *recA* permet de positionner au niveau phylogénétique, 9 isolats rhizobiens Phy+TCP- avec A7, A14, A24, B8, B9, B17, B18 et B19 et B25 s'apparentant à *R. leguminosarum* ; B18 et B19 étant proches de *Rhizobium* sp. PETP-05 (FJ748572) ; B17 s'apparentant à *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Figure 48A) Six des neuf isolats : A7, A14, A24, B8, B9 et B25 s'apparentent à *R. leguminosarum* ; deux isolats : B18 et B19, sont proches de *Rhizobium* sp. PETP-05 (FJ748572). B17 s'apparentant à *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Figure 48A). Non mentionnés au niveau de l'arbre phylogénétique, les deux isolats A19 et B24 (Phy+TCP+) s'apparentent à *Serratia* sp.

L'amplification et le séquençage d'un fragment d'environ 950 pb du gène *nodD*, permet un positionnement au niveau symbiotique sept des neuf isolats rhizobiens Phy+TCP-: A7, A14, A24, B8, B9, B17 et B25. Avec 100% d'homologie, l'ensemble des sept isolats s'apparente à *R. leguminosarum* bv. *Viciae* (Figure 48B). Aucune amplification n'est obtenue avec B18 et B19.

La diversité génétique de rhizobia associés aux légumineuses de la tribu des *viciae*, a largement été étudiée (Depret, 2008; Laguerre et al., 2003; Riah, 2014; Saidi et al., 2014). La plupart de ces rhizobia s'apparentent à l'espèce *R. leguminosarum*, mais certains s'apparentent à l'espèce *R. fabae*, décrite en Chine (Tian et al., 2008). D'autres espèces

rhizobiennes, telles que *R. laguerreae* et *R. anhuiense* sont également isolées de *V. faba* (Saidi et al., 2014; Zhang et al., 2015).



**Figure 48.** Analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance

Séquences partielles d'isolats rhizobiens de féverole et souches de références pour les gènes *recA* (A) et *nodD* (B). La longueur des alignements des gènes *recA* et *nodD* sont de 530 pb et 950 pb, respectivement. Application du modèle tamura à 3 paramètres. Les données manquantes sont éliminées. Le % de bootstrap (1000 répétitions) est indiqué pour chaque branche interne. Les analyses sont réalisées avec MEGA6.

## II.6.4. Amplification de gènes phytases

### II.6.4.1. PCR *in vitro*

Après test des activités enzymatiques obtenues sur les isolats bactériens, la détection de gènes codant de potentielles enzymes aptes à dégrader du phytate, en utilisant des outils moléculaires semble favorable pour un clonage et la détection de micro-organismes capables de produire des enzymes impliquées dans la dégradation du phytate (Pasamontes 97a, 97b).

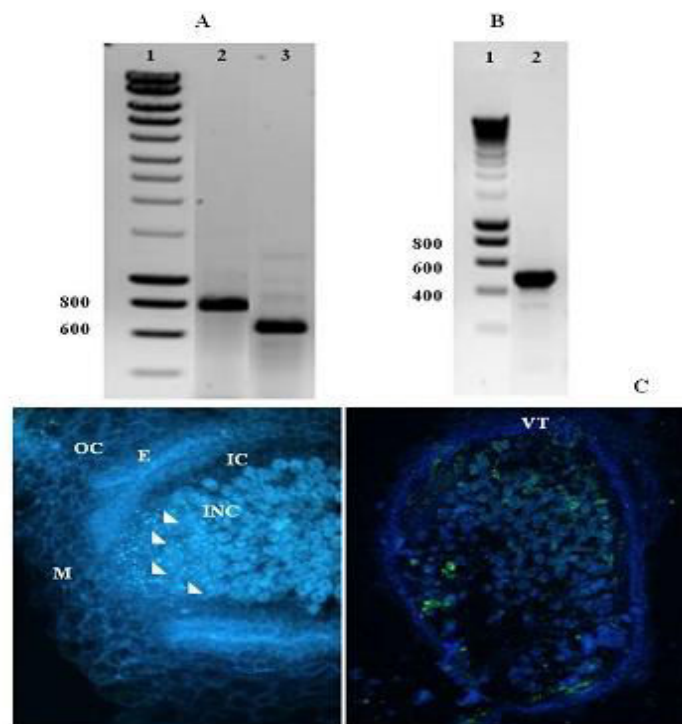
En utilisant des amorces BPP de *B. subtilis* US417 (Farhat et al., 2008) les tailles des produits d'amplification sont de : (i) 250 pb avec : A19 et B24 (Phy+ TCP+); (ii) 300 pb avec B18 et B19 (Phy + TCP-), (iii), 800 pb est obtenu avec B8, A24, A7, A14, B25 (Phy+ TCP-); (iv) 1 000 pb avec Smed et Smel et 2 000 pb avec Bs. L'amplifiat de 800 pb obtenu pour A7 est observable au niveau du puits 2 de la Figure 49A.

En utilisant un couple d'amorces : L314 et R1324 de *S. medicae* WSM419 (ABR62460), les tailles des produits d'amplification sont de : (i) 300 pb pour A19 et B24 (Phy+TCP+); (ii) 500-600 pb pour B8, A24, A7, A14, B9 (Phy + TCP-); (iii) 500 et 400 pb pour Bs; (iv) 1 000 et 900 pb pour Smel. Le couple d'amorces L454 et R962, correspondant à des amorces définies au niveau d'une zone interne plus courte de *S. medicae* WSM419 (ABR62460), permet uniquement l'amplification d'un fragment de 500 pb avec Smel (Figure 49B). L'amplifiat de 600 pb obtenu avec les amorces L314 et R1324 de *S. medicae* WSM419 (ABR62460) pour l'échantillon B8 est observable au niveau du puits 3 de la Figure 49A. il convient de noter que pour la première fois, l'amplification d'un gène 4-phytase a été obtenue avec des souches de rhizobia, en utilisant le couple d'amorces L454 et R462, dessinées à partir du génome de *S. medicae* WSM419 (ABR62460).

L'utilisation de Cap-3 (Mobylye portal), a permis de générer 10 contigs et 25 séquences uniques. Après identification de ces séquences par nblast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), aucun gène phytase n'a été amplifié à l'exception de l'ADN de témoins positifs, à savoir Bs et Smel, en utilisant des couples d'amorces de (i) BPP de *B. subtilis* US 417 et (ii) HAP L454-R962 de *S medicae*. L'amplicon obtenu avec Smel code pour un transporteur de type ABC, sous-unité périplasmique affiliée à la 4-phytase de (i) *Smed* WSM419 (ABR62460.1), (ii) BL225C (AEG08494.1) et AK83 (AEG55418.1) de l'espèce *Smel* et (iii) *Rhizobium* sp.. NT26 (CCF21642.1).

### II.6.4.2. Rt PCR *in situ*

Comme nous l'avons vu plus haut, les amplifications par PCR *in vitro* (Figure 49A) ont été obtenues avec les amorces phytases BPP de *B. subtilis* US417 (Farhat *et al.*, 2008) et HAP de *S. medicae* WSM419 (ABR62460), respectivement pour A7 (puits 2) et B8 (puits 3). Ces deux isolats soumis à une RTPCR *in situ* (Figure 49C) affichent des signaux fluorescents pour A7 (gauche) et A8 (droite).



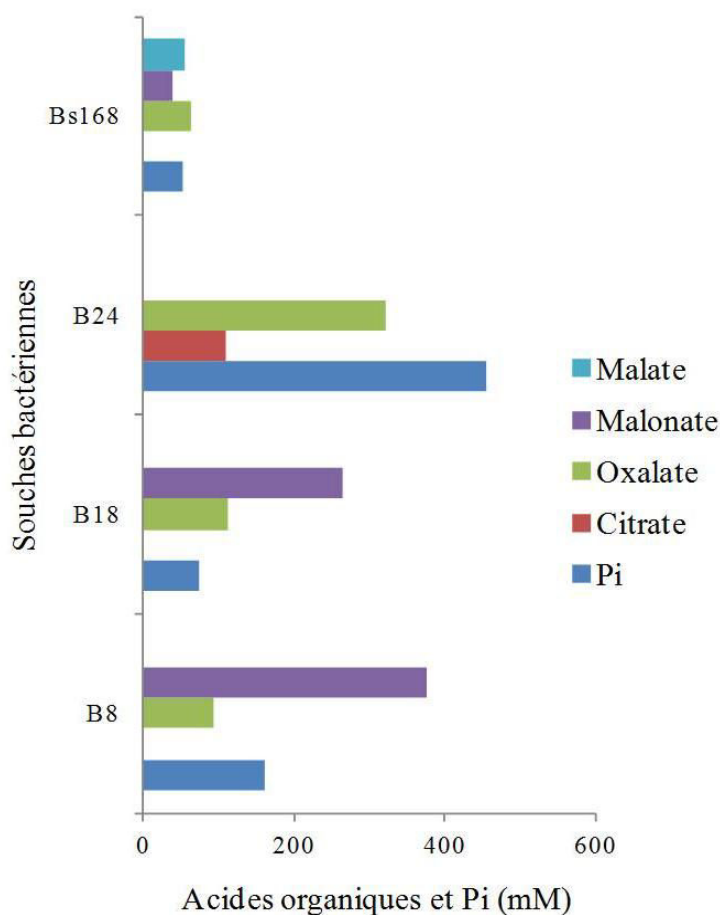
**Figure 49.** Amplification *in vitro* de gènes d'isolats rhizobiens de *V. faba* et localisation *in situ* de leurs transcrits

(A), ligne 1, Smart ladder; ligne 2, isolat A7 amplifié avec les primers spécifiques de la phytase BPP de *B. subtilis* US417 (Farhat *et al.*, 2008); ligne 3, isolat B8, amplifié avec les primers spécifiques de la phytase HAP de *S. medicae* WSM419 (ABR62460); (B), ABC transporteur de *S. meliloti* 2011 amplifié avec les primers spécifiques de la phytase HAP de *S. medicae* WSM419 et (C), localisation *in situ* de transcrits dans les nodules de *V. faba* inoculés avec les isolats rhizobiens A7 (gauche) et B8 (droite), après transcription réverse avec des primers spécifiques des gènes phytases, selon le protocole de Lazali *et al.*, (2013). A gauche, section longitudinal d'un nodule inoculé avec l'isolat rhizobien A7. Les flèches blanches correspondent aux signaux verts induits par les primers spécifiques de la phytase BPP de *B. subtilis* US417. A droite, section transversale montrant les signaux induits par les primers spécifiques de gènes phytases HAP de *S. medicae* WSM419. INF, Infected cell; E, Endodermis; IC, Inner cortex; OC, Outer cortex; M, Meristem.



## II.6.5. Production d'acides organiques et de Pi d'isolats Phy<sup>+</sup>

Les trois isolats bactériens de féverole B8, B18 (Phy+TCP-) et B24 ((Phy+TCP+)) ainsi que la souche témoin *β. subtilis* cultivés sur milieu phytate liquide libèrent du P inorganique (Pi) produisent des acides organiques (AOs). B8 et B18 (Phy+TCP-) produisent du malonate, et de l'oxalate. La souche B24 (Phy+TCP+) produit de l'oxalate, du citrate en très forte quantité par rapport à B8 et B18. Le témoin *Bacillus subtilis* 168 produit du malate, du malonate et de l'oxalate (Figure 50).



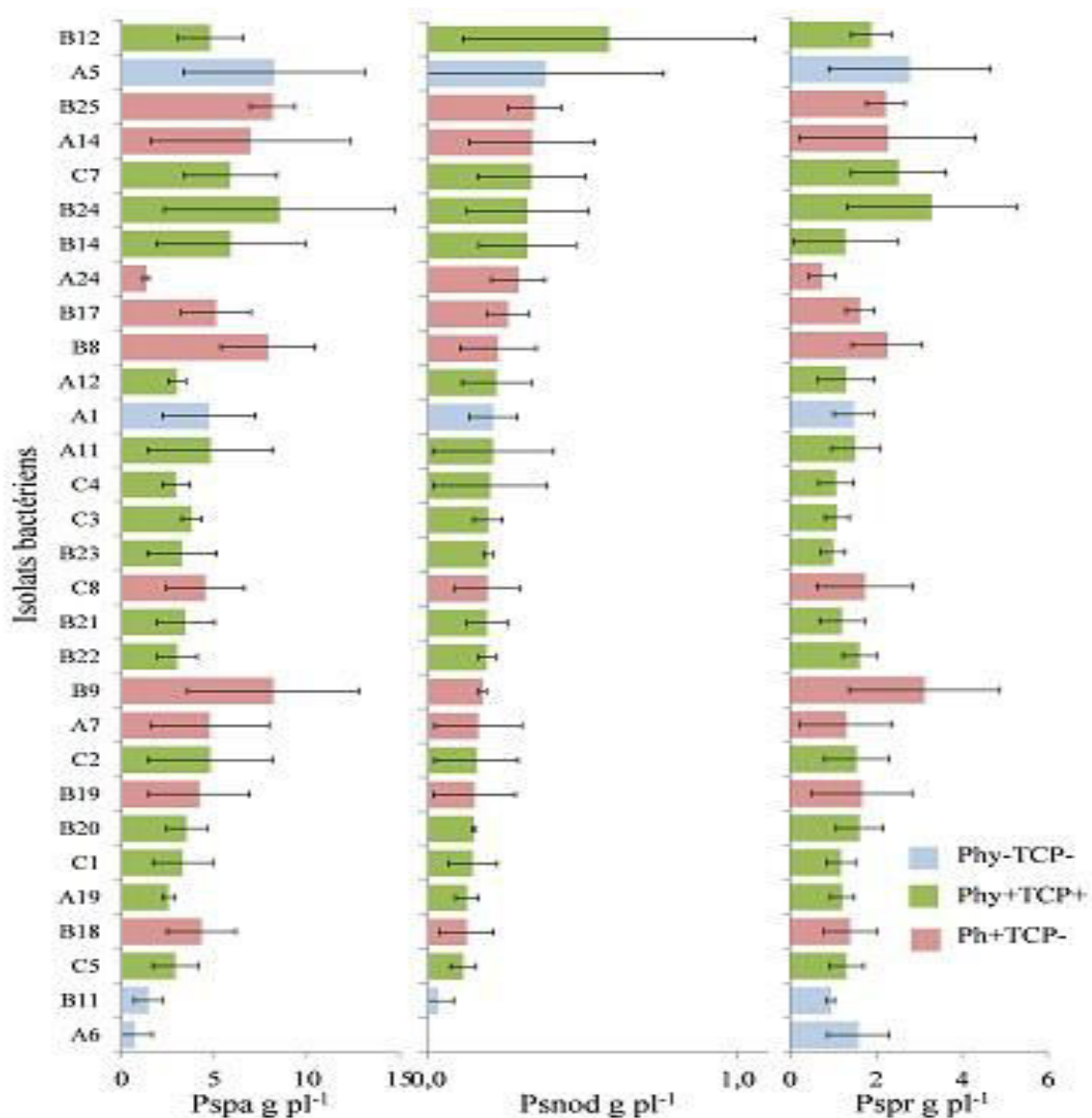
**Figure 50.** Production de Pi et d'acides organiques par des isolats aptes à minéraliser le phosphore organique et inorganique

Dosage par HPLC ionique de la production de P inorganique (Pi) et d'acides organiques (AOs) chez trois isolats bactériens de féverole aptes à minéraliser le phytate B8, B18 (Phy+TCP-) et B24 (Phy+TCP+). *β. subtilis* correspond à une souche témoin phytase (BPP). La production de Pi et de chacun des AOs est différenciée par des barres de couleur spécifique, Pi (bleu) ; oxalate (vert) ; malonate (violet) ; citrate (rouge) ; malate (bleu ciel). Les isolats bactériens ont été cultivés en milieu phytate liquide.



## **II.7. Test de nodulation de la féverole par les souches Phy+ en culture hydroaéroponique**

Afin d'établir un lien appartenance à des rhizobia, les 26 isolats bactériens aptes à minéraliser le phytate en milieu de culture solide (16 Phy+TCP+ et 10 Phy+TCP-), ont été testés pour leur capacité à noduler la féverole en culture hydroaéroponique, sous serre (Figure 51). Quatre souches non minéralisatrices de phytate et non solubilisatrice de TCP (Phy-TCP-) ont été ajoutées à l'essai. L'ensemble des souches Phy+TCP+ (vert) et Phy+TCP- (rose) sont aptes à renoduler la féverole *in vitro*. Une variabilité de nodulation ( $P_{snod} \text{ g pl}^{-1}$ ), de croissances aériennes ( $P_{spa} \text{ g pl}^{-1}$ ) et racinaires ( $P_{spr} \text{ g pl}^{-1}$ ) est observable en fonction des isolats bactériens. La croissance aérienne n'est pas toujours corrélée à la nodulation ; une souche peu infective peut être très effective et vice versa. A titre d'exemple, B9 (Phy+TCP-) affiche une forte croissance pour une faible nodulation et B12 (Phy+TCP+) affiche une forte nodulation pour une faible croissance.

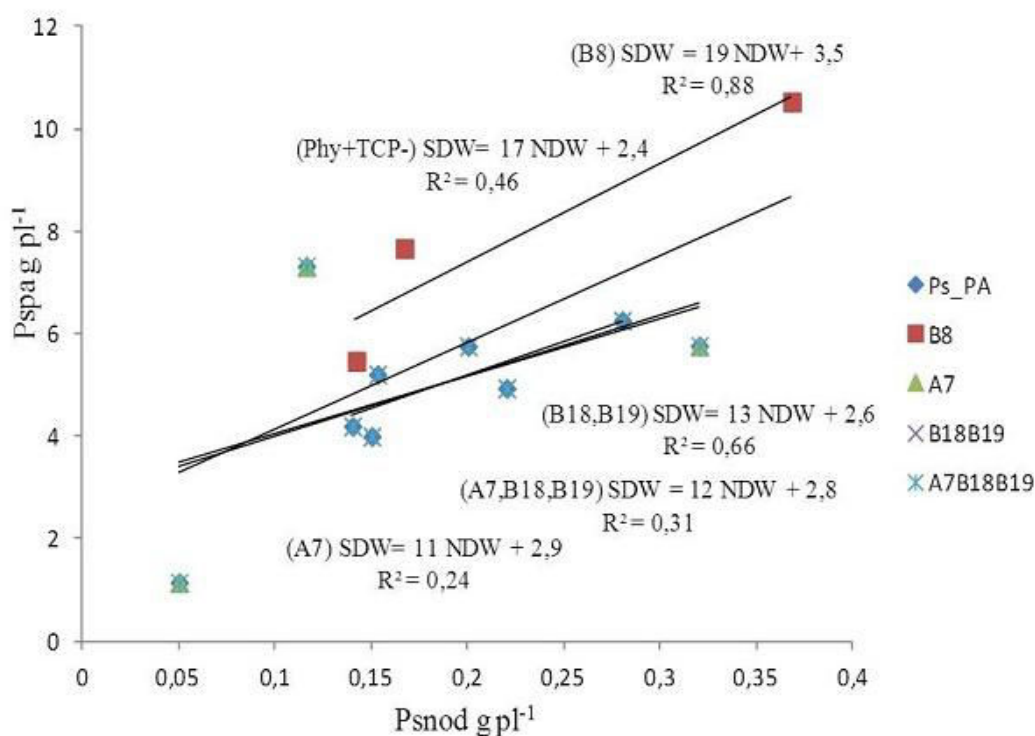


**Figure 51.** Test de nodulation de la féverole par les isolats Phy+

Nodulation de la féverole par les 26 isolats bactériens capables de minéraliser le phytate en milieu de culture solide (16 Phy+TCP+ et 10 Phy+TCP-), après culture en hydroaéroponie. Les barres colorées distinguent les isolats capables (rose), minéraliser le phytate (Phy+); (vert), solubiliser également le Tri-Calcium-Phosphate (Phy+TCP+). Le trait vertical, au sommet des barres, correspond à l'erreur standard de chacune des moyennes.

## II.8. Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne

Afin d'établir un lien entre l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) et le phénotype Phy+ des quatre isolats rhizobiens A7, B8, B18, B19 (Phy+TCP-) aptes à minéraliser le phytate en milieu liquide, nous les avons testés sur féverole, en culture hydroaéroponique. Les isolats Phy+ se répartissent en deux groupes d'EUSR (i) l'isolat le plus efficace B8 a une EUSR de 3,5 g Pspa g<sup>-1</sup> Psnod, (ii) le groupe le moins efficace : A7, B18 et B19, montrent une valeur moyenne globale d'EUSR de 2,8 g Pspa g<sup>-1</sup> Psnod (Figure 52).



**Figure 52.** Efficacité d'utilisation symbiotique de rhizobia Phy+

Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) de *Vicia faba* inoculée avec des isolats rhizobiens capables de minéraliser le phytate en milieu liquide (Phy+). B8 ; le plus, A7, B18, B19 ; les moins, efficaces. La récolte des plants a été réalisée à floraison, après culture en conditions hydroaéroponique.

## II.9. Discussion sur la caractérisation fonctionnelle de la symbiose *V. faba*-rhizobia

Le principal résultat de ce travail est l'observation d'une activité phytase chez des rhizobia isolés à partir de nodules racinaires de *Vicia faba* cultivée en agro-écosystème Sud de France. Des micro-organismes capables de dégrader le phytate ont été isolés de nombreux environnements terrestres et aquatiques, incluant les sols, les sédiments, l'eau et l'écosystème marin ainsi que le tube gastro-intestinal des animaux (Richardson and Hadobas, 1997; Turner et al., 2006). Dans notre étude, seulement 4 des 10 rhizobia Phy+TCP- sont capables de pousser en milieu liquide. Ceci est cohérent avec le fait que le screening de souches bactériennes sur milieu phytate solide au travers de la formation d'un halo n'est pas une méthode suffisante (Maougal et al., 2014a). Des cinétiques de croissance et la quantification de Pi libéré dans le milieu de culture liquide sont nécessaires pour déterminer l'aptitude d'une souche bactérienne à minéraliser le phytate. Ceci est confirmé dans notre étude par le fait que tous les rhizobia capables de pousser en milieu liquide avec du phytate comme seule source de P possèdent une activité permettant de dégrader le phytate. Cependant, la régulation de la production d'enzymes aptes à dégrader le phytate peut différer d'un micro-organisme à un autre. Les conditions optimales de culture sont souvent spécifiques du genre ce qui peut expliquer un échec pour détecter l'activité phytase pour certains microorganismes (Konietzny and Greiner, 2002). Notre observation montre que des bactéries possédant des activités phytases cellulaires et extracellulaires libèrent une quantité supérieure de P inorganique par rapport aux isolats producteurs de phytases cellulaires. Ceci est comparable à des observations antérieures (Turner et al., 2002). La production enzymatique cellulaire et extracellulaire suggère que les micro-organismes utilisent différentes voies d'hydrolyse des phytates, soit dans le milieu externe, soit dans le périplasme. Des enzymes dégradant le phytate ont été trouvées chez diverses bactéries telles que *Pseudomonas* sp. (Richardson and Hadobas, 1997), *B. subtilis* (Choi et al., 2001; Kerovuoto et al., 1998), *Klebsiella* sp. (Sajidan et al., 2004), *Enterobacter* (Konietzny and Greiner, 2004) et *E. coli* (Greiner et al., 1993). Les enzymes extracellulaires produites présentent une plus forte résistance à la protéolyse et sont plus tolérantes aux variations de pH et de température (George et al., 2007). Les activités enzymatiques des trois isolats rhizobiens (B8, B18, B19) qui affichent une phytase cellulaire et extracellulaire sont du même ordre de grandeur que la souche de référence : *B. subtilis*. Du fait que « phytase » soit un terme générique pour décrire des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons phosphomonoester du phytate et produire du P inorganique

(Mullaney and Ullah, 2003), nous avons utilisé des amorces spécifiques HAP et BPP, déterminées à partir de séquences protéiques de phytases. Nous avons tenté d'amplifier des gènes phytase *in vitro* et localiser leurs transcrits *in situ*, au niveau d'isolats minéralisant le phytate. Aucun gène canonique ou connue « phytase » n'a été mis en évidence dans les génomes des isolats sélectionnés. Toutefois, nous ne pouvons exclure le fait que nos amorces aient atteint un objectif génomique permettant l'amplification de gènes codant des protéines fonctionnellement indéterminées et des ABC transporteurs. En revanche, la localisation nodulaire de cibles distinctes par RT-PCR *in situ* suggère que ces transcriptions sont associées aux bactéries nodulantes.

Les amplicons obtenus avec *S. meliloti* en utilisant des amorces *S. medicae* WSM419 codent une phytase-4 rhizobienne. Deux classes d'enzymes dégradant les phytates sont reconnues: la 3-phytase (EC 3.1.3.8) et la 6-phytase (EC 3.1.3.26). Toutefois, d'autres enzymes dégradant le phytate existent dans la nature (Menezes-Blackburn et al., 2013). Les micro-organismes possèdent généralement des 3-phytases, tandis que les 6- (4)-phytases sont spécifiques des plantes. Il existe une grande diversité parmi les séquences d'acides aminés des enzymes dégradant le phytate. Les séquences d'acides aminés de la phytase BPP de *B. subtilis* n'ont pas d'homologie avec les séquences phosphatases répertoriées dans les bases de données (Kerovuo et al., 1998). Deux types de phytases ont été identifiés chez l'espèce *Serratia*: une phytase acide HAP (PhyH49) et une phytase alcaline BPP (PhyB49), qui ont de faibles identités avec les phytases connues (61 % au maximum) (Zhang et al., 2011a). Ces enzymes sont classifiées parmi les phosphatases acides, neutres ou alcalines. La phytase BPP est la seule enzyme capable d'hydrolyser les phytates sous forme insoluble, dans des conditions neutres et en présence de Ca (Cheng and Lim, 2006; Kerovuo et al., 1998). Pour les autres phytases, le pH acide optimal varie entre 2,2 et 5,5 (Cheng and Lim, 2006; Mullaney and Ullah, 2003). Dans notre expérience, les isolats bactériens Phy+TCP+ (A19, B24) capables d'utiliser le phytate et le TCP comme source de P montrent un meilleur indice de solubilisation du phytate. Dans la rhizosphère, les interactions des micro-organismes et les activités enzymatiques extracellulaires permettent la dégradation de phytates et favorisent la disponibilité du P pour la plante, à partir de phytates du sol (Richardson and Simpson, 2011; Unno et al., 2005). La solubilisation du P du sol par des populations microbiennes est favorisée par l'acidification et/ou la chélation liée à la production de protons, des anions organiques et des sidérophores (Hinsinger et al., 2011; Marschner, 2012; Richardson and Simpson, 2011). Il a été montré que *B. amyloliquefaciens* FZB45 peut améliorer la croissance de jeunes plants de maïs (Idriss et al., 2002) et que des bactéries qui possèdent des phytases

favorisent la croissance de la moutarde (Kaushik, 2015). La fixation symbiotique d'azote est un processus coûteux énergétiquement, qui consomme en moyenne 20 ATP par réaction de la nitrogénase, pour la réduction d'une molécule de N<sub>2</sub> (Franche et al., 2009). Les symbioses rhizobium-légumineuses contribuant à la disponibilité du P du sol et à sa biodisponibilité pour la plante peuvent contribuer à augmenter la croissance des plantes et leur rendement. Comprendre la diversité fonctionnelle des rhizobia capables de solubiliser le P organique pourrait permettre l'optimisation de la SNF des légumineuses dans les sols pauvres en P, tels ceux des agro-écosystèmes méditerranéens.

Les isolats A19 et B24 (Phy+ TCP+) sont identifiés en tant que *Serratia* sp.. Classifiés parmi les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) *Serratia* spp occupent une niche écologique identique aux rhizobia et interagissent avec des légumineuses en conditions naturelles. *Serratia* spp sont reconnus pour leur rôle essentiel dans la santé des plantes et la fertilité des sols (Akhter, 2014). Zhang et al., (2011a) ont montré que la souche *Serratia* sp TN49 qui possède une phytase acide (PhyH49) et basique (PhyB49) pourrait être plus adaptée aux changements environnementaux.

Dans cette étude, nous avons isolé quatre souches rhizobiennes de nodules racinaires de *V. faba* ayant la capacité à dégrader le phytate et avons obtenu des amplicons avec les amorces HAP et BPP, correspondant essentiellement à des ABC transporteurs. En utilisant des amorces HAP de *S. medicae* WSM419 nous avons amplifié un gène phytase de *S. meliloti* 2011 similaire à la 4-phytase de *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* BL225, AK83 et *Rhizobium* sp. NT26. Sous conditions déficientes en P, des souches de *S. meliloti* 2011 sont aptes à établir une association symbiotique efficace avec *M. truncatula* (Sulieman and Schulze, 2010; Sulieman et al., 2013a).

Il est nécessaire de mieux comprendre l'importance écologique des micro-organismes aptes à dégrader les phytates dans différents écosystèmes. Des bactéries produisant des acides organiques impliqués dans la solubilisation du P inorganique et possédant également une activité phytase impliquée dans la minéralisation des phytates, ont été isolées de la rhizosphère (Plassard et al., 2015). Ces bactéries ont été utilisées pour améliorer la disponibilité du P en alimentation animale (Greiner and Konietzny, 2010; Jorquera et al., 2008a) et augmenter la disponibilité du P du sol et sa biodisponibilité pour la plante (Greiner and Konietzny, 2010; Jorquera et al., 2008a; Richardson et al., 2001).

Dans les régions méditerranéennes, les carences nutritionnelles en particulier en P et l'absence dans les sols de rhizobia natifs locaux efficaces représentent les principaux facteurs limitant de la symbiose Rhizobium-légumineuse (Benadis et al., 2013; Maougal, 2014). L'application



de microorganismes bénéfiques, y compris de rhizobia pour augmenter la productivité végétale pourrait être d'un grand intérêt pour le développement d'une agriculture durable.

## II.10. Conclusion générale et perspectives

Le bilan d'une agriculture spécialisée et productiviste est considéré par chacun comme globalement négatif. Nous nous orientons donc vers :

- ✓ Un cadre de production/soutenabilité qui facilite les services écologiques, en tenant compte des changements climatiques et de la raréfaction des ressources naturelles,
- ✓ L'intégration des besoins alimentaires d'une humanité en expansion et de plus en plus urbanisée, estimée à 9 milliards en 2050, dans le cadre d'une agriculture écologiquement intensive,
- ✓ Une alternative à l'utilisation d'intrants chimiques par le développement de modèles agro-écologiques,
- ✓ La conception d'une diversité et d'une complémentarité de forme d'agricultures reposant sur des savoirs et des pratiques alliant agronomes, biologistes et agriculteurs, en vue d'évaluer les évolutions observées et prévisibles en agriculture,
- ✓ L'invention de systèmes de production plus inspirés de l'écologie que de la chimie, sur des modèles agroécologiques favorables à l'augmentation et/ou au maintien de la biodiversité, de la protection des écosystèmes, de la biosphère et des sols, avec une moindre consommation d'énergies fossiles et de ressources naturelles. Les microorganismes, en nombre important dans les sols, peuvent être une alternative aux intrants chimiques coûteux et polluants, pour une agriculture durable et protectrice de l'environnement.

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'un projet fédérateur FABATROPIMED, avec la participation d'agriculteurs. Elle repose sur l'identification de rhizobia de féverole capables de minéraliser le P organique de type phytate et d'augmenter l'efficacité de la symbiose fixatrice d'azote, coûteuse en énergie. Ce travail a été conduit sur des placettes paysannes multilocalisées d'un agroécosystème Sud de France, localisé en région Occitanie (Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées), où la disponibilité en P du sol peut-être contrainte par les propriétés physico-chimiques des zones méditerranéennes riches en calcaire. A partir d'une centaine d'isolats bactériens de féverole, nous avons identifié 26 rhizobia capables de minéraliser le phytate (Phy+) en milieu solide, dont 16 capables de solubiliser le Pi (Phy+TCP+), en milieu liquide. Des activités phytases rhizobiennes ont été observées en

culture libre ainsi qu'au niveau nodulaire, laissant présager d'une activité phytase rhizobienne potentielle à l'état libre dans les sols et en symbiose, au niveau nodulaire. Par ailleurs, nous avons identifié une production d'acides organiques chez ces isolats rhizobiens, pouvant jouer un rôle favorable dans la disponibilité du P du sol et sa biodisponibilité pour la plante (Duputel, 2013). L'utilisation d'amorces déduites de séquences phytases de genres rhizobiens proches n'a pas permis la mise en évidence de gènes codants des phytases, mais des ABC transporteurs. En l'état, ceci ne nous permet donc pas d'établir un lien entre nos amplicons géniques et leurs transcrits avec des gènes de type phytase.

Au plan moléculaire, il serait d'un intérêt majeur de (i) déterminer la diversité fonctionnelle de rhizobia isolés à partir de légumineuses, en s'appuyant sur des connaissances d'associations symbiotiques modèles telles que *S. meliloti* et *S. medicae/Medicago truncatula*, en milieu tempéré et *B. japonicum*/soja, en milieu tropical ; (ii) acquérir des connaissances fondamentales, au niveau diversité phylogénétique et fonctionnelle des gènes phytases ; (iii) tester au plan agronomique des isolats sélectionnés dans des programmes de productions d'inoculum pour une résilience et une amélioration de la fertilité des sols. Ceci en vue d'une compréhension des mécanismes mis en jeu (FSN, PUE) au niveau de la problématique N et P, deux principaux éléments indispensables à la nutrition végétale et fondamentaux chez les légumineuses symbiotiques. Des programmes d'inoculations présenteraient un intérêt en tant que (i) test de compétitivité et de survie des souches microbiennes au niveau des sols ; (ii) maintien d'une activité microbienne. Au plan industriel, la production de biofertilisants selon des normes standards de qualité est indispensable afin d'augmenter le taux d'inoculation et de nodulation chez les légumineuses au champ. Les nouvelles technologies en industrie permettraient également de minimiser le temps et le coût d'inoculation dans les grandes superficies et de contrôler plus facilement la corrélation entre l'inoculation et la nodulation, en divers agroécosystèmes de zones tempérées et tropicales.

## Chapitre III : Matériel et méthodes

### III.1. L'agroécosystème Sud de France

#### III.1.1. Zone d'étude

L'agro-écosystème Sud de France de référence se situe en régions Languedoc-Roussillon et Midi-Pyrénées, du Lauraguais à la Gascogne, dans un rayon de 100 kms environ au nord et au sud de Toulouse (Figure 53). La fusion des deux régions donne naissance, depuis 2015, à une seule région dénommée « Occitanie ». Le choix de la zone d'étude sur placettes a débuté par une phase de prospection téléphonique auprès de conseillers responsables des productions végétales de chambres d'agriculture, CIVAM Bio 11 et 34 et CREAB Midi-Pyrénées. Elle a été suivie d'un rendez-vous chez les agriculteurs pour l'échantillonnage sur le terrain. Le premier contact avec les conseillers agricoles permet de recenser les producteurs de féveroles : notre légumineuse à graine modèle, en culture associative ou en rotation. Une carte Google map, répertoriant les différents points de prélèvements, a été réalisée. Le matériel destiné aux prélèvements a été listé avec précision.



**Figure 53.** Carte de localisation de la région Occitanie

La région Occitanie englobe deux sous-régions (Languedoc-Roussillon et Midi-Pyrénées)

### III.1.2. Présentation et description du Lauragais

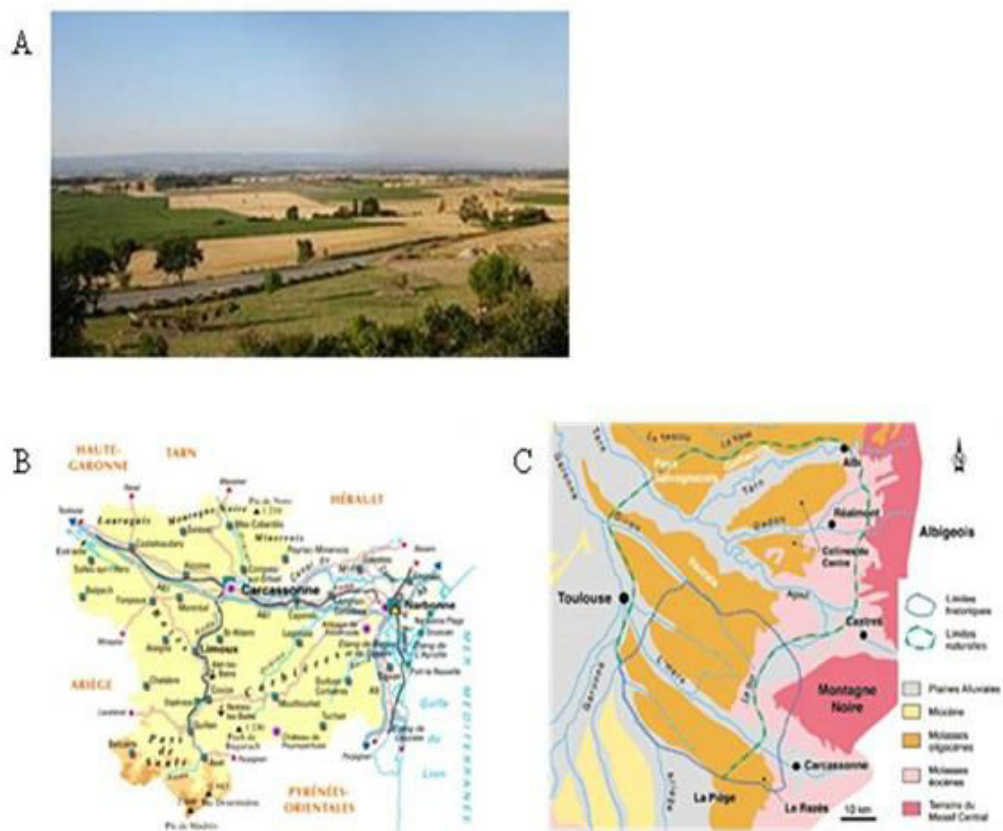
Le « Pays Lauragais » désigne le pays, au sens de la loi du 25 juin 1999, reconnu depuis le 11 octobre 2004. Le Lauragais ou Lauraguais (en occitan *Lauragués*) est une région naturelle du sud-ouest de la France. Le Lauragais tirerait son nom du château de Laurac, situé près du village de Castelnaudary. Son nom pourrait également signifier terre de labours, le mot *lauragués* dérivant du verbe occitan *laurar*, signifiant : labourer en français.

Le Lauragais est à cheval sur les collines de molasse des Terreforts à l'est de Toulouse, et la plaine de Castelnaudary, entre la vallée de l'Agout au nord et la vallée de l'Ariège au sud (Figure 54). Le climat est sous influence atlantique et méditerranéenne. Il s'agit d'un climat assez doux mais venteux. Les deux vents dominants sont le Cers venant de l'ouest, nord-ouest et le vent d'Autan, plus violent que le Cers, venant du sud-est. Le Cers et le vent d'Autan sont respectivement nommés, par les méditerranéens, Tramontane et Marin. Le relief est sculpté par le creusement différentiel des cours d'eau lors des différentes morphogénèses du quaternaire. Les collines, organisées en longues échines par un réseau hydrographique principalement orienté Sud-Est et Nord-Ouest, ont un aspect vallonné. Les altitudes sont généralement comprises entre 120 et 350 m. Les collines du Lauragais sont marquées par des pentes pouvant dépasser localement 30 % et par la dissymétrie de leurs versants (Brunet, 1957; Revel and Rouaud, 1985). Dans ces reliefs vallonnés, des sols bruns calciques se sont formés durant les interglaciations du quaternaire. La pratique des labours a conduit à une inversion des profils pédologiques par abrasion des sommets et comblement progressif des ravines. De ce fait, Revel (1982) parle d'une « mosaïque de sols » (Morschel and Fox, 2004). La part élevée des argiles, qui donne son nom aux terreforts et à l'ensemble des collines, fait que la structure de ces sols est stable. Dans les vallées alluviales et dans les secteurs de faible pente, se trouvent des sols limoneux nommés boubènes, plus acides et battants. Leurs caractéristiques les rendent théoriquement très sensibles au ruissellement, mais leur localisation en zones planes les exclut des problèmes d'érosion.

La mise en valeur de la région par rapport à l'agriculture débute très tôt dans l'histoire.

Les premiers défrichements datent de l'époque romaine. Après les années 1960, le bocage a laissé place à de grands champs ouverts et l'agriculture céréalière intensive a remplacé la polyculture. La production agricole se divise en deux principales composantes: les cultures d'hiver (blé dur) et les cultures d'été (tournesol). Lors de la période printanière, alors que les cultures d'été ne sont pas encore suffisamment développées, le Lauragais subit des précipitations orageuses souvent violentes capables de décaper localement de 20 à 300 tonnes

de terre. Le rôle des fortes pluies dans l'érosion hydrique du Terrefort est souligné par les travaux de Brunet dès les années 1950 (Brunet, 1957). L'impact des pluies dépend de la hauteur des eaux journalières et de leur intensité (Morschel and Fox, 2004). L'érosion par les glissements de terrain est concentrée sur les prairies enherbées, qui ne représentent aujourd'hui qu'une superficie négligeable face aux grandes cultures. Le Lauragais constitue le « grenier du Languedoc », mais son rôle peut déborder le cadre régional et lui assigner une place non négligeable au niveau national, notamment avec le développement du « haricot du Lauragais » et de son traditionnel cassoulet de Castenaudary.



**Figure 54.** Plaine du Lauragais (A), localisation géographique (B) et topographie (C)

### III.1.3. La Gascogne : Domaine de la Hourre

La Gascogne est située dans le Grand Sud-Ouest français. Elle est marquée par ses limites naturelles que sont l’océan Atlantique, de la frontière espagnole à l’estuaire de la Gironde, à l’ouest, le cours de la Garonne, au nord et à l’est et le contrefort des Pyrénées, au sud (Figure 55). Le domaine expérimental de la Hourre est situé au sud-est de la commune d’Auch (Gers) et s’étend sur une surface de 54 ha, sur un système de coteaux argilo-calcaires de pente moyenne à forte. Ce domaine est entré en culture biologique depuis octobre 1999. Celui-ci est géré par le lycée agricole d’Auch-Beaulieu et le CREAB Midi-Pyrénées est responsable de la mise en place et du suivi des essais conduits sur les grandes cultures.

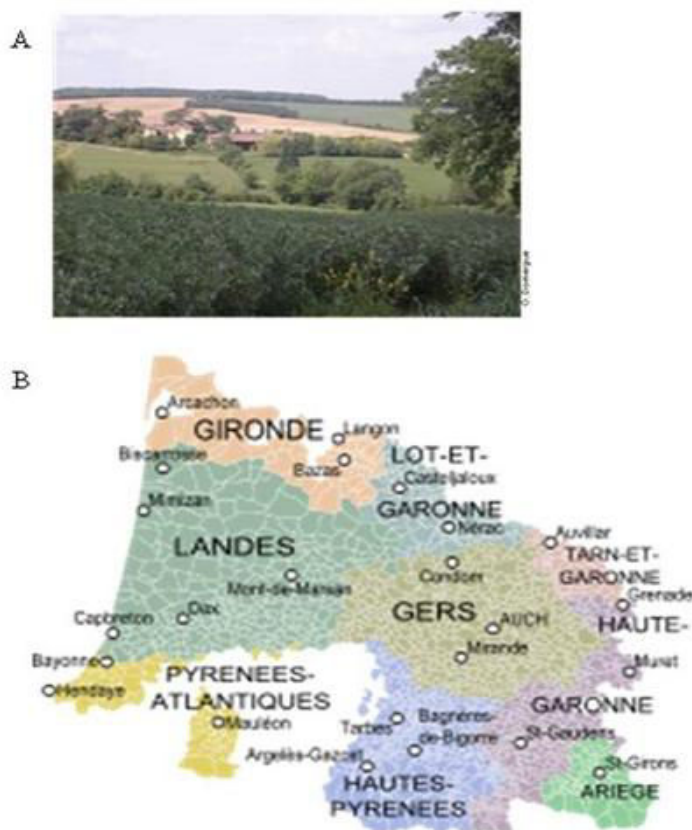


Figure 55. Paysage de Gascogne



### III.1.4. la Camargue

La Camargue (Figure 56), delta du Rhône du sud méditerranéen français, se caractérise par un paysage unique et fragile abritant une faune et une flore exceptionnelle ainsi qu'un parc ornithologique d'environ 400 espèces d'oiseaux. Réserve et parc national naturel, la Camargue est classée patrimoine mondial de l'UNESCO (1977).

Zone humide d'une superficie d'environ 160 000 ha, la Camargue se compose d'espaces naturels et de terres agricoles, dont 32 000 ha cultivées en céréales. Trois principales zones de production sont définies (i) cultures sur des terres alluviales, au nord (ii) élevages (chevaux, taureaux) sur des terres basses et halomorphes, au sud (iii) salins, à l'est et à l'ouest.

D'un climat méditerranéen, très venté, chaud et sec en été, au déficit hydrique très élevé (500 à 800 mm par an), la Camargue se caractérise par des sols salins. Le riz irrigué, principale culture de Camargue, favorise la désalinisation, par submersion. Cultivé durant plusieurs années, le riz permet des rotations avec des cultures pluviales sensibles à la salinité, tel que le blé dur (Mailly et al., 2013). L'usage agricole des sols varie essentiellement en fonction du contexte économique et réglementaire de soutien des pouvoirs publics. L'agriculture biologique (AB), en extension, représente environ 7 % des surfaces rizicoles. L'une des alternatives pour réduire l'apport d'intrants coûteux et/ou polluants et éviter le développement de mauvaises herbes et de pathogènes est le recours à des systèmes de cultures mixtes sèches : céréales et légumineuses.

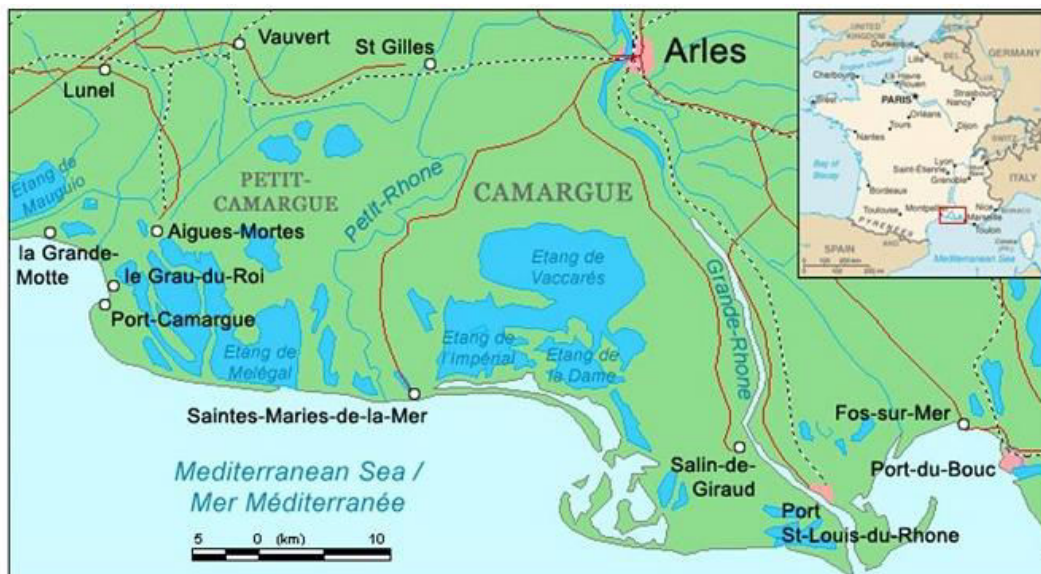


Figure 56. Localisation géographique de la Camargue

## **III.2. Les organisations agricoles**

### **III.2.1. CIVAM Bio**

Le réseau des Centres d'Initiatives pour Valoriser l'Agriculture et le Milieu rural (CIVAM) s'applique à trouver des solutions concrètes pour répondre aux enjeux actuels de développement agro-écologique, de vitalisation des campagnes, la production d'une alimentation de qualité pour tous et l'organisation d'un commerce équitable en partie relocalisé. Les thèmes de travail sur lesquels les membres du réseau s'impliquent peuvent se regrouper en trois axes :

#### **III.2.1.1. Démarche agro-écologique**

Si la nécessité de cette transition semble aujourd'hui admise et souhaitée par la société et les pouvoirs publics, l'organisation de cette transition doit se construire. Les systèmes développés dans le réseau RAD/CIVAM prennent en compte les trois aspects de la durabilité. Le réseau CIVAM continue à identifier, analyser, évaluer et diffuser ces systèmes avec des méthodes d'accompagnement qui permettent et accélèrent leur mise en place dans de nombreuses exploitations.

#### **III.2.1.2. Maintien et développement des activités agri-rurales**

La transmission des exploitations agricoles et la diversification des activités sont des enjeux pour maintenir des actifs en milieu rural. Pour les CIVAM, les territoires ruraux ont vocation à être des espaces de vie et d'activité à part entière et non pas des territoires auxiliaires (destinés à servir de lieu de production alimentaire, de détente et de sommeil). Le maillage entre habitat, activité professionnelle, accès aux services, à la culture et aux loisirs doit être repensé. L'agriculture doit redevenir une activité connue et être reconnue comme essentielle.



### **III.2.1.3. Les modes d'organisation collective (coopération, éducation populaire)**

Les grandes coopératives ne permettent plus aux coopérateurs d'être maîtres du projet coopératif, voire de bénéficier des retombées de leur travail. Les CIVAM à travers leur fonctionnement, reposent sur les principes de l'éducation populaire et leur travail sur l'autonomie dans le collectif et disposent d'éléments permettant de questionner les dérives d'une coopération qui a perdu un sens qu'elle peut et se doit de retrouver. Cependant les CIVAM comme d'autres associations rencontrent des problèmes de renouvellement de bénévoles et d'administrateurs ; il devient nécessaire de faire évoluer leur fonctionnement pour inciter des jeunes à s'y engager.

### **III.2.2. CREAB Midi-Pyrénées**

Le Centre Régional de Recherche et d'Expérimentation en Agriculture Biologique de Midi-Pyrénées (CREAB MP) est une association née en 1989 sous l'impulsion des producteurs. Les membres adhérents sont les structures régionales suivantes : groupement de producteurs biologiques ; organismes économiques ; chambres d'agriculture ; établissements d'enseignement agricole et instituts techniques (nationaux).

Depuis 1994 le CREAB Midi-Pyrénées est membre du réseau de l'ITAB où il est le Centre Technique Spécialisé dans le domaine des grandes cultures biologiques. Ces liens avec l'ITAB permettent d'harmoniser la recherche au niveau national en travaillant sur des bases communes permettant des regroupements d'essais. Pour mener à bien les expérimentations le CREAB MP est soutenu financièrement par: le Conseil Régional de Midi-Pyrénées; l'Etat français et l'ONIGC. Le CREAB dispose également d'un soutien technique et scientifique par: les producteurs, les techniciens de développement, ARVALIS, le CETIOM, l'ENFA Toulouse, l'ESA Purpan, la FNAMS, l'INRA et l'ITAB.

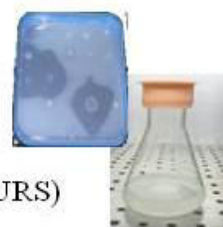
**Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole,  
en  
agro-écosystème Sud de France**



1. Diagnostic nodulaire en placettes paysannes



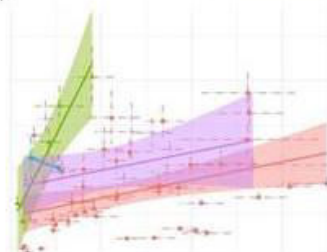
2. Aptitude des rhizobia à minéraliser le phytate  
(Milieux solide & liquide)



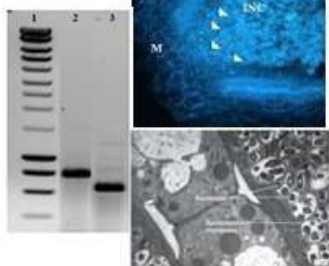
3. Efficacité d'Utilisation la Symbioses Rhizobienne (EURS)  
& d'Utilisation du Phosphore (EUP)



4. Caractérisation moléculaire  
Phylogénie (*recA*, *nod D*)  
Fonction (Phytases HAP, BPP)



5. Localisation de transcrits *in situ*



**Figure 57.** Schéma opérationnel

De l'agroécosystème au gène

### III.3. Diagnostic nodulaire

#### III.3.1. Généralités

Le diagnostic nodulaire consiste à mesurer la nodulation et la croissance, au stade de floraison-initiation de gousses, de la légumineuse de référence : la féverole, dans les régions où cette légumineuse est traditionnellement cultivée. La démarche consiste à (i) localiser les sites et les parcelles amendées ou non en engrais azotés et phosphatés ; (ii) mesurer la nodulation ainsi que les croissances aérienne, et racinaire ; (iii) réaliser des analyses physico-chimiques au niveau des échantillons végétaux (C, N, P) et de sols (P, CHN) ; (iv) déterminer l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EURS) par la relation entre la croissance végétale et la nodulation ; (v) établir une corrélation entre cette EURS et les paramètres édaphiques, culturels et environnementaux, d'autre part.

L'ensemble des données obtenues au champ et au laboratoire (i) GPS et caractéristiques morpho-pédologiques ; (ii) techniques culturales et génotype de la plante ; (iii) nodulation et croissance végétale ; (iv) paramètres biochimiques du sol et de la plante sont transposées dans un fichier XCel. Cette base de données d'une très grande importance est gérée au niveau de l'UMR Eco & Sols, afin d'être introduit dans la base générale de données du projet FABATROPIMED. Après analyse et comparaison des données locales, une extension aux multi-données, obtenues au niveau méditerranéen et tropical du projet, est ultérieurement réalisable. Notamment, en ce qui nous concerne, par l'intermédiaire d'une plateforme OwnCloud et l'utilisation de logiciels de statistique dans R.

Le diagnostic nodulaire est conduit sur trois ans (2011 à 2013), au niveau multilocal d'un agro-écosystème Sud de France. Le choix de la féverole est motivé par des critères socio-économiques ; la féverole faisant partie des principaux protéagineux cultivés en France. Le choix du stade phénologique à floraison de récolte, correspond au stade où l'activité fixatrice est maximale (Drevon et al., 2011; Kyei-Boahen et al., 2002). Ce stade phénologique correspond également à la fin de période végétative où l'acquisition de P semble avoir lieu. La comparaison des poids secs est une mesure indirecte qui permet de révéler les effets de l'infection des souches rhizobiennes sur la phénologie et la croissance. Le postulat de base étant que : des plantes, infectées par rapport à des non infectées par des rhizobia, cultivées en milieu déficient en N et P, permet d'attribuer une augmentation de biomasse sèche à la quantité d'azote fixé et de phosphore utilisé.

### **III.3.2. Echantillonnage des plantes, au champ**

L'échantillonnage et le prélèvement des plantes s'effectuent au champ, sur des placettes délimitées sur des zones homogènes de parcelles. Pour une analyse statistique robuste, un prélèvement minimum de vingt plants par placette est réalisé. Les féveroles sont récoltées à floraison et apparition des premières gousses. Le sol environnant les racines est prélevé pour des analyses physico-chimiques (N, P, CHN). Chaque point de prélèvement est géolocalisée par relevées GPS.

#### **III.3.2.1. Définition des placettes**

Une parcelle est divisée en deux placettes élémentaires minimales, après sélection d'un ensemble de plants phénotypiquement homogènes. Dans chacune des placettes, sont choisis 4 points homogènes de prélèvement, selon une répartition sous forme de Z et espacés d'environ 5 mètres. Sur chacun de ces points, cinq plants de féveroles sont prélevés avec leur sol proche des racines. Ces plants sont soigneusement déracinés dans leur motte de sol dans un horizon de 20 cm, à l'aide d'une bêche fourche. Pour chacun des points de prélèvement, cinq plants et le sol sont conservés en sac plastique identifié selon le modèle suivant : Ppq

P : nom ou numéro de la parcelle (Vinc, Cout, Las5 ...)

p : numéro de la placette (1, 2, 3 ...)

q : point de prélèvement de la placette (A, B, C, D)

Exemple : Vinc2A = Parcelle Vinc, placette numéro 2, point de prélèvement A.

#### **III.3.2.2. Paramètres relevés**

A chaque point de prélèvement, sont relevés les coordonnées GPS ainsi que tout facteur susceptible d'influencer la croissance des plantes tel que : l'exposition de la parcelle, la morphologie et la pédologie du sol. Sont également notés : le nom de l'espèce de féverole prélevée. Ces données permettent d'avoir un profil global de la parcelle. Les données GPS sont utilisées pour élaborer des plans de parcelles sur Google Earth..

### **III.3.3. Au laboratoire**

Les échantillons de plantes et de sol proche des racines, sont conservés en chambre froide à 4°C, avant traitement. Après récupération du sol proche des racines et lavage des parties racinaires, séchage, les biomasses des matières sèches nodulaires, aériennes et racinaires sont mesurées.

#### **III.3.3.1. Traitement des plantes**

Pour chacun des plants, dont la partie racinaire a été soigneusement lavée à l'eau du robinet et rincée à l'eau distillée, les parties aériennes et racinaires sont séparées à l'aide d'un sécateur, au niveau du noeud cotylédonnaire. Les nodules sont ensuite détachés de la partie racinaire et sont déposés dans un sachet de papier annoté du numéro attribué au champ (Ppq), additionné du numéro de la plante traitée (x). Chacune des plantes est ainsi nommée : Ppqx. Les biomasses nodulaire, aérienne et racinaire sont déterminées après séchage des échantillons 48H à 65°C. Ces échantillons sont conservés à température ambiante en vue d'analyses physico-chimiques.

Afin de caractériser ultérieurement la diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole, trois nodules frais sont récupérés sur chacun des plants. La biomasse fraîche nodulaire est déterminée et prise en considération lors des pesées des biomasses sèches nodulaires. Les nodules sont conservés à 4°C, en tubes plastiques de 2 ml annotés : Ppqx. Ils sont ensuite désinfectés 3 min dans de l'hypochlorite de calcium (CaClO) 3%, rincés 3 fois à l'eau distillée stérile, séchés et stockés en glycérol 50%, à -20°C. Les nodules récoltés peuvent également être conservés par dessiccation en chlorure de Calcium (Ca Cl<sub>2</sub>), selon la méthode de (Vincent, 1970).

#### **III.3.3.2. Traitement des sols**

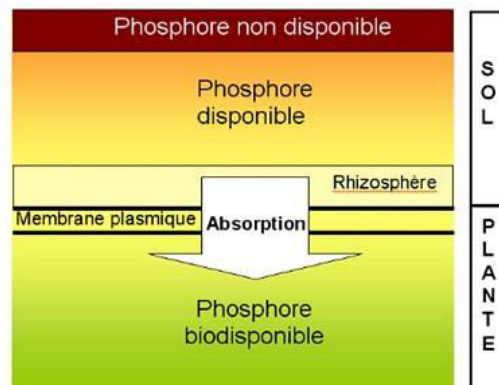
Les sols sont émiettés à la main, afin d'éliminer les agglomérats. Ils sont étalés en couche de 2 à 3 cm, dans des barquettes annotées du numéro d'échantillon attribué au champ (Ppq). Cette étape permet un séchage quasi homogène des sols, avec un taux d'humidité équivalent entre les échantillons. Les sols sont ensuite tamisés à 2 mm et broyés à 0.2 mm. Ils sont conditionnés en sachets plastiques, en vue d'analyses physico-chimiques : pH, P Olsen et CHN.

## III.4. Analyses physico-chimiques

### III.4.1. Généralités

L'acquisition du P du sol par la plante fait appel aux concepts de disponibilité du P du sol et de biodisponibilité du P pour la plante (Figure 58). Cette notion a été normalisée en 2006 par l'organisation internationale de standardisation « ISO/TC 190 »

La biodisponibilité en P concerne la quantité de P du sol prélevée par la plante, au travers de processus physiologiques d'absorption (Betencourt, 2012; Devau, 2010). Cette biodisponibilité en P pour la plante peut être indépendante de la teneur en P total du sol. La concentration en P disponible du sol, assimilable par la plante, correspond généralement à une faible fraction du P total du sol (Devau et al., 2009; Lanno et al., 2004). La disponibilité en P est évaluée en relation à la concentration en P du sol chimiquement extrait et à l'assimilation en P (P biodisponible) ou à la production de biomasse ou au rendement de la plante (Devau, 2010). De nombreuses méthodes d'extractions chimiques sont adaptées aux propriétés physico-chimiques et biologiques du sol (Delgado et al., 2010).



**Figure 58.** Schéma conceptuel de la relation entre disponibilité et biodisponibilité du phosphore

D'après : Lanno (2003).

### **III.4.2. La plante**

Les parties aériennes des plantes récoltées au stade floraison et séchées (65°C 48h) sont broyées pour des analyses de phosphore et d'azote. Une minéralisation est réalisée sur 0.2 g de matière sèche avec un mélange (1:1) acide sulfurique et perchlorique (Torres Aquino and Plassard, 2004). Le phosphore est déterminé par spectrophotométrie (430 nm) après colorimétrie au vert de malachite, selon (Ohno and Zibilske, 1991).

### **III.4.3. Le sol**

#### **III.4.3.1. Le pH**

Le protocole de mesure du pH du sol retenu, parmi les différentes méthodes, est celui standardisé par la norme ISO (NF ISO 10390) consistant en la mesure à l'aide de pH-mètre associée à une électrode en verre dans des extraits à l'eau (AFNOR, 1999), similaires à ceux utilisés pour des dosages de Pi, au vert de malachite. La conductivité de l'eau doit être inférieure ou égale à 0,2 mS/m, à 25°C et son pH supérieur à 5,6 (eau de grade 2, conformément à la norme ISO 3696). Réalisable sur des échantillons de sol frais ou après séchage à l'air ou à une température maximale de 40°C, nos analyses sont conduites sur des sols préalablement séchés à température ambiante. Les sols sont déposés dans des flacons bouchés, en présence de 5 volumes d'eau et sont mis en suspension par vortexage intensif, durant 5 min. Après décantation de 2 à 24 heures, le pH est mesuré sur 2 ml de solution soumise à deux centrifugations successives.

#### **III.4.3.2. le phosphore**

Le dosage du phosphore est réalisé sur des sols tamisés à 2 mm, selon la méthode Olsen (Olsen et al., 1954), adaptée à des sols basiques (Sims et al., 2000), tels que les sols méditerranéens.

### **III.4.3.3. Le carbone et l'azote**

Le dosage quantitatif du carbone et de l'azote total, sur des sols broyés à 0.2 mm, est réalisé par spectroscopie visible et proche infra-rouge (VisNIR), selon la norme ISO 17025 (Clairotte et al., 2013).

### **III.4.4. Analyses statistiques**

Les données de biomasses nodulaire, aérienne et racinaire, ainsi que physico-chimiques (plante et sol) sont reportées dans un tableau XCel et transférées dans une base de données disponible à l'UMR Eco et Sols. Ces données sont soumises à des analyses de variance (ANOVA), en utilisant le logiciel R (2.14.1). Les différentes moyennes sont comparées grâce au test HSD de Tukey à 5 % de probabilité. Les représentations graphiques (histogrammes, nuage de points et droites de régression) déterminant les EURS et les EUP, d'une part et les analyses en composantes principales (ACP), d'autre part, sont respectivement schématisées sous XCel et sous R.

## **III.5. Caractérisation fonctionnelle des rhizobia**

### **III.5.1. Isolement bactérien des nodosités**

L'isolement bactérien est réalisé sur des nodules de racines de féveroles prélevées en 2011 sur 17 placettes, à raison 6 nodosités par placette. Cet isolement rhizobien s'effectue sous hotte à flux laminaire, après broyage individuel des nodules, en tube de 2 ml, à l'aide d'un pilon en plastique et ensemencement d'un milieu de culture solide Yeast Extract-Mannitol (YEMA) et incubation à 28°C (Vincent, 1970). Ces isolats rhizobiens sont purifiés par repiquages successifs et sont sélectionnés sur leur aptitude à renoduler la plante hôte, après culture hydroaéroponique. Les souches rhizobiennes sont conservées sur milieu YEMA, à 4°C et mises en collection en milieu YEM additionné de 30% de glycérol, à - 80°C. Ces souches rhizobiennes sont utilisables pour des inoculations de milieux solides ou liquides spécifiques, en fonction des études phénotypiques, génotypiques et physiologiques envisagées (Figure 57).



Les inoculums destinés aux tests sur plante sont obtenus après culture bactérienne en milieu YEM liquide, sous agitation (120 rpm) à 28°C, à une densité cellulaire finale d'environ  $10^9$  ml<sup>-1</sup>.

### **III.5.2. Cinétique de croissance bactérienne**

Après culture sur milieu adapté, 2 ml de suspension bactérienne sont prélevés quotidiennement durant 7 jours. La cinétique de croissance bactérienne est déterminée après ajout de 0.5M HCl final, à la suspension et mesure d'absorbance (DO = 600 nm), sur spectrophotomètre UV. Des cinétiques de pH ainsi que des dosages de Pi sont parallèlement réalisées, après centrifugation de la suspension bactérienne. Les mesures de pH ainsi que les dosages de Pi sont ultérieurement réalisables, après congélation des surnageants.

### **III.5.3. Sélection de rhizobia aptes à minéraliser le phosphore**

La sélection de rhizobia aptes à dégrader le phosphore complexe prend en considération la solubilisation du P minéral et la minéralisation du P organique, sur milieux respectifs Tri-Calcium Phosphate (TCP) (Frey-Klett et al., 2005) et Phytate (Maougal et al., 2014b) modifié par Domergue, présente étude). Ce milieu de culture phytate modifié est dépourvu de solution tampon MOPS pH7, contre indiquée pour des cinétiques de pH des cultures bactériennes. Un screening sur milieu solide permet une sélection visuelle des isolats bactériens aptes à solubiliser et/ou minéraliser les deux types de P, sur la formation d'un halo dont le diamètre détermine l'intensité de l'activité bactérienne. Un dosage du Pi libéré en milieu de culture liquide permet de confirmer la capacité de solubilisation et/ou de minéralisation des souches bactériennes. Le test de solubilisation du P s'appuie sur deux tests en milieu TCP parallèles, en présence de deux types d'apports azotés (NH<sub>4</sub>Cl et KNO<sub>3</sub>). Ces tests permettent de s'affranchir d'une activité d'assimilation du P par acidification (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou alcalinisation (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) du milieu, uniquement liée à la production d'anions organiques. Un résultat positif sur les deux milieux est donc nécessaire pour confirmer la capacité solubilisatrice des souches bactériennes, vis-à-vis du P (Plassard, communication personnelle).

### **III.5.4. Propriétés symbiotiques des rhizobia**

#### **III.5.4.1. Généralités**

Les propriétés symbiotiques des rhizobia sont déterminées sur plantes, en fonction de leur infectivité (capacité à induire des nodosités racinaires) et de leur effectivité (aptitude à fixer l'azote). Pour des plantes inoculées avec des rhizobia et cultivées sur un milieu minéral limitant en azote, comme dans nos expériences, leur aptitude à fixer l'azote est directement corrélée à la biomasse des parties aériennes. Celles-ci permettent (i) d'évaluer l'aptitude des rhizobia natifs à renoduler la plante hôte ; (ii) déterminer la capacité d'adaptation des rhizobia, solubilisant ou minéralisant le P, en P-suffisant et déficient. Les plantes sont récoltées à floraison, environ 60 jours après inoculation, et les biomasses nodulaire (Psnod), aériennes (Pspa) et racinaires (Pspr), ainsi que les EUSR sont déterminées, selon le principe du diagnostic nodulaire.

#### **III.5.4.2. Inoculation et culture des féveroles, en hydroaéroponie**

Les graines de féveroles var. Castel sont stérilisées en solution extemporanée d'hypochlorite de calcium ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) 3%, 15 à 20 min. Après 5 rinçages et hydratation 1H en eau distillée, les graines sont déposées sur papier absorbant imbibé d'eau distillée et mises à germer 7 jours à 28°C. Les germinations homogènes sont inoculées et transférées en bouteille d'1L, selon la méthode Araújo et al. (2008). Après une semaine, celles-ci sont réinoculées 2 fois. En début de culture, 0.5 M d'urée starter de la symbiose, est ajouté à la solution nutritive 62.5 mM P final et celle-ci est remplacée, 15 jours après, par une solution 125 mM P, dépourvue d'urée (Hernandez and Drevon, 1991). Une solution de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) est ajoutée au milieu de culture pour compenser l'acidification liée à l'association symbiotique rhizobium-féverole. Les tests en P suffisant ou déficient sont respectivement réalisés avec des apports en P de 125 et 25 mM.

### **III.5.5. Caractérisation géotypique des bactéries**

#### **III.5.5.1. Extraction d'ADN**

Une colonie isolée est repiquée en masse sur milieu TY gélosé ou YEM modifié (mannitol remplacé par du maltose). L'utilisation de maltose comme source carbonée diminue l'accumulation de polysaccharides et permet, ainsi, une meilleure extraction d'ADN bactérien. Après incubation 48 heures à 28°C, le tapis bactérien est lavé 2 fois à l'eau bidistillée stérile et la densité optique est mesurée. A 100 µL de suspension bactérienne DO (620) = 2, est ajouté 100 µL de Tris-Cl (10 mM, pH 8,3) et 20 µL de 1 mg/mL de protéinase K (Boehringer). Après incubation 2 heures à 55°C, la protéinase K est dénaturée 10 min à 100°C et l'ADN est stocké à - 20°C.

#### **III.5.5.2. Amplification *in vitro***

L'amplification d'ADN est réalisée *in vitro* par la technique de Polymerase Chain Reaction ou PCR (Mullis and Faloona, 1987), en thermocycleur Applied Biosystem (Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer). Le programme classique (dénaturation, hybridation, polymérisation) est utilisé pour les couples d'amorces spécifiques et le programme " Touch-down " (Don et al., 1991), pour des amorces dégénérées. L'amplification d'ADN est réalisée dans un volume réactionnel de 50 µL, selon les recommandations du fournisseur (Promega) et les amplicons sont visualisés sur gel d'agarose 1% / TAE (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8,3), après électrophorèse (100 Volts 45 min). Le dépôt d'un marqueur de taille moléculaire Smart Ladder (Eurogentec) aux extrémités du gel permet la détermination des poids moléculaires et la quantification approximative sur 4 µL d'amplicon par rapport à 1 µg de marqueur. Les amplicons uniques sont directement séquencés chez Genoscreen ([seq1@genoscreen.fr](mailto:seq1@genoscreen.fr)), alors que les multi-amplicons sont préalablement purifiés sur colonnes Quiagen, selon les recommandations du fournisseur " *QIAquick gel extraction Kit* ".

### **III.5.5.3. Analyse et alignement des séquences**

Les ddNTPs\*, associés à des fluorochromes spécifiques de chacune des bases (A, T, C, G) permettent une restitution des séquences, sous forme de pics colorés. Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel MEGA (<http://www.megasoftware.net>). La séquence nucléotidique est déterminée par blast en comparaison à des séquences déposées dans les banques de données <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul et al., 1990).

### **III.5.6. Tests enzymatiques : activité phytase**

#### **III.5.6.1. Au niveau bactérien**

200 ml d'une culture bactérienne en phase stationnaire en milieu liquide 6 mM phytate liquide sont centrifugés et traités selon le protocole de (Maougal et al., 2014a). Le dosage du Pi libéré est réalisé selon la technique du vert de malachite (Ohno and Zibilske, 1991). Des souches rhizobiennes témoins, *S. meliloti* (Smel) et *S. medicae* (Smed) ainsi que PGPR à activité phytase, telle que *B. subtilis* (Bs), sont parallèlement testées. Le Pi libéré ainsi que les variations de pH, sont déterminées en fin de culture.

#### **III.5.6.2. Au niveau nodulaire**

Après culture en hydroaéroponie de féveroles inoculées avec les isolats rhizobiens aptes à minéraliser le phytate, les nodules sont récoltés à floraison. Ceux-ci sont traités selon le protocole d'Araújo et al. (2008), immédiatement après récolte ou après congélation à -20°C. L'influence des souches rhizobiennes sur l'adaptation des féveroles à différents apports en P-suffisant (125 mM) ou déficient (25 mM) peut ainsi être déterminée.

### **III.5.7. Localisation génétique *in situ***

La localisation des gènes *in situ* s'appuie sur une Réverse Transcription-PCR (RT-PCR) selon les techniques décrites par Molina et al. (2011). Celle-ci est réalisée sur des sections de nodules de 3 mm de diamètre et de 50 µm d'épaisseur, prélevés à floraison, après culture en hydroaéroponie. La RT, à l'aide d'amorces anti-sens, est soumise à PCR. L'amplification RT-

PCR est visualisée par microscopie à épifluorescence, en utilisant un microscope Axio Imager M2 (Zeiss, Göttingen, Allemagne) équipé d'un condensateur à épifluorescence, d'un jeu de filtres Hoechst/DAPI et d'une caméra Axio MRM Version 3. L'analyse d'images est réalisée à l'aide du logiciel Zen (Bargaz et al., 2015; Lazali et al., 2016a; Maougal et al., 2014a).

### **III.5. 8. Dosage des acides organiques**

Le dosage des acides organiques est réalisé par chromatographie ionique (Dionex BIO LC), selon la méthode Waithaisong et al. (2015).

### **Remerciements**

Ce travail a été soutenu par le grand projet fédératif FABATROPIMED, financé par la fondation Agropolis sous la référence ID 1001-009.



## Références

- Abd-Alla, M.H. (1994). Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae phosphatases. *Biol. Fertil. Soils* *18*, 216–218.
- Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.-W.E., Nafady, N.A., Khalaf, D.M., and Morsy, F.M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol. Res.* *169*, 49–58.
- Abel, S., Ticconi, C.A., and Delatorre, C.A. (2002). Phosphate sensing in higher plants. *Physiol. Plant.* *115*, 1–8.
- Abelson, P.H. (1999). A Potential Phosphate Crisis. *Science* *283*, 2015–2015.
- Adesemoye, A.O., and Kloepper, J.W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *85*, 1–12.
- Ae, N., and Otani, T. (1997). The role of cell wall components from groundnut roots in solubilizing sparingly soluble phosphorus in low fertility soils. *Plant Soil* *196*, 265–270.
- Afzal, M., Khan, Q.M., and Sessitsch, A. (2014). Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere* *117*, 232–242.
- Agler, M.T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., and Kemen, E.M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLOS Biol.* *14*, e1002352.
- Ahemad, M. (2015). Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. *3 Biotech* *5*, 111–121.
- Ahemad, M., and Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. - Sci.* *26*, 1–20.
- Akhmetova, A.I., Nyamsuren, C., Balaban, N.P., and Sharipova, M.R. (2013). Isolation and characterization of a new bacillary phytase. *Russ. J. Bioorganic Chem.* *39*, 384–389.
- Akhter, S. (2014). Interactions between *Rhizobium*, antagonistic bacteria and fungal pathogens in faba bean (Swedish University).
- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., and Rashid, M. (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agric. Biol.* *4*, 454–458.
- Al-Asheh, S., and Duvnjak, Z. (1995). Phytase production and decrease of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *11*, 228–231.
- Allaire, G., and Boyer, R. (1995). La grande transformation de l'agriculture: Lectures conventionnalistes et régulationnistes (Quae).
- Almeida, J.F., Hartwig, U.A., Frehner, M., Nösberger, J., and Lüscher, A. (2000). Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* *51(348)*, 1289–1297.

- Al-Niemi, T.S., Kahn, M.L., and McDermott, T.R. (1997a). P Metabolism in the Bean-Rhizobium tropici Symbiosis. *Plant Physiol.* *113*, 1233–1242.
- Altieri, M.A., and Toledo, V.M. (2011). The agroecological revolution in Latin America: rescuing nature, ensuring food sovereignty and empowering peasants. *J. Peasant Stud.* *38*, 587–612.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* *215*, 403–410.
- Amtmann, A., Hammond, J.P., Armengaud, P., and White, P.J. (2005). Nutrient Sensing and Signalling in Plants: Potassium and Phosphorus. In *Advances in Botanical Research*, (Elsevier), pp. 209–257.
- Araújo, A.P., Plassard, C., and Drevon, J.J. (2008). Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant Soil* *312*, 129–138.
- Arsene, F., Kaminski, P.A., and Elmerich, C. (1996). Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J. Bacteriol.* *178*, 4830–4838.
- Aschi, A., Aubert, M., Riah-Anglet, W., Néliu, S., Dubois, C., Akpa-Vinceslas, M., and Trinsoutrot-Gattin, I. (2017). Introduction of Faba bean in crop rotation: Impacts on soil chemical and biological characteristics. *Appl. Soil Ecol.* *120*, 219–228.
- Attar, H.A., Blavet, D., Selim, E.M., Abdelhamid, M.T., and Drevon, J.J. (2012). Relationship between phosphorus status and nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under drip irrigation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* *9*, 1–13.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., et al. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* *66*, 44–77.
- Azeem, M., Riaz, A., Chaudhary, A.N., Hayat, R., Hussain, Q., Tahir, M.I., and Imran, M. (2015). Microbial phytase activity and their role in organic P mineralization. *Arch. Agron. Soil Sci.* *61*, 751–766.
- Baetz, U., and Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci.* *19*, 90–98.
- Balaban, N.P., Suleimanova, A.D., Valeeva, L.R., Chastukhina, I.B., Rudakova, N.L., Sharipova, M.R., and V. Shakirov, E. (2017). Microbial Phytases and Phytate: Exploring Opportunities for Sustainable Phosphorus Management in Agriculture. *Am. J. Mol. Biol.* *07*, 11–29.
- Bargaz, A., Ghoulam, C., Faghire, M., Aslan Attar, H., and Drevon, J.-J. (2011). The nodule conductance to O<sub>2</sub> diffusion increases with high phosphorus content in the *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis. *Symbiosis* *53*, 157–164.
- Bargaz, A., Zaman-Allah, M., Farissi, M., Lazali, M., Drevon, J.-J., Maougal, R.T., and Carlsson, G. (2015). Physiological and Molecular Aspects of Tolerance to Environmental Constraints in Grain and Forage Legumes. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 18976.
- Bastian, O., Syrbe, R.-U., Rosenberg, M., Rahe, D., and Grunewald, K. (2013). The five pillar EPPS framework for quantifying, mapping and managing ecosystem services. *Ecosyst. Serv.* *4*, 15–24.



- Bedoussac, L., and Justes, E. (2007). Is durum wheat–winter pea intercropping efficient to improve the use of N in low input farming? In *The 15th Nitrogen Workshop*. 2007-05-28/2007-05-30, Lleida, ESP, (Editorial Milenio), p.
- Benadis, C., Bekki, A., Lazali, M., and Drevon, J.-J. (2013). Rhizosphere symbiots valorisation: Common bean-rhizobia symbiosis adaptation to P deficiency in Ain Temouchent agro-ecosystem in Algeria (Universidad de Sevilla).
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., and Bakker, P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* *17*, 478–486.
- Bergkemper, F., Kublik, S., Lang, F., Krüger, J., Vestergaard, G., Schloter, M., and Schulz, S. (2016). Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. *J. Microbiol. Methods* *125*, 91–97.
- Betencourt, É. (2012). Interactions entre céréale et légumineuse en association et acquisition de phosphore du sol: processus rhizosphériques sous-jacents. PhD CIRAD Montp. SupAgro Fr.
- Bhattacharyya, P.N., and Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 1327–1350.
- Bodson, B., and Vandenberghe, C. (2013). Gestion durable de l’azote au-delà de la seule problématique «nitrate». *17*, 297–300.
- Bohn, L., Meyer, A.S., and Rasmussen, S.K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* *9*, 165–191.
- Bolland, M.D.A., and Paynter, B.H. (1990). Increasing phosphorus concentration in seed of annual pasture legume species increases herbage and seed yields. *Plant Soil* *125*, 197–205.
- Bolland, M.D.A., Siddique, K.H.M., Loss, S.P., and Baker, M.J. (1999). Comparing responses of grain legumes, wheat and canola to applications of superphosphate. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* *53*, 157–175.
- Briat, J.-F., and Job, D. (2017). Les sols et la vie souterraine: Des enjeux majeurs en agroécologie (Quae).
- Brockwell, J., Bottomley, P.J., and Thies, J.E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. In *Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems*, J.K. Ladha, and M.B. Peoples, eds. (Springer Netherlands), pp. 143–180.
- Broothaerts, W., Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L.M.A., Yang, W., Mayer, J.E., Roa-Rodríguez, C., and Jefferson, R.A. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* *433*, 629–633.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S., and Perret, X. (2000). Keys to Symbiotic Harmony. *J. Bacteriol.* *182*, 5641–5652.
- Broughton, W.J., Zhang, F., Perret, X., and Staehelin, C. (2003a). Signals exchanged between legumes and Rhizobium: agricultural uses and perspectives. *Plant Soil* *252*, 129–137.

- Broughton, W.J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003b). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant Soil* 252, 55–128.
- Brunel, B., Domergue, O., Maure, L., Brahic, P., Galiana, A., Josa, R., Lajudie, P.D., Attallah, T., Risk, H., El-Hajj, S., et al. (2007). Potentialité des associations symbiotiques plantes-micro-organismes pour réhabiliter des sites fortement dégradés en milieu méditerranéen. *Cah. Agric.* 16, 324–329 (1).
- Brunet, R. (1957). Quelques études pédologiques dans le Sud-Ouest : Publications des Annales Agronomiques (1956, série A). *Rev. Géographique Pyrén. Sud-Ouest* 28, 331–332.
- Burnett, V.F., Newton, P.J., and Coventry, D.R. (1997). Effect of seed source and seed phosphorus content on the growth and yield of wheat in north-eastern Victoria. *Aust. J. Exp. Agric.* 37, 191–197.
- Busby, P.E., Soman, C., Wagner, M.R., Friesen, M.L., Kremer, J., Bennett, A., Morsy, M., Eisen, J.A., Leach, J.E., and Dangl, J.L. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS Biol.* 15, e2001793.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J., and Thomas-Oates, J.E. (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29, 453–464.
- Carter, J., Gardner, W., and Gibson, A. (1994). Improved growth and yield of Faba beans (*Vicia faba* cv. Fiord) by inoculation with strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* in acid soils in south west Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 45, 613–623.
- Cheng, C., and Lim, B.L. (2006). Beta-propeller phytases in the aquatic environment. *Arch. Microbiol.* 185, 1–13.
- Choi, H.-K., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J.-H., Kalo, P., Penmetsa, R.V., Seres, A., Kulikova, O., et al. (2004). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166, 1463–1502.
- Choi, Y.M., Suh, H.J., and Kim, J.M. (2001). Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Protein Chem.* 20, 287–292.
- Chu, H.-M., Guo, R.-T., Lin, T.-W., Chou, C.-C., Shr, H.-L., Lai, H.-L., Tang, T.-Y., Cheng, K.-J., Selinger, B.L., and Wang, A.H.-J. (2004). Structures of *Selenomonas ruminantium* Phytase in Complex with Persulfated Phytate: DSP Phytase Fold and Mechanism for Sequential Substrate Hydrolysis. *Structure* 12, 2015–2024.
- Clairotte, M., Martin, A., Villeneuve, M., and Barthès, B. (2013). Répétabilité et reproductibilité de la mesure: application des profils d'exactitude au dosage du carbone du sol et à sa prédiction par VisNIRS. In 14. Rencontres HélioSPIR: Spectrométrie Proche Infrarouge et Hétérogénéité.
- Cleland and Harpole (2010). Nitrogen enrichment and plant communities - Cleland - 2010 - Annals of the New York Academy of Sciences - Wiley Online Library.
- Corby, H.D.L. (1981). The systematic value of leguminous root nodules In: Polhill, R, M, , Raven, P, H ed(s). *Advances in legume systematics 2* Royal Botanic Gardens: Kew. pp. 657-69. Brief survey. J. Leg\_Caes, Leg\_Mim, Root nodules, Leg\_Pap (PMBD, 185702192).

- Cordell, D., and Neset, T.-S.S. (2014). Phosphorus vulnerability: A qualitative framework for assessing the vulnerability of national and regional food systems to the multi-dimensional stressors of phosphorus scarcity. *Glob. Environ. Change* 24, 108–122.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., and White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Glob. Environ. Change* 19, 292–305.
- Cullimore, J.V., Ranjeva, R., and Bono, J.-J. (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6, 24–30.
- Dagnelie, P. (2011). *Statistique théorique et appliquée: inférence statistique à une et à deux dimensions (Tome II)*. (Bruxelles: De Boeck).
- Dakora, F.D., and Phillips, D.A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245, 35–47.
- Daoui, K. (2007). *Recherche de stratégies d'amélioration de l'efficacité d'utilisation du phosphore chez la fève (Vicia faba L.) dans les conditions d'agriculture pluviale au Maroc / Research of strategies for improving phosphorus use efficiency in Vicia faba L. conducted in pluvial conditions in Morocco*". Thèse 228.
- Daur, I., Sepetoğlu, H., and Sindel, B. (2011). Dynamics of Faba Bean Growth and Nutrient Uptake and Their Correlation with Grain Yield. *J. Plant Nutr.* 34, 1360–1371.
- Dawson, C.J., and Hilton, J. (2011). Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy* 36, S14–S22.
- Delgado, A., and Torrent, J. (2001). Comparison of Soil Extraction Procedures for Estimating Phosphorus Release Potential of Agricultural Soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32, 87–105.
- Delgado, A., Del Campillo, M. del C., and Torrent, J. (2010). Limitations of the Olsen method to assess plant-available phosphorus in reclaimed marsh soils. *Soil Use Manag.* 26, 133–140.
- Demers, I. (2008). *Formes et disponibilité du phosphore de composts utilisés comme amendements de sols agricoles, pour l'obtention du grade de maître des sciences (M. Se.)*. Laval (Québec), 92p.
- Depret, G. (2008). *Importance de la variabilité génétique bactérienne sur le fonctionnement de la symbiose Rhizobium leguminosarum biovar viciae avec le pois (Pisum sativum L.)*. Thèse. Dijon.
- Devau, N. (2010). *Processus rhizosphériques déterminant la disponibilité en phosphore: apport de la modélisation mécaniste géochimique*. Thèse. Montpellier SupAgro.
- Devau, N., Cadre, E.L., Hinsinger, P., Jaillard, B., and Gérard, F. (2009). Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modelling approaches. *Appl. Geochem.* 24, 2163–2174.
- Dinkelaker, B., and Marschner, H. (1992). In vivo demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. *Plant Soil* 144, 199–205.
- Dixon, R., and Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 621–631.

- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., and Mattick, J.S. (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* *19*, 4008.
- Doyle, J.J., and Luckow, M.A. (2003). The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *Plant Physiol.* *131*, 900–910.
- Drevon, J.-J., and Sifi, B. (2003). Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen: Carthage (Tunisie), 13-16 octobre 1998 ; Montpellier (France), 9-13 juillet 2000 (Quae).
- Drevon, J.-J., Alkama, N., Araujo, A., Beebe, S., Blair, M.W., Hamza, H., Jaillard, B., Lopez, A., Martinez-Romero, E., Rodino, P., et al. (2011). Nodular diagnosis for ecological engineering of the symbiotic nitrogen fixation with legumes. *Procedia Environ. Sci.* *9*, 40–46.
- Drevon, J.J., Abadie, J., and Alkama, N. (2015). Phosphorus Use Efficiency for N<sub>2</sub> fixation in the Rhizobial with legume (John Wiley & Sons).
- Duc, G. (1997). Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res.* *53*, 99–109.
- Duc, G., Mignolet, C., Carrouée, B., and Huyghe, C. (2010a). Importance économique passée et présente des légumineuses: Rôle historique dans les assolements et les facteurs d'évolution. *Innov. Agron.* *11*, 1–24.
- Duc, G., Bao, S., Baum, M., Redden, B., Sadiki, M., Suso, M.J., Vishniakova, M., and Zong, X. (2010b). Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Res.* *115*, 270–278.
- Duputel, M. (2013). Modélisation mécaniste des interactions rhizosphériques déterminant la facilitation d'acquisition du phosphore en association céréale-légumineuse (Montpellier, SupAgro).
- Eisen, J.A. (1995). The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: Comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J. Mol. Evol.* *41*, 1105–1123.
- El-Din, S.M.S.B., and Moawad, H. (1988). Enhancement of nitrogen fixation in lentil, faba bean, and soybean by dual inoculation with *Rhizobia* and mycorrhizae. *Plant Soil* *108*, 117–123.
- Elkhalil, E.A.I., Männer, K., Borriss, R., and Simon, O. (2007). In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* *48*, 64–70.
- Fabre, S., Gully, D., Poitout, A., Patrel, D., Arrighi, J.-F., Giraud, E., Czernic, P., and Cartieaux, F. (2015). Nod Factor-Independent Nodulation in *Aeschynomene evenia* Required the Common Plant-Microbe Symbiotic Toolkit. *Plant Physiol.* *169*, 2654–2664.
- Fan, C.-M., Wang, Y.-H., Zheng, C.-Y., and Fu, Y.-F. (2013). Fingerprint motifs of phytases. *Afr. J. Biotechnol.* *12*.
- Farhat, A., Chouayekh, H., Farhat, M.B., Bouchaala, K., and Bejar, S. (2008). Gene Cloning and Characterization of a Thermostable Phytase from *Bacillus subtilis* US417 and Assessment of its Potential as a Feed Additive in Comparison with a Commercial Enzyme. *Mol. Biotechnol.* *40*, 127–135.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M. (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* *52*, 61–76.

- Franche, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321, 35–59.
- Francis, C., Lieblein, G., Gliessman, S., Breland, T.A., Creamer, N., Harwood, R., Salomonsson, L., Helenius, J., Rickerl, D., Salvador, R., et al. (2003). Agroecology: The Ecology of Food Systems. *J. Sustain. Agric.* 22, 99–118.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.-L., Courrier, S., Roux, C.L., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.-C., and Garbaye, J. (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol.* 165, 317–328.
- Fry, J. (2000). myo-Inositol metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. Thèse.
- Fry, J., Wood, M., and Poole, P.S. (2001). Investigation of myo-Inositol Catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and Its Effect on Nodulation Competitiveness. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 14, 1016–1025.
- Fu, D., Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Yang, P., Meng, K., Bai, Y., Wu, N., and Yao, B. (2008). A highly pH-stable phytase from *Yersinia kristeensenii*: Cloning, expression, and characterization. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 499–505.
- Gage, D.J., and Margolin, W. (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 613–617.
- Galbraith, M.P., Feng, S.F., Borneman, J., Triplett, E.W., de Bruijn, F.J., and Rossbachl, S. (1998). A functional myo-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 144, 2915–2924.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., et al. (2001). The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668–672.
- Gardner, W.K., and Boundy, K.A. (1983). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. IV. The effect of interplanting wheat and white lupin on the growth and mineral composition of the two species. *Plant Soil* 70, 391–402.
- Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., and Young, J.P. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2037–2048.
- George, T.S., Simpson, R.J., Hadobas, P.A., and Richardson, A.E. (2005). Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnol. J.* 3, 129–140.
- George, T.S., Simpson, R.J., Gregory, P.J., and Richardson, A.E. (2007). Differential interaction of *Aspergillus niger* and *Peniophora lycii* phytases with soil particles affects the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biol. Biochem.* 39, 793–803.
- George, T.S., Fransson, A.-M., Hammond, J.P., and White, P.J. (2011). Phosphorus Nutrition: Rhizosphere Processes, Plant Response and Adaptations. In *Phosphorus in Action*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 245–271.

- Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 346–352.
- Ghanimi, R. (2014). Analyse agro-physiologique de la réaction de la symbiose fève-rhizobia sous déficit en phosphore. (Marrakech).
- Ghosh, M., Sodhi, S.S., Sharma, N., Mongre, R.K., Kim, J.H., Kim, N.E., Jiaojiao, Z., and Jeong, D.K. (2014). Biotechnological Approach to Improve the Nutritional Availability in Livestock and Consequence for Reduction the Environment Pollution by Implement of Transgenic Phytase in Animal Feed. *J. Anim. Res.* 4, 263.
- Glick, B.R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria Mechanisms and Applications. *Scientifica Article ID 963401*, 15 p.
- Gliessman, S. (2013). Agroecology: Growing the Roots of Resistance. *Agroecol. Sustain. Food Syst.* 37, 19–31.
- Gobat, J.-M., Aragno, M., and Matthey, W. (2004). The living soil: fundamentals of soil science and soil biology (Science Publishers).
- Goldstein, A.H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1, 51–57.
- Gontia, I., Tantai, K., Prasad Singh Rajput, L., and Tiwari, S. (2012). Transgenic Plants Expressing Phytase Gene of Microbial Origin and Their Prospective Application as Feed. In *Food Technology and Biotechnology*, pp. 3–10.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Gowda, C.L.L., and Krishnamurthy, L. (2014). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech* 5, 355–377.
- Gougoulas, C., Clark, J.M., and Shaw, L.J. (2014). The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2362–2371.
- Graham, P.H. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *PLANT Physiol.* 131, 872–877.
- Graham, P.H., and Vance, C.P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.* 65, 93–106.
- Graham, P.H., and Vance, C.P. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol.* 131, 872–877.
- Greaves, M.P., and Webley, D.M. (1965). A Study of the Breakdown of Organic Phosphates by Microorganisms from the Root Region of Certain Pasture Grasses. *J. Appl. Bacteriol.* 28, 454–465.
- Greiner, R. (2002). Purification and Characterization of Three Phytases from Germinated Lupine Seeds (*Lupinus albus* Var. Amiga). *J. Agric. Food Chem.* 6856–6864.
- Greiner, R., and Konietzny, U. (2010). Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzym. Farm Anim. Nutr.* 2, 96–128.

- Greiner, R., Jany, K.-D., and Larsson Alminger, M. (2000a). Identification and Properties of myo - Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases (Phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*). *J. Cereal Sci.* *31*, 127–139.
- Greiner, R., Konietzny, U., and Jany, K.D. (1993). Purification and Characterization of Two Phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* *303*, 107–113.
- Greiner, R., Lim, B.L., Cheng, C., and Carlsson, N.-G. (2007). Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propeller phytases of different origins. *Can. J. Microbiol.* *53*, 488–495.
- Griffon, M. (2006a). Les agricultures du Sud et les responsabilités européennes. Le monde peut-il nourrir tout le monde? sécuriser l'alimentation de la planète.
- Griffon, M. (2006b). *Nourrir la planète* (Odile Jacob).
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., and Poole, P.S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*, J.J. Adu-Gyamfi, ed. (Springer Netherlands), pp. 133–143.
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy, A.C., Dangl, J.L., Knight, R., Ley, R., et al. (2015). Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. *Cell Host Microbe* *17*, 603–616.
- Haefner, S., Knietzsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., and Zelder, O. (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *68*, 588–597.
- Halbleib, C.M., and Ludden, P.W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* *130*, 1081–1084.
- Hancock, J.F. (2012). *Plant Evolution and the Origin of Crop Species* (CABI).
- Hansen, A.P., Choudhary, D.K., Agrawal, P.K., and Varma, A. (2017). *Rhizobium Biology and Biotechnology* (Springer).
- Hawkins, P.T., Poyner, D.R., Jackson, T.R., Letcher, A.J., Lander, D.A., and Irvine, R.F. (1993). Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate | *Biochemical Journal*. *Biochem. J.* *294*, 929–934.
- Hayes, J.E., Richardson, A.E., and Simpson, R.J. (2000). Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biol. Fertil. Soils* *32*, 279–286.
- Heinrich, K., Ryder, M.H., and Murphy, P.J. (2001). Early production of rhizopine in nodules induced by *Sinorhizobium meliloti* strain L5-30. *Can. J. Microbiol.* *47*, 165–171.
- Hernandez, G., and Drevon, J.-J. (1991). Influence of Oxygen and Acetylene during in situ Open-flow Assays of Nitrogenase Activity (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Reduction) in *Phaseolus vulgaris* Root Nodules. *J. Plant Physiol.* *138*, 587–590.
- Hilali, A., Prévost, D., Broughton, W.J., and Antoun, H. (2001). [Effects of inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* on wheat cultivated in clover crop rotation agricultural soil in Morocco.]. *Can. J. Microbiol.* *47*, 590–593.

- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237, 173–195.
- Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., and Zhang, F. (2011). P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiol.* 156, 1078–1086.
- Hinsinger, P., Herrmann, L., Lesueur, D., Robin, A., Trap, J., Waithaisong, K., and Plassard, C. (2015). Impact of roots, microorganisms and microfauna on the fate of soil phosphorus in the rhizosphere. *Ann Plant Rev Phosphorus Metab Plants* 48, 377.
- Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122, 211–237.
- Hoffland, E., Findenegg, G.R., and Nelemans, J.A. (1989). Solubilization of rock phosphate by rape. *Plant Soil* 113, 155–160.
- Hong, Y.-F., Liu, C.-Y., Cheng, K.-J., Hour, A.-L., Chan, M.-T., Tseng, T.-H., Chen, K.-Y., Shaw, J.-F., and Yu, S.-M. (2008). The sweet potato sporamin promoter confers high-level phytase expression and improves organic phosphorus acquisition and tuber yield of transgenic potato. *Plant Mol. Biol.* 67, 347–361.
- Huang, H., Shi, P., Wang, Y., Luo, H., Shao, N., Wang, G., Yang, P., and Yao, B. (2009). Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1508–1516.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., and Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148, 2097–2109.
- Jia, Y., Gray, V.M., and Straker, C.J. (2004). The Influence of Rhizobium and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Nitrogen and Phosphorus Accumulation by *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 94, 251–258.
- Jiang, C., Sheng, X., Qian, M., and Wang, Q. (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant Burkholderia sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 72, 157–164.
- Jones, M.D., Durall, D.M., and Tinker, P.B. (1991). Fluxes of carbon and phosphorus between symbionts in willow ectomycorrhizas and their changes with time. *New Phytol.* 119, 99–106.
- Jorquera, M., Martínez, O., Maruyama, F., Marschner, P., and de la Luz Mora, M. (2008a). Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes Environ. JSME* 23, 182–191.
- Jorquera, M.A., Hernández, M.T., Rengel, Z., Marschner, P., and Mora, M. de la L. (2008b). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol. Fertil. Soils* 44, 1025–1034.
- Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M.T., Romero, D., Menezes-Blackburn, D., and De La Luz Mora, M. (2011). Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils: Phytase genes in volcanic soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 163–172.



Jossi, M. (2008). Rhizosphere Bacterial Communities Associated with *Lolium Perenne*: Structuration and Plant-mediated Influences. Thèse d'état de la faculté de Neuchatel de Suisse.

Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Chauhan, V.B., Chand, R., and Verma, M. (2013). Potential Eco-friendly Soil Microorganisms: Road Towards Green and Sustainable Agriculture. In *Management of Microbial Resources in the Environment*, A. Malik, E. Grohmann, and M. Alves, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 249–287.

Kaushik, G. (2015). *Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends* (Springer).

Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszyński, A., Carlson, R.W., Thygesen, M.B., Sandal, N., Asmussen, M.H., et al. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523, 308–312.

Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., and Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2079–2085.

Khan, M.K., and Yoshida, T. (1994). Nitrogen fixation in peanut determined by acetylene reduction method and <sup>15</sup>N-isotope dilution technique. *Soil Sci Plant Nutr* 40, 283–291.

Khan, M.S., Zaidi, A., and Ahmad, E. (2014). Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms*, M.S. Khan, A. Zaidi, and J. Musarrat, eds. (Springer International Publishing), pp. 31–62.

Khosravi H (2004). Evaluation of some rhizobium inocula on growth of faba-bean in Mazandaran. 18.

Kohler, P.R.A., Zheng, J.Y., Schoffers, E., and Rossbach, S. (2010). Inositol Catabolism, a Key Pathway in *Sinorhizobium meliloti* for Competitive Host Nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7972–7980.

Konietzny, U., and Greiner, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 791–812.

Konietzny, U., and Greiner, R. (2004). Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Braz. J. Microbiol.* 35, 12–18.

Korovuo, J., Rouvinen, J., and Hatzack, F. (2000). Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem. J.* 352, 623–628.

Kouchi, H., and Yoneyama, T. (1986). Metabolism of [<sup>13</sup>C]-labelled photosynthate in plant cytosol and bacteroids of root nodules of *Glycine max*. *Physiol. Plant.* 68, 238–244.

Krämer, S., and Green, D.M. (2000). Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biol. Biochem.* 32, 179–188.

Kumar, V., and Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fertil. Soils* 28, 301–305.

Kumar, V., Singh, G., Verma, A.K., and Agrawal, S. (2012). In Silico Characterization of Histidine Acid Phytase Sequences. *Enzyme Res.* 2012, 1–8.

- Kumar, V., Yadav, A.N., Verma, P., Sangwan, P., Saxena, A., Kumar, K., and Singh, B. (2017).  $\beta$ -Propeller phytases: Diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications. *Int. J. Biol. Macromol.* *98*, 595–609.
- Kyei-Boahen, S., Slinkard, A., and Walley, F. (2002). Time course of N<sub>2</sub> fixation and growth of chickpea. *Biol. Fertil. Soils* *35*, 441–447.
- Laboski, C.A.M., and Lamb, J.A. (2004). Impact of manure application on soil phosphorus sorption characteristics and subsequent water quality implications. *Soil Sci.* *169*, 440–448.
- Laguerre, G., Van Berkum, P., Amarger, N., and Prévost, D. (1997). Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 4748–4758.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M.-R., and Amarger, N. (2003). Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* for Nodulation of Host Legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 2276–2283.
- Langlade, N.B., Messerli, G., Weisskopf, L., Plaza, S., Tomasi, N., Smutny, J., Neumann, G., Martinoia, E., and Massonneau, A. (2002). ATP citrate lyase: cloning, heterologous expression and possible implication in root organic acid metabolism and excretion. *Plant Cell Environ.* *25*, 1561–1569.
- Lanno, R.P. (2003). Proceedings from the Pellston Workshop on Assessing Contaminated Soils: From Soil-Contaminant Interactions to Ecosystem Management, Pellston, Michigan, USA, 23-27 September 1998. *Proc. Pellston Workshop Assess. Contam. Soils Soil-Contam. Interact. Ecosyst. Manag. Pellston Mich. USA 23-27 Sept. 1998.*
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., and Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *57*, 39–47.
- Lazali, M., Zaman-Allah, M., Amenc, L., Ounane, G., Abadie, J., and Drevon, J.-J. (2013a). A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*–rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta* *238*, 317–324.
- Lazali, M., Zaman-Allah, M., Amenc, L., Ounane, G., Abadie, J., and Drevon, J.-J. (2013b). A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*–rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta* *238*, 317–324.
- Lazali, M., Bargaz, A., Brahimi, S., Amenc, L., Abadie, J., and Drevon, J.J. (2016a). Expression of a phosphate-starvation inducible fructose-1,6-bisphosphatase gene in common bean nodules correlates with phosphorus use efficiency. *J. Plant Physiol.* *205*, 48–56.
- Lazali, M., Brahimi, S., Merabet, C., Latati, M., Benadis, C., Maougal, R.T., Blavet, D., Drevon, J.J., and Ounane, S.M. (2016b). Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* in multi-local field tests under Mediterranean climate. *Eur. J. Soil Biol.* *73*, 100–107.
- Le Bot, J., Adamowicz, S., and Robin, P. (1998). Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Sci. Hortic.* *74*, 47–82.
- Le Roux, M.R., Ward, C.L., Botha, F.C., and Valentine, A.J. (2006). Routes of pyruvate synthesis in phosphorus-deficient lupin roots and nodules. *New Phytol.* *169*, 399–408.

- Lebeis, S.L. (2015). Greater than the sum of their parts: characterizing plant microbiomes at the community-level. *Curr. Opin. Plant Biol.* *24*, 82–86.
- Lei, X.G., and Porres, J.M. (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol. Lett.* *25*, 1787–1794.
- Lei, X., Wang, E.T., Chen, W.F., Sui, X.H., and Chen, W.X. (2008). Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Arch. Microbiol.* *190*, 657–671.
- Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J., and Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase: Source, Structure and Application. In *Industrial Enzymes*, J. Polaina, and A.P. MacCabe, eds. (Springer Netherlands), pp. 505–529.
- Lei, X.G., Weaver, J.D., Mullaney, E., Ullah, A., and Azain, M.J. (2013). Phytase, a New Life for an “Old” Enzyme. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* *1*, 283–309.
- Lester, G.E., Jifon, J.L., Makus, D.J., and others (2010). Impact of potassium nutrition on food quality of fruits and vegetables: A condensed and concise review of the literature. *Better Crops* *94*, 18–21.
- Lewis, D.C., and Hawthorne, W.A. (1996). Critical plant and seed concentrations of phosphorus and zinc for predicting response of faba beans (*Vicia faba*). *Aust. J. Exp. Agric.* *36*, 479–484.
- Li, B., Li, Y.-Y., Wu, H.-M., Zhang, F.-F., Li, C.-J., Li, X.-X., Lambers, H., and Li, L. (2016). Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N<sub>2</sub> fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 6496–6501.
- Lidbury, I.D.E.A., Fraser, T., Murphy, A.R.J., Scanlan, D.J., Bending, G.D., Jones, A.M.E., Moore, J.D., Goodall, A., Tibbett, M., Hammond, J.P., et al. (2017). The ‘known’ genetic potential for microbial communities to degrade organic phosphorus is reduced in low-pH soils. *MicrobiologyOpen* *6*.
- Lim, B.L., Yeung, P., Cheng, C., and Hill, J.E. (2007). Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J.* *1*, 321–330.
- Lindström, K., Murwira, M., Willems, A., and Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res. Microbiol.* *161*, 453–463.
- Lindström, K., Amsalu Aserse, A., and Mousavi, S.A. (2015). Evolution and Taxonomy of Nitrogen-Fixing Organisms with Emphasis on Rhizobia. In *Biological Nitrogen Fixation*, F.J. de Bruijn, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc), pp. 21–38.
- Liu, B.-L., Rafiq, A., Tzeng, Y.-M., and Rob, A. (1998). The Induction and Characterization of Phytase and Beyond. *Enzyme Microb. Technol.* *22*, 415–424.
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramírez-Rodríguez, V., and Herrera-Estrella, L. (2000a). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci.* *160*, 1–13.
- López-Bucio, J., de la Vega, O.M., Guevara-García, A., and Herrera-Estrella, L. (2000b). Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotechnol.* *18*, 450–453.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* *6*, 280–287.

- Lung, S., Chan, W., Yip, W., Wang, L., Yeung, E., and Lim, B. (2005). Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and roots enhances phosphorus utilization. *Plant Sci.* *169*, 341–349.
- Lynch, J. (1998). The Role of Nutrient-Efficient Crops in Modern Agriculture. *J. Crop Prod.* *1*, 241–264.
- Maathuis, F.J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* *12*, 250–258.
- Magrini, M.-B., Anton, M., Cholez, C., Corre-Hellou, G., Duc, G., Jeuffroy, M.-H., Meynard, J.-M., Pelzer, E., Voisin, A.-S., and Walrand, S. (2016). Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. *Ecol. Econ.* *126*, 152–162.
- Mailly, F., Delmotte, S., Schaller, N., Mouret, J.-C., Lopez-Ridaura, S., and Barbier, J.-M. (2013). Un modèle de décision d'assolement en riziculture conventionnelle et biologique pour prédire les usages des sols sous différents scénarios: cas de la Camargue (Sud de la France). *Cah. Agric.* *22*, 424–431.
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., Tourdonnet, S., and Valantin-Morison, M. (2009). Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agron. Sustain. Dev.* *29*, 43–62.
- Malviya, N., Srivastava, M., Diwakar, S.K., and Mishra, S.K. (2011). Insights to Sequence Information of Polyphenol Oxidase Enzyme from Different Source Organisms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *165*, 397–405.
- Manske, G.G.B., Ortiz-Monasterio, J.I., van Ginkel, M., González, R.M., Fischer, R.A., Rajaram, S., and Vlek, P.L.G. (2001). Importance of P uptake efficiency versus P utilization for wheat yield in acid and calcareous soils in Mexico. *Eur. J. Agron.* *14*, 261–274.
- Maougal, R. (2014). Contribution des phytases bactériennes à l'adaptation de *Phaseolus vulgaris* à la faible disponibilité de phosphore en sols méditerranéens. Thèse. Constantine.
- Maougal, R.T., Bargaz, A., Sahel, C., Amenc, L., Djekoun, A., Plassard, C., and Drevon, J.-J. (2014a). Localization of the *Bacillus subtilis* beta-propeller phytase transcripts in nodulated roots of *Phaseolus vulgaris* supplied with phytate. *Planta* *239*, 901–908.
- Maougal, R.T., Brauman, A., Plassard, C., Abadie, J., Djekoun, A., and Drevon, J.-J. (2014b). Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *Eur. J. Soil Biol.* *62*, 8–14.
- Marschner, P. (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (Academic Press).
- Martin, F.M., Uroz, S., and Barker, D.G. (2017). Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science* *356*, eaad 4501.
- Martínez-Hidalgo, P., and Hirsch, A.M. (2017). The Nodule Microbiome: N<sub>2</sub>-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone. *Phytobiomes* *1*, 70–82.
- Martínez-Torres, M.E., and Rosset, P.M. (2014). Food Sovereignty and Agroecology in the Convergence of Rural Social Movements. In *Alternative Agrifood Movements: Patterns of Convergence and Divergence*, (Emerald Group Publishing Limited), pp. 137–157.

- Masciarelli, O., Llanes, A., and Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiol. Res.* *169*, 609–615.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* *17*, 458–466.
- Menezes-Blackburn, D., Jorquera, M.A., Greiner, R., Gianfreda, L., and Mora, M. de la L. (2013). Phytases and Phytase-Labile Organic Phosphorus in Manures and Soils. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* *43*, 916–954.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., and Appel, T. (2001). Nutrient Uptake and Assimilation. In *Principles of Plant Nutrition*, (Springer, Dordrecht), pp. 111–179.
- Mezani, S., Khelfane-Goucem, K., and Medjdoub-Bensaad, F. (2016). Evaluation of invertebrate diversity on a broad bean crop (*Vicia faba* L. var. major) in Tizi-Ouzou area (Algeria). *Zool. Ecol.* *26*, 129–133.
- Molina, C., Zaman-Allah, M., Khan, F., Fatnassi, N., Horres, R., Rotter, B., Steinhauer, D., Amenc, L., Drevon, J.-J., Winter, P., et al. (2011). The salt-responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deepSuperSAGE. *BMC Plant Biol.* *11*, 1.
- Morschel, J., and Fox, D. (2004). Une méthode de cartographie du risque érosif: exemple d'application aux collines du Terrefort lauragais. *Mappe Monde*, (76), 1-11.
- Morya, V.K., Yadav, S., Kim, E.-K., and Yadav, D. (2012). In Silico Characterization of Alkaline Proteases from Different Species of *Aspergillus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *166*, 243–257.
- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., and Lindström, K. (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* *38*, 84–90.
- Mukhametzhanova, A.D., Akhmetova, A.I., and Sharipova, M.R. (2012). Microorganisms as phytase producers. *Microbiology* *81*, 267–275.
- Mullaney, E.J., and Ullah, A.H.. (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 179–184.
- Mullaney, E.J., and Ullah, A.H.J. (2005). Conservation of cysteine residues in fungal histidine acid phytases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *328*, 404–408.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., and Ullah, A.H.J. (2000). Advances in phytase research. B.-A. in *A. Microbiology*, ed. (Academic Press), pp. 157–199.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 335–350.
- Mvolo, C.S. (2010). Valorisation thermochimique et biochimique de la biomasse ligneuse forestière au Québec : possibles implications pour l'aménagement forestier et les industries traditionnelles de la fibre (Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue.).
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., and Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In *Phosphorus in Action*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 215–243.

- Newton, W.E., and Dilworth, M.J. (2011). Assays of Nitrogenase Reaction Products. In *Nitrogen Fixation*, (Humana Press), pp. 105–127.
- Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O., and Oh, T.K. (2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *63*, 362–372.
- Ohno, T., and Zibilske, L.M. (1991). Determination of Low Concentrations of Phosphorus in Soil Extracts Using Malachite Green. *Soil Sci. Soc. Am. J.* *55*, 892.
- Oldroyd, G.E. (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 519–546.
- Oldroyd, G.E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 252–263.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* *9*, 351–357.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 119–144.
- de Oliveira, L.A., and dos Santos Hara, F.A. (2004). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo. Amazonas.
- Olsen, S.R., Watanabe, F.S., Cospser, H.R., Larson, W.E., and Nelson, L.B. (1954). Residual phosphorus availability in long-time rotations on calcareous soils. *Soil Sci.* *78*, 141.
- Orgambide, G.G., Li, J., Hollingsworth, R.I., and Dazzo, F.B. (1995). Structurally diverse chitolipooligosaccharide Nod factors accumulate primarily in membranes of wild-type *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii - *Biochemistry (ACS Publications)*. *Biochemistry (Mosc.)* *34* (11).
- Ostanin, K., and Van Etten, R.L. (1993). Asp304 of *Escherichia coli* acid phosphatase is involved in leaving group protonation. *J. Biol. Chem.* *268*, 20778–22078.
- Osterås, M., Stanley, J., and Finan, T.M. (1995). Identification of *Rhizobium*-specific intergenic mosaic elements within an essential two-component regulatory system of *Rhizobium* species. *J. Bacteriol.* *177*, 5485–5494.
- Pal Roy, M., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S.P., and Ghosh, S. (2016). Cloning and Expression of Phytase appA Gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and Comparison of Properties with Recombinant Enzyme Expressed in *E. coli*. *PLOS ONE* *11*, e0145745.
- Pal Roy, M., Datta, S., and Ghosh, S. (2017). A novel extracellular low-temperature active phytase from *Bacillus aryabhatai* RS1 with potential application in plant growth. *Biotechnol. Prog.* *33*, 633–641.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Henriquez-Huecas, M., Mitchell, D.B., and van Loon, A.P.G.M. (1997a). Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*1. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1353*, 217–223.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., and Van Loon, A.P. (1997b). Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 1696–1700.

- Patel, K.J., Singh, A.K., Nareshkumar, G., and Archana, G. (2010). Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Appl. Soil Ecol.* *44*, 252–261.
- Patriarca, E.J., Tatè, R., Ferraioli, S., and Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of Legume Root Nodules. B.-I.R. of Cytology, ed. (Academic Press), pp. 201–262.
- Perkins, J.H., and Jamison, R. (2008). History, ethics, and intensification in agriculture. In *The ethics of intensification*. Springer Neth. 59–83.
- Pettigrew, W.T. (2008). Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. *Physiol. Plant.* *133*, 670–681.
- Plassard, C., Robin, A., Le Cadre, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L., Waithaisong, K., Lesueur, D., Blanchard, E., Chapuis-Lardy, L., et al. (2015). Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol ? *Innov. Agron.* *43*, 115–138.
- Pohajda, I., Huić Babić, K., Genera, Svetonedeljska 2, Kalinovica, 10436 Rakov Potok, Croatia, Rajnović, I., Kajić, S., and Sikora, S. (2016). Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Indigenous Common Bean Rhizobia in Croatia. *Food Technol. Biotechnol.* *54*.
- Poole, P.S., Blyth, A., Reid, C.J., and Walters, K. (1994). myo-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology* *140*, 2787–2795.
- Prell, J., and Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* *14*, 161–168.
- Quiza, L., St-Arnaud, M., and Yergeau, E. (2015). Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. *Front. Plant Sci.* *6*.
- Raboy, V. (2009). Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Sci.* *177*, 281–296.
- Raboy, V. (usda (1990). Biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. *Plant Biol. USA*.
- Raghothama, K.G. (1999). Phosphate Acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *50*, 665–693.
- Ramaekers, L., Remans, R., Rao, I.M., Blair, M.W., and Vanderleyden, J. (2010). Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. *Field Crops Res.* *117*, 169–176.
- Raven, J.A., and Edwards, D. (2001). Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J. Exp. Bot.* *52*, 381–401.
- Rebello, S., Jose, L., Sindhu, R., and Aneesh, E.M. (2017). Molecular advancements in the development of thermostable phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *101*, 2677–2689.
- Reddy, D.D., Rao, A.S., and Takkar, P.N. (1999). Effects of repeated manure and fertilizer phosphorus additions on soil phosphorus dynamics under a soybean-wheat rotation. *Biol. Fertil. Soils* *28*, 150–155.

Renoud, S. (2016). Phytostimulation du maïs par la bactérie *Azospirillum lipoferum* CRT1: impact sur des communautés fonctionnelles du microbiote racinaire. Université de Lyon.

Restrepo-Franco, G.M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., and Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Rev. CENIC Cienc. Biológicas* 46, 63–76.

Revel, J.C., and Rouaud, M. (1985). Mécanismes et importance des remaniements dans le terrefort toulousain (bassin aquitain, France). 35, 171–189.

Riah, N. (2014). Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est Algérien. Thèse. Constantine.

Ribet, J., and Drevon, J.J. (1996). The phosphorus requirement of N<sub>2</sub>-fixing and urea-fed *Acacia mangium*. *New Phytol.* 132, 383–390.

Richardson, A.E., and Hadobas, P.A. (1997). Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can. J. Microbiol.* 43, 509–516.

Richardson, A.E., and Simpson, R.J. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiol.* 156, 989–996.

Richardson, A.E., Hadobas, P.A., and Hayes, J.E. (2001). Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J.* 25, 641–649.

Richardson, A.E., George, T.S., Hens, M., and Simpson, R.J. (2005). Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. *Org. Phosphorus Environ.* 165–184.

Richardson, A.E., Hocking, P.J., Simpson, R.J., and George, T.S. (2009a). Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. *Crop Pasture Sci.* 60, 124.

Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M., and Prigent-Combaret, C. (2009b). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339.

Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppeler, S.M., and Triplett, E.W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.* 28(9), 829–836.

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F.S., Lambin, E.F., Lenton, T.M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J., et al. (2009). A safe operating space for humanity-*Revue. Nature* 461, 472–475.

Rodríguez, H., and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17, 319–339.

Rodríguez, E., Han, Y., and Lei, X.G. (1999). Cloning, Sequencing, and Expression of an *Escherichia coli* Acid Phosphatase/Phytase Gene (*appA2*) Isolated from Pig Colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 117–123.



- Rodríguez, E., Wood, Z.A., Karplus, P.A., and Lei, X.G. (2000). Site-Directed Mutagenesis Improves Catalytic Efficiency and Thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 Acid Phosphatase/Phytase Expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* *382*, 105–112.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., and Bashan, Y. (2007). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, (Springer, Dordrecht), pp. 15–21.
- Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., and Martínez Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* *34*, 96–104.
- Romanyà, J., Blanco-Moreno, J.M., and Sans, F.X. (2017). Phosphorus mobilization in low-P arable soils may involve soil organic C depletion. *Soil Biol. Biochem.* *113*, 250–259.
- Ros, C., Bell, R.W., and White, P.F. (1997). Effect of seed phosphorus and soil phosphorus applications on early growth of rice (*Oryza sativa* L.) cv. IR66. *Soil Sci. Plant Nutr.* *43*, 499–509.
- Saidi, S., Ramirez-Bahena, M.-H., Santillana, N., Zuniga, D., Alvarez-Martinez, E., Peix, A., Mhamdi, R., and Velazquez, E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *64*, 242–247.
- Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P., Müller, E.-C., and Borriss, R. (2004). Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *65*, 110–118.
- Sakamoto, K., Ogiwara, N., and Kaji, T. (2013). Involvement of autoregulation in the interaction between rhizobial nodulation and AM fungal colonization in soybean roots. *Biol. Fertil. Soils* *49*, 1141–1152.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., and Ayling, S.M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* *116*, 447–453.
- Schmalenberger, A., and Tebbe, C.C. (2003). Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Mol. Ecol.* *12*, 251–262.
- Schneider, A., and Huyghe, C. (2015). *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires* (Editions Quae).
- Schuize, J., Adgo, E., and Merbach, W. (1999). Carbon Costs Associated with N<sub>2</sub> Fixation in *Vicia faba* L and *Pisum sativum* L. over a 14-Day Period. *Plant Biol.* *1*, 625–631.
- Schulze, J. (2005). P-deficiency increases the O<sub>2</sub> uptake per N<sub>2</sub> reduced in alfalfa. *J. Exp. Bot.* *56*, 1779–1784.
- Schulze, J., Tesfaye, M., Litjens, R., Bucciarelli, B., Trepp, G., Miller, S., Samac, D., Allan, D., and Vance, C.P. (2002). Malate plays a central role in plant nutrition. In *Progress in Plant Nutrition: Plenary Lectures of the XIV International Plant Nutrition Colloquium*, (Springer), pp. 133–139.
- Schutter, O.D. (2011). How not to think of land-grabbing: three critiques of large-scale investments in farmland. *J. Peasant Stud.* *38*, 249–279.

- Sharpley, A.N., Bergström, L., Aronsson, H., Bechmann, M., Bolster, C.H., Börling, K., Djodjic, F., Jarvie, H.P., Schoumans, O.F., Stamm, C., et al. (2015). Future agriculture with minimized phosphorus losses to waters: Research needs and direction. *AMBIO* 44, 163–179.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., and Zhang, F. (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *PLANT Physiol.* 156, 997–1005.
- Shimizu, M. (1992). Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1266–1269.
- Silberbush, M., and Barber, S.A. (1983). Prediction of Phosphorus and Potassium Uptake by Soybeans with a Mechanistic Mathematical Model. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 262–265.
- Sims, J.T., Edwards, A.C., Schoumans, O.F., and Simard, R.R. (2000). Integrating Soil Phosphorus Testing into Environmentally Based Agricultural Management Practices. *J. Environ. Qual.* 29, 60–71.
- Singh, S., and Parniske, M. (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current opinion in plant biology*, 15(4), 444–453.
- Singh, B., and Satyanarayana, T. (2011). Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17, 93–103.
- Skøt, L., and Egsgaard, H. (1984). Identification of ononitol and O-methyl-scylo-inositol in pea root nodules. *Planta* 161, 32–36.
- Somarriba, E., and Beer, J. (2011). Productivity of *Theobroma cacao* agroforestry systems with timber or legume service shade trees. *Agrofor. Syst.* 81, 109–121.
- Spaink (2000). Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria - [annurev.micro.54.1.257](http://annurev.micro.54.1.257).
- Spini, G., Decorosi, F., Cerboneschi, M., Tegli, S., Mengoni, A., Viti, C., and Giovannetti, L. (2016). Effect of the plant flavonoid luteolin on *Ensifer meliloti* 3001 phenotypic responses. *Plant Soil* 399, 159–178.
- Sprent, J. (2009). *Legume Nodulation* (John Wiley & Sons).
- Sprent, J.I., and James, E.K. (2007). Legume Evolution: Where Do Nodules and Mycorrhizas Fit In? *Plant Physiol.* 144, 575–581.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockstrom, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., de Vries, W., de Wit, C.A., et al. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347, 1259855–1259855.
- Steinshamn, H., Thuen, E., Bleken, M.A., Brenøe, U.T., Ekerholt, G., and Yri, C. (2004). Utilization of nitrogen (N) and phosphorus (P) in an organic dairy farming system in Norway. *Agric. Ecosyst. Environ.* 104, 509–522.
- Stelling, D., Wang, S.H., and Römer, W. (1996). Efficiency in the use of phosphorus, nitrogen and potassium in topless faba beans (*Vicia faba* L.) – variability and inheritance - *Plant Breeding - Wiley Online Library*.

- Stępkowski, T., Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, Ł., Gurda, D., Chlebicka, A., and Moulin, L. (2007). Diversification of Lupine Bradyrhizobium Strains: Evidence from Nodulation Gene Trees. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 3254–3264.
- Stoddard, F.L., Hovinen, S., Kontturi, M., Lindström, K., and Nykänen, A. (2009). Legumes in Finnish agriculture: history, present status and future prospects. *Agricultural and Food Science*.
- Streeter, J.G. (1987). Carbohydrate, Organic Acid, and Amino Acid Composition of Bacteroids and Cytosol from Soybean Nodules. *Plant Physiol.* *85*, 768–773.
- Streeter, J.G., and Salminen, S.O. (1985). Carbon Metabolism in Legume Nodules. In *Nitrogen Fixation Research Progress*, (Springer, Dordrecht), pp. 277–283.
- Ström, L., Olsson, T., and Tyler, G. (1994). Differences between calcifuge and acidifuge plants in root exudation of low-molecular organic acids. *Plant Soil* *167*, 239–245.
- Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L., and Jones, D.L. (2001). Organic acid behaviour in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biol. Biochem.* *33*, 2125–2133.
- Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L., and Jones, D.L. (2005). Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biol. Biochem.* *37*, 2046–2054.
- Subbarao, G.V., Ae, N., and Otani, T. (1997). Genotypic variation in iron-, and aluminum-phosphate solubilizing activity of pigeonpea root exudates under P deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* *43*, 295–305.
- Subramaniam, G., Arumugam, S., and Rajendran, V. (2016). *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes* (Springer).
- Sulieman, S., and Schulze, J. (2010). The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*. *J. Plant Physiol.* *167*, 683–692.
- Sulieman, S., Schulze, J., and Tran, L.-S.P. (2013a). Comparative Analysis of the Symbiotic Efficiency of *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* under Phosphorus Deficiency. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 5198–5213.
- Sulieman, S., Ha, C.V., Schulze, J., and Tran, L.-S.P. (2013b). Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *J. Exp. Bot.* *64*, 2701–2712.
- Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (1998). Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 5145–5149.
- Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B., and Ronson, C.W. (1995). Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 8985–8989.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 2725–2729.
- Tang, C., Hinsinger, P., Drevon, J.J., and Jaillard, B. (2001). Phosphorus Deficiency Impairs Early Nodule Functioning and Enhances Proton Release in Roots of *Medicago truncatula* L. *Ann. Bot.* *88*, 131–138.

- Tang, J., Leung, A., Leung, C., and Lim, B.L. (2006). Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. *Soil Biol. Biochem.* *38*, 1316–1324.
- Tarafdar, J.C., and Gharu, A. (2006). Mobilization of organic and poorly soluble phosphates by *Chaetomium globosum*. *Appl. Soil Ecol.* *32*, 273–283.
- Tarafdar, J.C., and Rao, A.V. (1996). Contribution of *Aspergillus* strains to acquisition of phosphorus by wheat (*Triticum aestivum* L.) and chick pea (*Cicer arietinum* Linn.) grown in a loamy sand soil. *Appl. Soil Ecol.* *3*, 109–114.
- Teixeira, M.G., Guerra, J.G.M., Almeida, D.L. de, Araújo, A.P., and Franco, A.A. (1999). Effect of seed phosphorus concentration on nodulation and growth of three common bean cultivars. *J. Plant Nutr.* *22*, 1599–1611.
- Tempé, J., Petit, A., Holsters, M., Montagu, M. van, and Schell, J. (1977). Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *74*, 2848–2849.
- Thiyagarajan, T.M., Backiyavathy, M.R., and Savithri, P. (2003). Nutrient management for pulses—a review. *Agric. Rev.-Agric. Res. Commun. Cent. INDIA* *24*, 40–48.
- Thuynsma, R., Valentine, A., and Kleinert, A. (2014). Phosphorus deficiency affects the allocation of below-ground resources to combined cluster roots and nodules in *Lupinus albus*. *J. Plant Physiol.* *171*, 285–291.
- Tian, C.F., Wang, E.T., Wu, L.J., Han, T.X., Chen, W.F., Gu, C.T., Gu, J.G., and Chen, W.X. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *58*, 2871–2875.
- Tian, C.F., Young, J.P.W., Wang, E.T., Tamimi, S.M., and Chen, W.X. (2010). Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: the role of recombination and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* *73*, 563–576.
- Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A., and Poole, P.S. (2015). Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *ISME J.* *9*, 2349–2359.
- Tomich, T.P., Brodt, S., Ferris, H., Galt, R., Horwath, W.R., Kebreab, E., Leveau, J.H., Liptzin, D., Lubell, M., Merel, P., et al. (2011). Agroecology: a review from a global-change perspective. *Annu. Rev. Environ. Resour.* *36*, 193–222.
- Torres Aquino, M., and Plassard, C. (2004). Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* *48*, 149–156.
- Turner, B.L., Papházy, M.J., Haygarth, P.M., and Mckelvie, I.D. (2002). Inositol phosphates in the environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *357*, 449–469.
- Turner, B.L., Richardson, A.E., and Mullaney, E.J. (2006). *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment* (CABI).
- Tyler, G., and Zohlen, A. (1998). Plant Seeds as Mineral Nutrient Resource for Seedlings—A Comparison of Plants from Calcareous and Silicate Soils. *Ann. Bot.* *81*, 455–459.

- Udvardi, M., and Poole, P.S. (2013). Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* *64*, 781–805.
- Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Lei, X.G., and Mullaney, E.J. (2000). Biochemical Characterization of Cloned *Aspergillus fumigatus* Phytase (phyA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *275*, 279–285.
- Unno, Y., Okubo, K., Wasaki, J., Shinano, T., and Osaki, M. (2005). Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environ. Microbiol.* *7*, 396–404.
- Vadez, V., and Drevon, J.-J. (2001). Genotypic variability in phosphorus use efficiency for symbiotic N. *Agronomie* *21*, 691–699.
- Vadez, V., Rodier, F., Payre, H., and Drevon, J.-J. (1996). Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* *34*, 871–878.
- Van Aarle, I.M., Viennois, G., Amenc, L.K., Tatry, M.-V., Luu, D.T., and Plassard, C. (2007). Fluorescent in situ RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* *17*, 487–494.
- Van Kessel, C., and Hartley, C. (2000). Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field Crops Res.* *65*, 165–181.
- Vance, C.P. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. *Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources.* *Plant Physiol.* *127*, 390–397.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., and Allan, D.L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* *157*, 423–447.
- Vandenbergh, C., Lambert, R., and Marie Marcoen, J. (2009). Evaluation de l'efficacité des cultures intermédiaires pièges à nitrate (CIPAN) en novembre. *Actes Atelier Nitrate-Eau 2 Au 5 Juin 2009 Peyresq Fr.*
- Vandenkoornhuys, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., and Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* *206*, 1196–1206.
- Vanotti, M.B., and Bundy, L.G. (1994). An Alternative Rationale for Corn Nitrogen Fertilizer Recommendations. *J. Prod. Agric.* *7*, 243–249.
- Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Vincent J M 1970 *Man. Pract. Study Root-Nodule Bact. Man. Pract. Study Root-Nodule Bact.* 164 pp.
- Voisin, A.-S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M.-H., Magrini, M.-B., Meynard, J.M., Mougel, C., Pellerin, S., and Pelzer, E. (2013). Les légumineuses dans l'Europe du XXI<sup>e</sup> siècle: Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs? Quels nouveaux défis pour la recherche? *Innov. Agron.* *30*, 283–312.
- Wahbi, S., Sanguin, H., Oufdou, K., Hafidi, M., Galiana, A., Domergue, O., Baudoin, E., Prin, Y., and Duponnois, R. (2012). Influence des cultures mixtes fève/blé sur le potentiel mycorhizien des sols et la structure de la microflore mycorrhizosphérique au Maroc.

- Waithaisong, K., Robin, A., Martin, A., Clairotte, M., Villeneuve, M., and Plassard, C. (2015). Quantification of organic P and low-molecular-weight organic acids in ferralsol soil extracts by ion chromatography. *Geoderma* 257–258, 94–101.
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., and Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. *Cell. Microbiol.* 14, 334–342.
- Wang, X., Tang, C., Guppy, C.N., and Sale, P.W.G. (2008). Phosphorus acquisition characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and white lupin (*Lupinus albus* L.) under P deficient conditions. *Plant Soil* 312, 117–128.
- Wezel, A., and Soldat, V. (2009). A quantitative and qualitative historical analysis of the scientific discipline of agroecology. *Int. J. Agric. Sustain.* 7, 3–18.
- White, P.J., Broadley, M.R., and Gregory, P.J. (2012). Managing the Nutrition of Plants and People. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2012, 1–13.
- Wood, M., and Stanway, A.P. (2001). Myo-inositol catabolism by *Rhizobium* in soil: HPLC and enzymatic studies. *Soil Biol. Biochem.* 33, 375–379.
- Wouterlood, M., Cawthray, G.R., Scanlon, T.T., Lambers, H., and Veneklaas, E.J. (2004). Carboxylate concentrations in the rhizosphere of lateral roots of chickpea (*Cicer arietinum*) increase during plant development, but are not correlated with phosphorus status of soil or plants. *New Phytol.* 162, 745–753.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., and Van Loon, A.P.G.M. (1999). Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 367–373.
- Yadav, B.K., and Tarafdar, J.C. (2007a). Ability of *Emericella rugulosa* to mobilize unavailable P compounds during Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] crop under arid condition. *Indian J. Microbiol.* 47, 57–63.
- Yan, X., Lynch, J.P., and Beebe, S.E. (1995a). Genetic Variation for Phosphorus Efficiency of Common Bean in Contrasting Soil Types: I. Vegetative Response. *Crop Sci.* 35, 1086–1093.
- Yan, X., Beebe, S.E., and Lynch, J.P. (1995b). Genetic Variation for Phosphorus Efficiency of Common Bean in Contrasting Soil Types: II. Yield Response. *Crop Sci.* 35, 1094–1099.
- Yao, M.-Z., Zhang, Y.-H., Lu, W.-L., Hu, M.-Q., Wang, W., and Liang, a-H. (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1–14.
- Yip, W., Wang, L., Cheng, C., Wu, W., Lung, S., and Lim, B.-L. (2003). The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 1148–1154.
- Yoon, S.J., Choi, Y.J., Ki, H., Kwang, M., Cho, K., Kim, J.W., Lee, S.C., and Jung, Y.H. (1996). Isolation and identification of properties of phytase enzyme. *Enzyme* 0229, 449–454.
- Young, J.P.W. (2016). Bacteria Are Smartphones and Mobile Genes Are Apps. *Trends Microbiol.* 24, 931–932.

Young, J.P.W., Crossman, L.C., Johnston, A.W., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., Wexler, M., Curson, A.R., Todd, J.D., Poole, P.S., et al. (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* 7, R34.

Young, N.D., Mudge, J., and Ellis, T.N. (2003). Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 199–204.

Zakhia, F., and De Lajudie, P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21, 569–576.

Zakhia, F., and de Lajudie, P. (2006). La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques - application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.* 52, 169–181.

Zeng, Z.K., Piao, X.S., Wang, D., Li, P.F., Xue, L.F., Salmon, L., Zhang, H.Y., Han, X., and Liu, L. (2011). Effect of Microbial Phytase on Performance, Nutrient Absorption and Excretion in Weaned Pigs and Apparent Ileal Nutrient Digestibility in Growing Pigs | Korea Science. *J. Anim. Sci.* 24, 1164–1172.

Zhang, R., Yang, P., Huang, H., Shi, P., Yuan, T., and Yao, B. (2011a). Two Types of Phytases (Histidine Acid Phytase and  $\beta$ -Propeller Phytase) in *Serratia* sp. TN49 from the Gut of *Batocera horsfieldi* (Coleoptera) Larvae. *Curr. Microbiol.* 63, 408–415.

Zhang, R., Yang, P., Huang, H., Shi, P., Yuan, T., and Yao, B. (2011b). Two Types of Phytases (Histidine Acid Phytase and  $\beta$ -Propeller Phytase) in *Serratia* sp. TN49 from the Gut of *Batocera horsfieldi* (Coleoptera) Larvae. *Curr. Microbiol.* 63, 408–415.

Zhang, X.X., Tian, C.F., Sui, X.H., Wang, E.T., Overall, I., Chen, W.X., Young, J.P.W., Zhang, Y.J., and Zheng, W.T. (2015). *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 2960–2967.





## Annexes

### Annexe 1. Articles

#### Article 1. En rédaction finale

*Vicia faba* with phytate-mineralizing rhizobia in agro-ecosystem South of France

**Domergue, O.**, Mazaoui, H., Dupressoir, T., Abadie, J., Amenc, L., Pernot, C., Farhat, A., Chouayekh, H., de Lajudie, P., Galiana, A., Drevon, J. J..

#### **Abstract:**

Crop yield is limited by phosphorus availability in most worldwide's arable land. Low P availability affects leguminous crops particularly since their nodules have high P requirement for N<sub>2</sub>-fixation. *Myo*-inositol hexakisphosphate (phytate) constitutes the main source of organic P (Po) in soils, and is unavailable to plants. Phytases, the only phosphatases efficiently hydrolysing phytate to inorganic phosphorus (Pi), increase P bio-availability for plant growth and development. In order to look for rhizobia having phytase activity, *Vicia faba* nodule-isolates from a multi-location survey in an agro-ecosystem of South of France, were screened on phytate selective medium. Among 59 isolates, 26 were able to produce a halo on phytate selective-solid medium, and their ability to induce nodules on *V. faba* was confirmed. Four of them identified as *R. leguminosarum* bv. *viciae* and *Rhizobium* sp. by *recA* gene sequencing were capable to mineralize phytate through phytase activity in phytate-selective liquid culture. Using phytase specific primers, amplification products were obtained and *V. faba* nodule transcripts were localized *in situ*. It is concluded that phytate-mineralizing rhizobia harbouring functional phytase genes may exist among *Rhizobium* sp. and *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

**Key words:** Phosphorus, phytase, rhizobia, *Rhizobium leguminosarum*, *Vicia faba*.

## Introduction

Among the major nutrients, Phosphorus (P) is the least mobile and least available to plants in most soils (Hinsinger, 2001; Schachtman et al., 1998). In 40% world's arable land, crop yield is limited by P availability (Vance, 2001). P unavailability is due to rapid immobilization of P by soil organic and inorganic components (Jorquera et al., 2008a; Tarafdar and Gharu, 2006). In acidic soils, P is bound to free oxides and aluminum or iron hydroxides, whereas in alkaline soils P is bound to calcium (Goldstein, 1986; Jones et al., 1991). Thus, P must be remobilized or mineralized (Vance et al., 2003). Application of P fertilizers, predominantly derived from rock phosphate, is a common practice to increase plant yield (White et al., 2012). However, only 20% of applied P is available for plant use, 80% being readily immobilized in soil (Schachtman et al., 1998). P leaking may cause eutrophication (Raghothama, 1999; Vance et al., 2003). Furthermore, rock phosphate reserves are a finite and non renewable resource whereas the worldwide demand will increase in the next 60-80 years (Cordell et al., 2009). This may contribute to agricultural crisis in future (Abelson, 1999).

Organic P represents 30–80% of the total soil P and plays an important role in the P cycle in agricultural soils (Tarafdar and Gharu, 2006). The predominant form of organic P is phytate (inositol hexa- and penta-phosphates), which constitutes up to 60% of soil organic P (Singh and Satyanarayana, 2011). Phytate must be dephosphorylated by phosphatases and phytases before assimilation as Pi form by plant (Richardson et al., 2009b, 2009a; Yadav and Tarafdar, 2007a). Phosphatase and phytase activities have been reported in several types of soils (Rodríguez and Fraga, 1999) where microbial phosphatase activity has been detected (Richardson et al., 2009b, 2009a; Maougal et al., 2014b).

Myo-inositol-hexakisphosphate-phosphohydrolases (Phytases) represent one of the key classes of enzymes involved in organic P mineralization (Konietzny and Greiner, 2002; Lim et al., 2007). Structure and catalytic mechanisms led to categorize them as cysteine phytases (CPhy), histidine acid phosphatases (HAP), purple acid phosphatases (PAP) and  $\beta$ -propeller phytases (BPP) (Mullaney and Ullah, 2003; Chu et al., 2004; Lei et al., 2007). HAP represent the most studied and diverse class of phytases among bacteria, fungi and plants (Mullaney et al., 2000). BPP are widespread among various soil bacterial species (Huang et al., 2009; Jorquera et al., 2008a; Lim et al., 2007).

Phosphorus is involved in many plant processes, from photosynthesis to gene regulation (Abel et al., 2002; Vance et al., 2003), energy metabolism, ATP production, cell

wall proteins and amino acid biosynthesis (Richardson et al., 2009b, 2009a; Rodríguez and Fraga, 1999). P is the most limiting nutrient for legumes because atmospheric N-fixation is energetically more expensive than soil N uptake and reduction (Vadez and Drevon, 2001). P deficiency may directly influence nodule growth and function, or indirectly decrease photosynthate supply from the host plant to the nodules (Al-Niemi et al., 1997a; Tang et al., 2001). Indeed to maintain SNF, plants allocate nutrients to nodules at the expense of plant growth and photosynthesis (Thuynsma et al., 2014). During P deficiency root and shoot P levels can decrease dramatically, while nodule P levels stay constant (Le Roux et al., 2006), and nodules do not readily release P back to the host plant (Graham and Vance, 2000).

To maintain agriculture sustainability and to improve the ability of crop plants to acquire P from organic compounds, chemical fertilizer use must be reduced (Richardson and Simpson, 2011; Shen et al., 2011). The diversification of the cropping systems by introducing more legumes may be an alternative for to-morrow's agriculture (Malézieux et al., 2009). With their ability to establish relationships with rhizobia, legumes have adapted to various environmental conditions to acquire both N and P effectively from the environment (Graham, 2003). Legumes are used as food protein source in both human and animal diets and also in rotation cropping systems and in agroforestry (Graham, 2003). They are second in most important agricultural crops, after cereals (Graham, 2003). *Vicia faba* is an important legume crop used as animal feed, dry seeds and fresh bean for human consumption in many countries (Duc et al., 2010b). Rhizobia associated to *V. faba* have been largely identified as *R. leguminosarum* sv *viciae*, *R. fabae*, *R. anhuiense* sp. nov., and *Rhizobium* sp. (Lei et al., 2008; Saidi et al., 2014; Tian et al., 2008; Zhang et al., 2015). Because of potential value of phytases for improving P use efficiency, selecting indigenous rhizobia harbouring phytase genes could provide sustainable tools for increasing SNF in low P soils. *V. faba* nodule rhizobial isolates from multi-location survey in an agro-ecosystem of South of France were screened for phytase activity.

## Materials and methods

### Screening and isolation of phytate utilizing rhizobia on agar medium

Fifty nine bacteria were isolated at flowering stage from *Vicia faba* nodules, according to (Vincent, 1970). Plants were collected at various sites in an agro-ecosystem located in Languedoc-Roussillon and Midi-Pyrénées in South of France. Isolates were subsequently grown at 28 °C in 5 ml of yeast extract mannitol (YEM) liquid medium. An uptake of 15 µl aliquote containing ca 10<sup>9</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> were plated in triplicate on phytate agar medium from (Maougal et al., 2014b). After 3 to 7 days at 28 °C, search for halo was done as an indicator of putative phytate-utilizing rhizobia. The phytate solubilization index (PSI) of the bacterial isolates was calculated as the ratio of total diameter (colony + halo zone) diameter of colony (Alam et al., 2002). The 59 bacterial isolates were also tested for their capacity to solubilize mineral phosphate, using tri calcium phosphate (TCP) medium (Frey-Klett et al., 2005). Medium with all the ingredients except phytate was tested as control of false positives.

The following reference strains were included (i) *Bacillus subtilis* strain 168 (Bs) the phytate-mineralizing bacteria (ii) *Sinorhizobium medicae* WSM419 (Smed) as rhizobia bearing HAP gene *in silico* (GenBank accession number: CP000739.1) (iii) *Sinorhizobium meliloti* 2011 (Smel) reported to induce a halo on phytate solid medium (Jossi, 2008) (iv) *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* strain 3841 (Rlv) as the major symbiont of *V. faba*.

The data were subjected to a one-way analysis of variance and homogenous groups of means were defined according to the Newman-Keuls multiple range test (Dagnelie, 2011) using the XLSTAT™ software package.

### Growth of rhizobial isolates in phytate liquid medium

The phytate-specific liquid medium contained: 1 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 4 mM CaSO<sub>4</sub>, 55 mM glucose, 188 µM thiamin-HCl, 20 µM Fe-citrate, and micronutrients: 9.2 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.078 µM CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 4 µM MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 3 µM ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O. After sterilization 20 min at 120 °C, and cooling to 50 °C, a 0.2 M Na-phytate sterile solution pH 7 was added to 6 mM final concentration. The Na-phytate solution was prepared with Na-phytate (Sigma, P0109) as described in (18). During culture, bacterial growth was estimated by the absorbance at 630 nm of 2 ml culture sampled every 24 h until 216 h each isolate done in triplicate. Bacterial isolates were selected based on their sole ability to mineralize phytate

so that all Phy+TCP+ isolates were excluded from this experiment except control A19 and B24 isolates. Samples from culture grown in Na-phytate-specific liquid medium with insoluble forms of phosphate were previously diluted 1:1 (v/v) using 1N HCl to dissolve the residual insoluble phosphate and were measured against a blank identically treated. At steady state, the remaining bacterial suspensions were centrifuged at 10,000 g during 2 min. pH value and free Pi concentration in the supernatant were measured as described (Ohno et Zibilske, 1991).

### **Phytase activity of rhizobia**

After the stationary phase was reached in the phytate liquid medium described above, 110 ml of bacterial culture were centrifuged during 15 min at 11,000 g. The supernatant was loaded into Amicon filter unit (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit) with a cutoff of 10 kDa, and spun 20 min at 10,000 g. The filter was washed with ultrapure water giving an enzyme extract concentrated about 50 times compared to the initial culture medium. The pellet was washed 5 times with sterile distilled water and re-suspended in a volume of water to obtain a bacterial extract concentrated approximately 50 times, as for the supernatant.

The phytase activity was measured on the cell and supernatant concentrates as described by (Maougal et al., 2014b), using Na-Phytate (Sigma, ref P0109) as substrate, and either Na-Acetate pH 5 for acid or Tris-Cl pH 8 with 1 mM CaCl<sub>2</sub> for alkaline phytase, since the latter requires Ca for function (Shimizu, 1992). Phytase activity was deduced from the increase of Pi in the reaction medium, over incubation periods ranging from 2 up to 6 h at 37 °C. For each measurement, three replicates were made for cell and supernatant concentrates including two tests for the phytase activity and one control to measure the residual Pi in the assay. Afterward, the reaction mixture was centrifuged 10 min at 11,000 g and the Pi concentration was measured in the supernatant with the malachite-green method (as above).

### **Amplification of *recA* and *nodD* and phytase genes**

After 2 day growth in 5 ml YEM liquid medium at 28 °C on 120 rpm, 2 ml of bacterial culture was centrifuged for 5 min at 13,000 g. The pellet was washed two times in sterile distilled water and was suspended in 1 ml Tris-HCl (10 mM, pH 8). Cell suspensions were subjected to proteinase K treatment as described (Laguerre et al., 1997) and then used directly as template DNA.

Phytate mineralizing isolates were identified taxonomically according to *recA* gene amplification using *recA* primers 6f = GTAGAGGAYAAATCGGTGGA (Gaunt et al., 2001) and TS2recAr = CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG (Stępkowski et al., 2007);

Phytase gene primers were designed according  $\beta$ -propeller phytase (BPP) and Histidine Acid Phosphatase (HAP) protein sequences (NCBI databases). BPP primers were chosen in the region corresponding to the N- (DAADDPA) and C- terminal (VAQDGEN) amino acid conserved domains of *B. subtilis* US417 (Farhat et al., 2008) in order to yield a 864 bp length fragment. BPP primers were BPP dir = GATGCAGCTGATGATCCTGCG and rev = ATTTTCTCCGTCCTGTGCGAC;

HAP primers were designed from fasta (i) *A. caulinodans* ORS 571 YP\_001527235.1 namely F413 = CAGTTCACGCCAAAGATGCC and 413 = CGCGTATGGTCCATCCTGAA and (ii) *S. medicae* WSM419 YP\_001312393.1 first set namely L454 = TTCCTCTCAAACCTCGCCTA and R962 = GAGCTTTCCACCCAATTGAA and second set namely L314 = TCGATCGCATGTTGAAGAAG and R1324 = CGAGCTTCGGATTGGAATAA.

PCR was run as follows: an initial cycle of denaturation at 94 °C for 5 min, 36 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s, and a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were checked by 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis in Tris-acetate EDTA (TAE) buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.3). The DNA amplicons were purified using a QIAquick gel extraction kit (Quiagen, Courtaboeuf, France) before sequencing by GenoScreen (<http://www.genoscreen.com>). DNA sequences were identified by comparison with the non redundant nucleotide databank at online Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). DNA sequences were aligned with clustalX, and maximum likelihood (ML) reconstructions were obtained using the MEGA 6.06 software package (Tamura et al., 2013) and their robustness assessed by non-parametric bootstrapping with 1000 iterations.

### **Efficiency of bacterial isolates**

Seeds of *V. faba* cultivar Castel were sterilized in 3 % calcium hypochlorite during 20 min and rinsed thoroughly by five successive baths in sterile distilled water. After germination, homogenous seedlings were transferred into a temperature controlled glasshouse as described previously by (Hernandez and Drevon, 1991). Thereafter, roots of seedlings were inoculated with phytate-mineralizing isolates. Were included (i) non mineralizing control

strains and (ii) non inoculated plants. Three seedlings per isolate were tested. Each inoculated-seedling was transferred to a 1 l serum bottle wrapped with aluminum foil to maintain darkness in the rooting environment, and grown in a temperature-controlled glasshouse with day/night temperatures of 28/20 °C and 16 h photoperiod with an additional illumination of 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 70 % relative humidity during the day. The seedlings received the following nutrient solution containing 1.65 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 0.7 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 8.5  $\mu\text{M}$  Fe as sequestrene; 6  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ ; 4  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ; 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ; 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2 \text{MoO}_4$ , with 125  $\mu\text{mol KH}_2\text{PO}_4 \text{ plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$  as P supply (Vadez et al., 1996). The nutrient solution pH was adjusted to c.a. 7 by adding 0.2  $\text{g l}^{-1} \text{CaCO}_3$ . This nutrient solution was permanently aerated by an air-flow of 400  $\text{ml plant}^{-1} \text{min}^{-1}$  provided through plastic tubes into the bottles. Cotton wool was fitted at the hypocotyl level to maintain the root system suspended in the nutrient solution. Firstly, the nutrient solution was diluted at 1:2 (v:v). In order to avoid N deficiency and ensure optimal nodulation, urea was supplied as 2 mmol per plant (Hernandez and Drevon, 1991). It was replaced 15 days after transplantation (DAT) and changed weekly thereafter. The plants were then grown in N-free solution in order to depend on  $\text{N}_2$  fixation, exclusively. Plants were inoculated during the three first nutrient solution changes, by adding 1 ml of bacterial suspension. Inoculum was prepared in YEM liquid medium at 28 °C under 120 rpm to an approximate cell density of  $10^9 \text{ ml}^{-1}$ . Plants were harvested at flowering stage, after 60 DAT of growth. Shoots, nodules and roots were collected separately and dried at 70 °C for 48 h, and dry weight for each fraction was measured.

### ***In situ* RT-PCR using phytase gene primers**

The *in situ* RT-PCR of phytase transcripts was performed on 50  $\mu\text{m}$  thick 3 mm diameter sections of nodule that were carefully detached from roots at 60 DAT, as described in Lazali et al. (2013). After reverse transcription the mix was replaced by 40  $\mu\text{l}$  of PCR mix including 0.25  $\mu\text{M}$  each of the above-described phytase dir and rev specific primers. Thermocycling was performed using 30 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 45 s, with extension at 72 °C for 2 min.

The PCR products were localized using epifluorescence microscopy (Van Aarle et al., 2007) using an Axio Imager M2 microscope (Zeiss, Gottingen, Germany) equipped with an epifluorescence condenser, a Hoechst/DAPI filter set and grey Axio camera MRM Version 3. Image analysis was performed using Zen imaging software as an image analysis program.



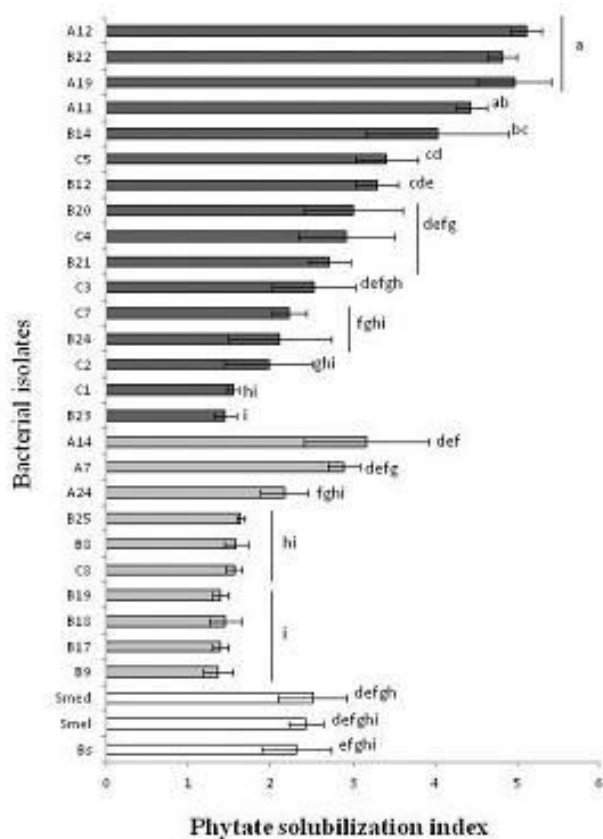


## Results:

### Isolation of phytate solubilizing rhizobia on agar medium

Among the 59 isolates from *V. faba* nodules, 26 were capable to produce a clearing zone on phytate agar medium (Fig.1). Among the latter, 16 were capable to produce a clearing zone on TCP medium. Thus, among the 26 phytate-solubilizing isolates were identified (i) 10 TCP<sup>-</sup>, namely A14, A7, A24, B25, B8, C8, B19, B18, B17, B9 and (ii) 16TCP<sup>+</sup>, namely A12, B22, A19, A11, B14, C5, B12, B20, C4, B21, C3, C7, B24, C2, C1, B23.

The data in Figure 1 showed that the means of phytate solubilization index (PSI) of the 26 *V. faba* solubilizing isolates ranged from 1.4 to 5.1 for A12 (Phy+TCP<sup>+</sup>) and B9 (Phy+TCP<sup>-</sup>), respectively. The PSI of the three control reference strains: Smed, Smel and Bs, that were indeed able to produce a clearing zone on phytate agar medium, ranged around 2.5. No halo was observed with the reference strain *Rlv* 3841. The isolates could be ranked in three classes based on their PSI values: (i) four Phy+TCP<sup>+</sup> isolates (A12, B22, A19, A11) with a PSI ranging from 4.4 to 5.1; (ii) ten Phy+TCP<sup>+</sup> isolates (B14, C5, B12, B20, C4, B21, C3, C7, B24, C2) and three Phy+TCP<sup>-</sup> isolates (A14, A7, A24) with a PSI ranging from 1.9 to 4.0; (iii) two Phy+TCP<sup>+</sup> (C1, B23) and seven Phy+TCP<sup>-</sup> isolates (B25, B8, C8, B19, B18, B17, B9) with a PSI ranging from 1.3 to 1.6.



**Fig. 1.** Solubilization of Na-Phytate solid medium by bacterial isolates

(white bars), reference strains; (grey bars), Phy+; phytate solubilizing rhizobial isolates; (black bars), Phy+TCP+; phytate and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  solubilizing rhizobial isolates. Smed, Smel and Bs are *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* 2011 and *B. subtilis* 168 reference strains, respectively. Data are mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. Mean values with the same letters are not significantly different according to the Newman-Keuls multiple range test at  $P = 0.05$ .

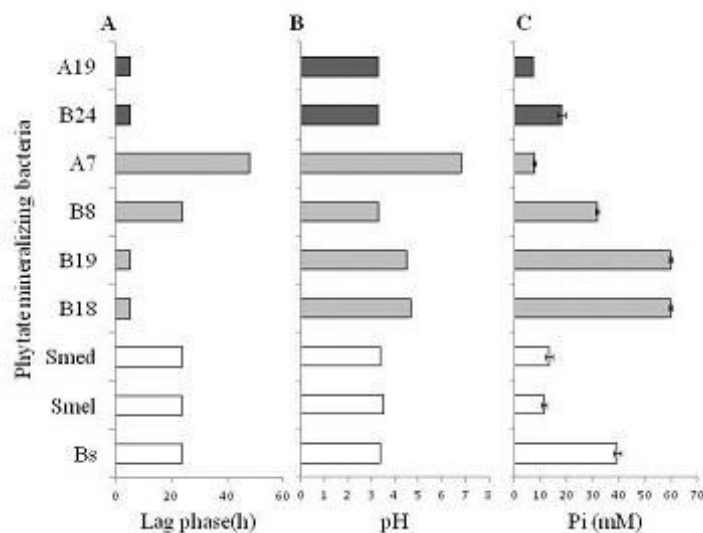
## Growth of rhizobial isolates in phytate liquid medium

In order to verify whether rhizobial isolates exhibiting a halo on phytate agar medium were able to utilize phytate as P source for growth, all the Phy+TCP- (A14, A7, A24, B25, B8, C8, B19, B18, B17, and B9) were tested for growth on phytate liquid medium. Were also included Bs, Smel and Smed phytate-solubilizing reference strains, and two Phy+TCP+ (A19, B24). Both later isolates were identified as *Serratia* sp. (see below), and phytase genes were found among bacteria of these genus in the literature (Zhang et al., 2011a).

Only four Phy+TCP-, namely A7, B8, B19, B18, the two *Serratia* isolates, and Bs, Smel and Smed reference strains were able to grow in phytate liquid medium (Fig 2). Each isolate could be characterized by three parameters of its growth curve: (i) duration of the lag phase before exponential growth; (ii) final pH to check for pH change during growth; (iii) amount of free Pi at steady state, from which could be quantified the accumulation of Pi released, expressed in  $\mu\text{mol Pi per litre}$ .

The data in Figure 2A showed that the lag phase duration varied between 3 h for A19, B24 (Phy+TCP+) and B18, B19 (Phy+TCP-), and 48 h for A7. For B8, the lag phase lasted 24 h like for Smed, Smel and Bs.

The pH value of the culture medium decreased with time from 7 down to 5 for B18 and B19 (Phy+TCP-), and down to 3 for B8 (Phy+TCP-), A19, B24 (Phy+TCP+), like for Bs, Smel and Smed whereas no pH change was observed for A7 (Fig. 2B). The final concentration of Pi at steady state was 60  $\mu\text{M}$  for B19, B18; 40  $\mu\text{M}$  for Bs; 30  $\mu\text{M}$  for B8; 20  $\mu\text{M}$  for B24; 15  $\mu\text{M}$  for Smel and Smed; and 10  $\mu\text{M}$  for A19 and A7 (Fig. 2C).



**Fig. 2.** Bacterial growth in Na-phytate liquid medium

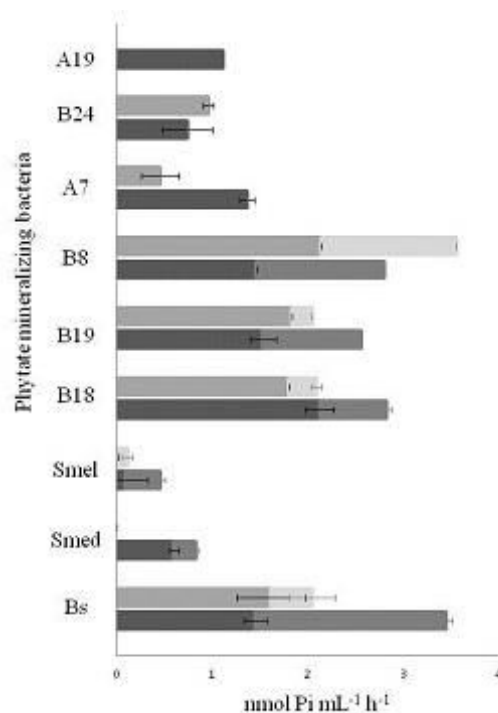
(A), Duration of Na-phytate solubilizing bacteria lag, and at steady state (B), pH and (C), Pi concentration during Na-Phytate solubilization by bacteria and *Vicia faba* rhizobial isolates. (white bars), reference strains; (grey bars), Phy+; phytate solubilizing rhizobial isolates; (black bars), Phy+TCP+; phytate and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  solubilizing rhizobial isolates. Smed, Smel and Bs are *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* 2011 and *B. subtilis* 168 reference strains, respectively. Data are mean  $\pm$  standard deviation of three replicates.

### Phytase activity and genes amplification

In order to check whether the Pi production was related to a phytase activity, a phytase assay was performed at stationary phase. The isolates displayed either extracellular or cell-associated phytase activity. The Phy+TCP- (A7, B8, B19, B18) isolates producing Pi in phytate liquid medium displayed a total phytase activity ranging from 0.4 (A7) to 3.6 (B8)  $\text{nmol Pi ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 3). Phytase activity of B8, B18 and B19 was of the same order of magnitude as Bs. Like Bs, the three latter isolates displayed both cellular and extracellular phytase activities. By contrast, A7, A19 and B24, displayed only a cell associated phytase activity. Since a Ca-dependent phytase activity was previously observed with *B. subtilis* (Shimizu, 1992) we search for a Ca dependent phytase activity with the isolates. Phytase activity of two of these strains (A7 and B24) occurred if Ca is added or not in the enzymatic assay then phytase activity of A19 isolate occurred without Ca adding. Smel, as rhizobial reference strain, displayed a cellular and extracellular activity less than  $0.5 \text{ nmol Pi ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , with or without Ca adding as Smed displayed cellular and extracellular activity, with Ca adding, only. Significant negative correlations were calculated between the total amount of

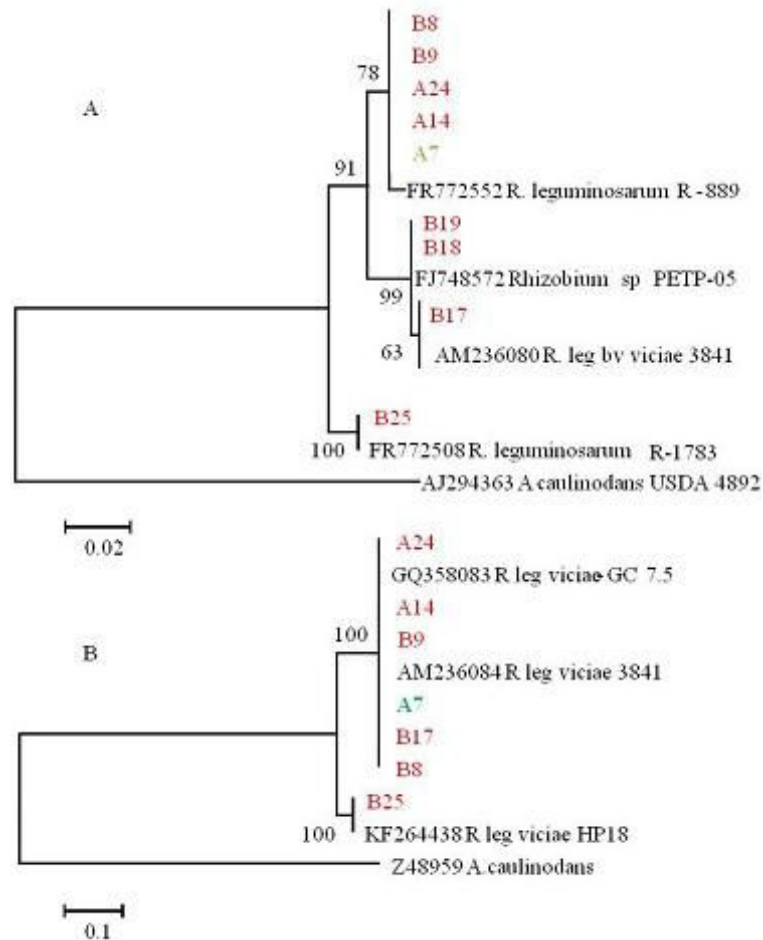
cellular and extra-cellular Pi producing and PSI ( $r = -0,714$ ) and between the amount of extra-cellular Pi producing and PSI ( $r = -0,786$ ).

According to *recA* amplification and sequencing (Fig. 4A), the four Phy+TCP-isolates could be grouped as *R. leguminosarum* symbiovar *viciae* for A7 and B8, and as *Rhizobium* sp. for B18 and B19. According to *nodD* (Fig. 4B), all of them could be grouped as *R. leguminosarum* symbiovar *viciae*. Contrastingly, A19 and B24 were affiliated to *Serratia plymuthica* (CP006566.1).



**Fig. 3.** Phytase activity of rhizobial isolates at steady state

Phytase activity of rhizobial isolates at steady state, using Na-Phytate as substrate in: ■ , cell and □ , supernatant; with Ca addition in: ■ , cell and □ , supernatant. Smed, Smel and Bs are *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* 2011 and *B. subtilis* 168 reference strains, respectively. Data are mean  $\pm$  standard deviation of three replicates.



**Fig. 4.** Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood.

(A), partial *recA* and (B), *nodD* sequences of rhizobia isolates from *V. faba* with reference strains. Alignment length of *RecA* and *NodD* was 530 bp and 949 bp, respectively. Positions with gaps were omitted, Tamura 3-parameter model was applied. Positions containing gaps and missing data were eliminated. Percentage bootstrap support (1000 replicates) is shown for each internal branch. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6.

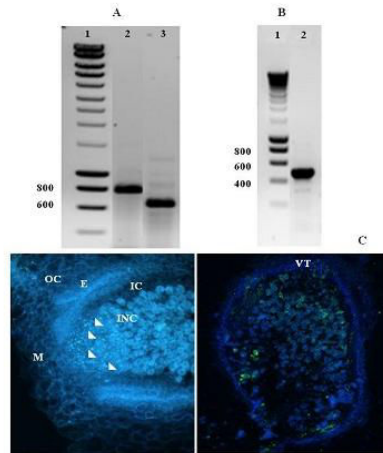
### Localization of phytase gene transcripts and symbiotic efficiency of bacterial isolates

Since besides enzyme activity, the detection of putative genes encoding phytate-degrading enzymes using molecular tools has been shown suitable to clone and detect a microorganism as a phytate-degrading enzyme producer (Pasamontes et al., 1997a, 1997b). Using BPP primers of *B. subtilis* US417, *in vitro* DNA amplification produced c.a. 800 bp long amplicons (Fig. 5A, line 2) with B8, A24, A7, A14, B25 (Phy+TCP-), c.a. 300 bp long with B18 and B19 (Phy+TCP-), 250 bp long with A19 and B24 (Phy+TCP+), and c.a. 1 000 bp long with Smed and Smel and 2 000 bp long with Bs (not shown). Using HAP primer sets L314 and R1324 of *S. medicae* WSM419, *in vitro* DNA amplification produced a c.a. 600 bp

long amplicon (Fig. 5A, line 3) with B8, A24, A7, A14, B9 (Phy+TCP-), c.a. 500 and 300 bp long with A19 and B24 (Phy+TCP+), c.a. 1 000 and 900 bp long with Smel, and c.a. 500 and 400 bp long with Bs. The other primer sets L454 and R962 produced a c.a. 500 bp fragment long with Smel, only. All the raw data obtained after sequencing were assembled using Cap-3 (Mobyly portal), which gave rise to 10 contigs and 25 unique singlets.

No canonical “phytase gene” was amplified except from the DNA of positive controls, *i.e.* Bs and Smel, using primer sets of (i) *B. Subtilis* 168 BPP (L3051-R3052) and (ii) *S medicae* HAP (L454-R962), respectively. The Smel amplicon encodes an ABC-type transporter, periplasmic subunit affiliated to the 4-phytase of (i) *S. medicae* WSM419 (ABR62460.1) (ii) BL225C (AEG08494.1) and AK83 (AEG55418.1) *S. meliloti* sp. and (iii) *Rhizobium* sp. NT26 (CCF21642.1). Noteworthy, for the first time, amplification of a genuine phytase type 4-gene was obtained with rhizobial strains, using L454/R462 primer set from the genome of *S. medicae* WSM419 accession YP\_001312393. Subjected to RT-PCR (Fig. 5C), the infected A7 ( left) and B8 (right), displayed fluorescent signal.

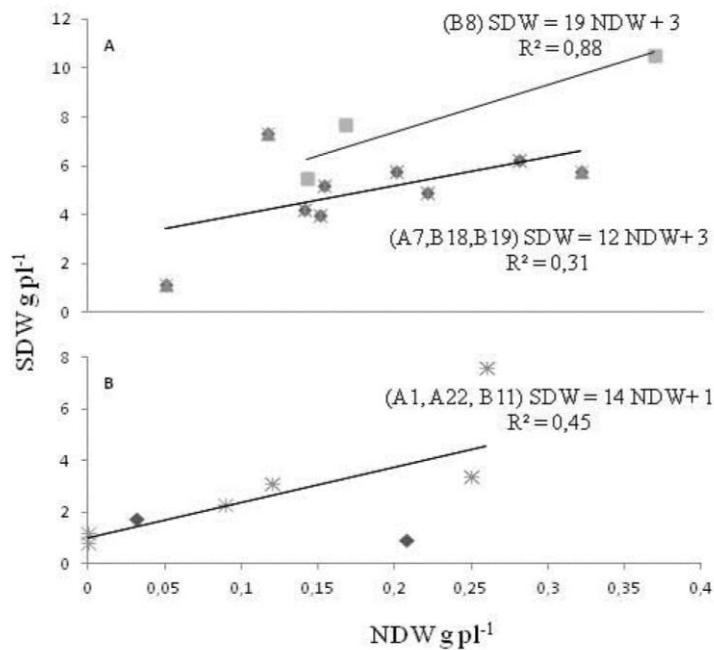
In order to search for relation between Phy phenotype and efficiency of the isolates for symbiosis with legume, we tested the isolates in hydroaerobic condition. The Phy+ isolates distributed in 2 groups of EURS: (i) the most efficient B8 showing an EURS of 3.5 g SDW g<sup>-1</sup> NDW, (ii) the less efficient group of A7, B18, B19 showing an EURS overall mean value of 2.8 SDW g<sup>-1</sup> NDW (Fig. 6A). The three Phy- rhizobia distributed in only one group with an overall mean value of 0.98 g SDW g<sup>-1</sup> NDW (Fig. 6B).



**Fig. 5.** *In vitro* amplification of *V. faba* rhizobial isolate genes using phytase gene primers and *in situ* localization of their transcripts

(A), line 1, Smart ladder; line 2, A7, rhizobial isolate amplicon with *B. subtilis* US417 BPP phytase gene specific primers (Farhat et al., 2008); line 3, B8, rhizobial isolate amplicon with *S. medicae* WSM419 HAP phytase gene specific primers (this study); (B), *S. meliloti* 2011 ABC transporter gene amplicon with *S. medicae* WSM419 HAP phytase gene specific primers and (C), *In situ* localization of transcripts in *V. faba* nodules inoculated with A7 (left) and B8 (right) rhizobial isolates, after reverse transcription with phytase gene specific primers, according to Lazali et al. (2013b) protocol. (left) longitudinal section of a nodule; (white arrow-heads), correspond to green spots induced by *B. subtilis* US417 BPP specific primers; (right) transversal section of a nodule showing green spots induced by *S. medicae* WSM419 HAP phytase gene specific primers. INF, Infected cell; E, Endodermis; IC, Inner cortex; OC, Outer cortex; M, Meristem. Bars, 500 mm.





**Fig. 6.** Efficiency in use of the rhizobial symbiosis (EURS) of *Vicia faba* var. Castel inoculated with phytate mineralizing rhizobial isolates

(A), B8; most, A7, B18, B19; less, efficient; (B) non mineralizing rhizobial isolates: A1, A22, B11. Data are mean value of three plant growth in hydroaerobic culture and harvested at 60 days after sowing.

## Discussion

The main result of this work is the observation of phytase activity among rhizobia isolated from *Vicia faba* nodules in an agro-ecosystem of South of France (Fig. 3). To our knowledge this is the first observation of phytase activity among rhizobiaceae. The proportion of 44% of rhizobia able to degrade phytate (Fig. 1) is consistent with the proportion of 30 to 40% bacteria from cultural soil and rhizosphere able to degrade phytate (Greaves and Webley, 1965). The proportion of 61% of the phytate-solubilizing rhizobia able to solubilize TCP (Fig. 1) is again consistent with the well-documented ability of soil microorganisms to solubilize both inorganic and organic phosphorus (Jorquera et al., 2008b; Rodríguez and Fraga, 1999). They include yeasts, filamentous fungi and Gram-positive as well as Gram-negative bacteria, and have been largely studied among *Bacillus* spp. (Idriss et al., 2002; Jorquera et al., 2011; Richardson et al., 2009b). Indeed, microorganisms able to degrade phytate have been isolated

from a wide range of terrestrial and aquatic environments, including soils, sediments, fresh and marine water ecosystems and also gastrointestinal tract of animals (Richardson and Hadobas, 1997; Turner et al., 2002). However, utilizing both phytate and TCP may not increase the overall phytate-mineralizing activity (Fig. 3).

Our observation that only four among the 10 Phy+TCP- rhizobia were able to grow in phytate liquid medium (Fig. 2) is consistent with the conclusion that screening on phytate solid medium through the halo formation is not a conclusive method (Maougal et al., 2014b; Patel et al., 2010). It requires the additional measurement of growth and quantification of Pi released in liquid culture (Fig. 2) to establish phytate-solubilizing bacteria. This is confirmed by the fact that in our study all the rhizobia able to grow in liquid medium with phytate as sole P source (Fig. 2) displayed a phytate-degrading activity (Fig. 3). However, the regulation of phytate-degrading enzymes production may differ from each microorganism to others and their optimal cultivation conditions are often genera-specific which may explain a failure to detect phytase activity for some microorganisms (Konietzny and Greiner, 2002).

Our observation that harbouring both cellular and extra-cellular activities (Fig. 3) produced higher free inorganic P than cellular-producer isolates (Fig. 2) is similar to previous observations. Extracellular and cellular enzymatic production suggests that microorganisms use different pathways to hydrolyze phytates, either in the external area or within the periplasm. Phytate-degrading enzymes have been shown among diverse bacteria such as *Pseudomonas* sp. (Richardson and Hadobas, 1997), *B. subtilis* (Choi et al., 2001; Kerovuo et al., 1998), *Klebsiella* sp. (Sajidan et al., 2004), *Enterobacter* (Konietzny and Greiner, 2004; Yoon et al., 1996) and *E. coli* (Greiner et al., 1993). Extracellular enzyme products show greater resistance to proteolysis and are more tolerant to pH and temperature variations (George et al., 2007). The activities of the three rhizobial isolates (B8, B18, B19) displaying both cellular and extra-cellular phytase are in the same order of magnitude of *B. subtilis* reference strain (Fig. 3).

Since phytase is a generic term to describe enzymes able to hydrolyze phytic acid phosphomonoester bonds yielding inorganic orthophosphate (Mullaney and Ullah, 2003), we used specific primers based on the protein sequences of HAP and BPP phytate-degrading enzymes and tried to amplify phytase-like genes of phytate-mineralizing isolates by in vitro PCR. Obviously, no canonical or known “phytase” gene was evidenced in the selected isolate genomes. However, we cannot exclude that our primers reached a somewhat similar genomic target which is consistent with the amplification of genes coding for ABC transporters and functionally uncharacterized proteins. On the other hand, the nodular localization of discrete

targets by in situ RT-PCR suggests that these transcripts are associated with nodulating bacteria (Fig. 5). The amplicon obtained with *Smel* using *Smed* WSM419 primers encodes a 4-phytase of *Rhizobium* sp. NT26.

Two classes of phytate-degrading enzymes are recognized: 3-phytase (EC 3.1.3.8) which initially removes phosphate from the D-3 position of the *myo*-inositol ring, and 6-phytase (EC 3.1.3.26), which preferentially initiates phytate dephosphorylation at the L-6 (D-4) position. D-5 and D-6 Phytate-degrading enzyme positions have also been found in nature (Greiner et al., 2000a). Microorganisms generally harbour 3-phytases, whereas 6 (4)-phytases are plant specific.

There is a big diversity among the amino acid sequences of the phytate-degrading enzymes. For example, RHGxRxP and HD conserved domains characteristic of HAP phytate-degrading enzymes found in *A. niger* exhibited from 47 to 97% homology to other fungi of same genera and are absent into microorganisms like *E. coli*. Amino acid sequence of BPP phytate-degrading enzymes from *B. subtilis* do not have homology to any other phosphatase sequences listed in the databases (Kerovuo et al., 1998). Two types of phytases were identified in *Serratia* sp.: an acidic histidine acid phosphatase (PhyH49) and an alkaline  $\beta$ -propeller phytase (PhyB49) which shared low identities with known phytases (61% at most) (Zhang et al., 2011b). These enzymes are classified as acidic, neutral or alkaline phosphatases. BPP is the sole phytase able to hydrolyse phytate in insoluble form, under neutral conditions and in the presence of Ca (Cheng and Lim, 2006; Korovuo et al., 2000). For the others, acidic pH optimum ranges from 2.2 to 5.5 (Cheng and Lim, 2006; Mullaney and Ullah, 2003).

In our experiment, Phy+TCP+ bacterial isolates capable to use both phytate and TCP as P source showed the best phytate solubilizing index. Surprisingly, by comparing the results obtained with the six phytate-mineralizing isolates: A19 and B24 (Phy+TCP+) and A7, B24, B8, B19, B18 (Phy+TCP-) grown on phytate agar medium vs liquid medium, we observed that the strains producing the highest PSI (A19, B24 and A7) are those which produce less inorganic P.

Microorganism interactions within the rhizosphere and extracellular phytate-degrading activities favorize P plant access from phytates in soil (Richardson and Simpson, 2011; Richardson et al., 2001; Unno et al., 2005). Soil P solubilization by microbial populations is mediated by acidification and/or chelation due to the production of protons, organic anions and siderophores (Hinsinger et al., 2011; Marschner, 2012; Richardson and Simpson, 2011). It has been reported that *B. amyloliquefaciens* FZB45 can enhance maize seedlings growth

(Idriss et al., 2002) and that bacteria with phytate-degrading enzymes promote plant growth of Indian mustard (Kaushik, 2015). BNF is an energetically expensive process, consuming on average 20 ATP per nitrogenase reaction, for the production of two NH<sub>3</sub> molecules (Schuize et al., 1999). Legume-rhizobia symbiosis with organic P soil bio-availability capacity may increase plant growth and yield. Understanding functional diversity of organic P-solubilizing rhizobia could enable legume SNF optimization in P deficient soils as in Mediterranean agro-ecosystems.

The *recA* gene encodes part of DNA recombination and repair system and large-scale phylogenies of *recA* in the bacteria are consistent with the corresponding SSU phylogenies (Eisen, 1995; Gaunt et al., 2001). *RecA* phylogeny affiliation of the four Phy+TCP- isolates to *R. leguminosarum* symbiovar *viciae* (A7, B8) and *Rhizobia* sp. (B18, B19) is consistent with current knowledge on *V. faba*-rhizobia symbiosis (Lei et al., 2008; Saidi et al., 2014). Amarger (Laguerre et al., 2003) showed that about one third of the *R. leguminosarum* strains recovered from French soils were not effective for N<sub>2</sub> fixation. Host specificity occurs between rhizobia strains and *V. faba* genotypes (Carter et al., 1994). In most cases, many different strains can infect the plant but only some of them are efficient. Where rhizobia are absent in soil, inoculation is generally be of most interest (Brockwell et al., 1995). It has been reported that inoculation with indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* significantly increased the growth and seed yield of faba bean (Carter et al., 1994; Khosravi H, 2004).

A19 and B24 (Phy+TCP+) isolates were affiliated to *Serratia* sp.. Belonging to plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Serratia* spp. is known to colonize the same niche as rhizobia and to interact with legume plants in natural conditions. Like *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. is well recognized for their vital role in soil fertility and plant health (Akhter, 2014). Zhang et al. (2011b) showed that *Serratia* sp. TN49 harboring both PhyH49 and PhyB49 might make it more adaptive to environment change, corresponding to the evolution trend of microorganisms. The effectiveness and persistence of phytase from diverse microorganisms in different environments could be affected by these traits.

Despite the quantitative importance of soil organic phosphorus compounds (such as phytate), knowledge on the plant mechanisms to use it is still limited. Several types of phosphatases, such as phytases, are able to increase the rate of the dephosphorylation (hydrolysis) of organic compound. These enzymes are normally present in soils, where they originate from micro-organisms. In this study we isolated four rhizobial strains from *V. faba* root nodules with phytate degrading ability and using HAP primers of *S. medicae* we amplified a phytase gene from *S. meliloti* similar to *Rhizobium* sp. NT26. It has been reported

that under P deprivation *S. meliloti* 2011 strain formed a high effective symbiotic association with *M. truncatula* than under normal growing conditions (Sulieman and Schulze, 2010; Sulieman et al., 2013b).

There is a need to better understand the ecological importance of microorganisms that have the potential to degrade phytate in different ecosystems. Bacteria producing organic acids involved in inorganic P solubilization and also harbouring a phytase activity involved in phytate mineralization, have been isolated from rhizosphere (Jorquera et al., 2011). These bacteria were used to improve P availability in animal feed (Jorquera et al., 2008a; Konietzny and Greiner, 2004) and to increase P uptake by plants in soils (Richardson et al., 2001). Microbial phytase genes have been expressed in plants (George et al., 2005; Lung et al., 2005; Richardson et al., 2001).

In Mediterranean areas, nutrient deficiencies, especially P, and the lack of efficient native rhizobia in soils are major limiting factors to legume-rhizobia symbiosis (Broughton et al., 2003b). The application of beneficial microorganisms including rhizobia for increasing crop productivity is of great interest for sustainability in agriculture. Further work can be considered to assess phytase sequence diversity and its relation with P efficiency for SNF in order to use the best phytate-mineralizing rhizobia as inoculants with *V. faba*, and to determine their survival in Mediterranean agro-ecosystems.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Great Federative Project of Agropolis Foundation named FABATROPIMED under the reference ID 1001-009. The authors thank Claude Plassard and Catherine Pernot (INRA Montpellier, France) for their assistance.

## Article 2. Soumis pour le bilan du projet

### Nodular diagnosis of *Vicia faba* symbiosis in an agro-ecosystem of South France

Domergue O.<sup>1,2\*</sup>, Blavet D.<sup>2</sup>, Vialla R.<sup>1-2</sup>, Terrats L.<sup>2</sup>, de Lajudie P.<sup>1</sup>, Galiana A.<sup>1</sup>, Drevon JJ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRA, IRD, CIRAD, LSTM, Campus de Baillarguet TA A82/J 34398 Montpellier

<sup>2</sup> INRA, IRD, Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

[\\*Odile.domergue@supagro.inra.fr](mailto:Odile.domergue@supagro.inra.fr)

#### ABSTRACT

Via its ability to fix atmospheric N<sub>2</sub>, the rhizobia – faba bean (*Vicia faba* cv minor) symbiosis may offer important ecosystem services including renewable N inputs to crops and soil and a diversification of cropping systems. However, symbiotic nitrogen fixation (SNF) can be limited by such abiotic factors as nitrogen excess or phosphorus deficiency. The inefficiency of some native rhizobia may also be a biotic constraint for SNF. *Myo*-inositol hexakisphosphate (phytate) represents the major source of organic P in most soils, but its mineralization is required to make P available for plant nutrition. In order to search for rhizobia nodulating *V. faba* cv minor with high SNF potential in soils with low P availability, we carried out multi-site nodular diagnosis in South France agro-ecosystems from Lauraguais to Gascogne. Dry weights of nodules and shoots were measured on plants at flowering stage. The efficiency in use of rhizobial symbiosis (EURS) was determined by the slope of the relationship between shoot and nodule dry weight, if significant. A large spatial and temporal variation of nodulation and EURS was found. It is concluded that field measurements could be linked with functional genomics of the symbiosis, and indicators for the ecological engineering of the rhizobial symbiosis, in particular for its beneficial contribution to the bio-geochemical cycles of N, P and C.

#### INTRODUCTION

Chemical nitrogen and phosphorus fertilizers use by intensive agricultural practices between 1960 and 2000 to increase food production in developed countries, has led to disruption of N and P bio-geochemical cycles, biodiversity reduction and soil, water and ecosystem pollution. Whereas the reserve of atmospheric N<sub>2</sub> is unlimited, reserves of P will be exhausted within the next decades (Cordell et al., 2009). P availability is affected by soil pH and other

mechanisms mostly due to soil micro-organisms. To ensure food security under climate change and demographic growth, the humanity is facing new challenges for intensive and sustainable agricultures. Among them could be the diversification of the cropping-systems by introducing legumes and using their ecosystemic services (Vance, 2001). Legumes represent a rich protein diet for human and animal, they provide N for cropping systems, reduce N fertilizer requirements and enhance carbon sequestration and phosphorus availability (Tang et al., 2001). Faba bean (*Vicia faba*) cv minor is a grain-legume used as animal feed in Europe and human food in Maghreb and in Mashrek. *V. faba* cv minor is used as a head in cropping systems and produces high income in organic cropping. *V. faba* cropping systems represent about 100 000 ha in France, with a major area located in North (Picardie) and a little one in South France (Midi-Pyrénées and Languedoc-Roussillon). In order to assess the abiotic and biotic constraints that might limit *V. faba*-rhizobia symbiosis, at the agro-ecosystem level, a nodular diagnosis was performed during 2011, 2012 and 2013, in farmer's field sites located in South of France, from Lauragais to Gascogne.

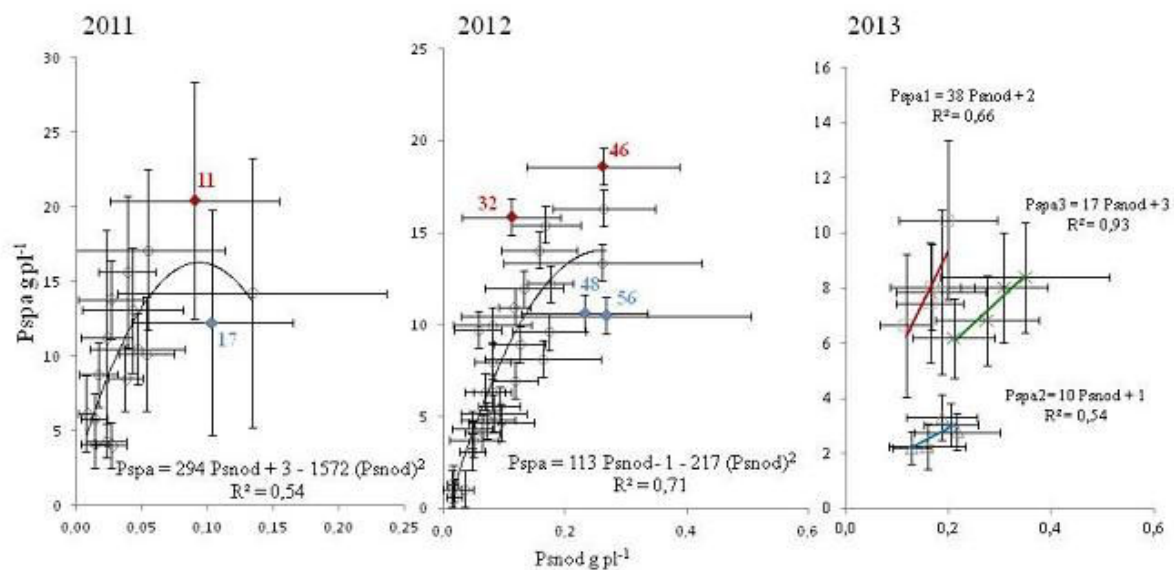
## **MATERIAL AND METHODS**

The farmer's field sites were located between 100 kilometers south and north sides of Toulouse. Two or four sampling points about 3 m far from each other are determined inside the sites. Sampling is performed by excavating 30 cm in depth and around 5 plant root systems per each of the sampling points. *V. faba* cv minor is harvested at flowering stage and environmental parameters like GPS, morpho-pedologic aspect, exposure, are noted. At the laboratory, plants and soils around roots are separated. Shoots, roots and nodules are dried 2 d at 70 °C, before being weighted to determine the shoot dry weight (sDW) and nodular dry weight (nDW). The efficiency in use of the rhizobial symbiosis (EURS) was assessed by the regression slope of the relation of shoot growth as a function of nodule biomass (Bargaz et al., 2011) between the mean of 10 to 20 plants per site, where such regression was significant.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Soils from Lauragais to Gascogne sites, in South France, are clayey and calcareous with variable contents of organic matter and sand. At pH between 7 and 8, P availability is generally low in these soils as it is bound to Calcium. Significant positive correlations are observed between mean of shoot and nodule biomass in 2011, 2012 and 2013. The highest

efficiency in use of rhizobial symbiosis by plant observed in 2011 and 2012 nodular diagnosis could be link to environment, soil water and atmosphere. EURS significantly above the mean is observed in sites 11, 32 and 46, opposite to sites 17, 48 and 56 with significant EURS below the mean. In 2013, three EURS classes were distinguished ranging from  $38 \pm 2$ ,  $17 \pm 3$  and  $10 \pm 1$  g sDW g<sup>-1</sup> nDW. Inter- and intra- sites and pluri-annual EURS variability may be explained by the soil characteristics of the sites, climate and the symbiotic properties of native rhizobial populations.



**Figure 1.** Correlation between shoot and nodule dry weight (g plant<sup>-1</sup>) of *Vicia faba* cv minor. Data are means of 10 to 20 plants per site, harvested at flowering stage in 2011, 2012 and 2013 nodular diagnosis.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This work was supported by the Great Federative Project FABATROPIMED financed by Agropolis Fondation under the reference ID 1001-009. The authors thank BioCivam advisors and farmers from Languedoc-Roussillon and Midi-Pyrénées.

## REFERENCES

- Bargaz, A. *et al.* (2011). *Symbiosis* 53: 157-164.  
 Cordell, D. *et al.* (2009). *Global Environ. Change*, 19 (2): 292-305.  
 Tang, C. (2001). *Ann. Bot.* 88: 131-138.  
 Vance, C. P. (2001). *Plant physiology*, 127(2): 390-397.



### Article 3. Soumis pour le bilan du projet

#### L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne chez *Vicia faba* décroît en culture associée avec le blé, en Camargue.

Domergue, O.<sup>1,2\*</sup>, Mc Donald, P.<sup>2</sup>, Blavet, D.<sup>2</sup>, Pansu, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA, LSTM, Campus de Baillarguet TA A82/J 34398 Montpellier, France

<sup>2</sup>IRD, Eco&Sols, 1 Place Viala, 34060 Montpellier, France

[\\*Odile.domergue@supagro.inra.fr](mailto:Odile.domergue@supagro.inra.fr)

#### Résumé

La Camargue se caractérise par des écosystèmes complexes soumis à des contraintes édaphiques et climatiques fortes des régions Méditerranéennes. La culture de riz irrigué permet une désalinisation des sols mais nécessite de gros apports d'intrants : pesticides et herbicides. L'une des alternatives pour réduire les intrants et éviter le développement de pathogènes et de mauvaises herbes est de diversifier les systèmes de cultures en introduisant des légumineuses. Leur symbiose avec des rhizobia et des mycorhizes permet aux légumineuses d'acquérir et d'utiliser efficacement N et P, et de contribuer à l'augmentation de la matière organique du sol, répondant ainsi aux exigences d'une agriculture durable, respectueuse de l'environnement. En Camargue, une légumineuse à graines telle que la féverole (*Vicia faba* cv minor), cultivée en association à du blé, et en rotation avec la luzerne et le riz, a été considérée comme prometteuse. Afin de tester l'adaptation de *V. faba* en Camargue, un diagnostic nodulaire a été réalisé, au sein de placettes agronomiques de la Rozière, après mesure de la nodulation et de la croissance, au stade de floraison. L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EURS) est déterminée par la pente de la droite de régression entre les biomasses aérienne et nodulaire.

#### INTRODUCTION

L'intensification des systèmes de cultures durant la "Révolution verte", de 1950 à 1970 (Perkins et Jamison, 2008), a permis d'augmenter la production alimentaire mais a eu un impact négatif sur les cycles biogéochimiques, réduisant la biodiversité et polluant le sol, l'eau et les écosystèmes. L'actuel challenge est de découvrir comment une intensification écologique des systèmes agricoles peut être conduite tout en protégeant les ressources

naturelles et la qualité de l'environnement, pour les générations futures. Ceci implique des améliorations dans la sélection variétale pour une efficacité d'utilisation des éléments nutritifs, l'eau, et l'énergie, dans des approches d'amélioration de la fertilité des sols et d'innovation des systèmes de cultures. Avec leur capacité de fixation biologique de l'azote atmosphérique, les légumineuses peuvent offrir des services écosystémiques et une diversification des systèmes de cultures (Aschi et al., 2017). Dans cette étude, la relation entre la nodulation et la croissance de *V. faba* a été déterminée chez des agriculteurs, en placettes agronomiques de Camargue, en région Occitanie du Sud de la France. Les résultats permettront de valider le modèle MOMOS des légumineuses en incorporant les nodules pour les besoins en C et sources de N.

## **MATERIEL ET METHODES**

Les placettes agronomiques paysannes sont localisées dans le Sud de France, en région Occitanie, sur le site de la Rozière en Camargue (Figure 1). Elles correspondent à des placettes où le blé dur et *V. faba* ont été cultivés en rotations *versus* en associations (Figure 2), et soumises à différentes doses de fertilisation en N. Cette étude est réalisée dans le cadre d'une recherche participative d'agriculteurs avec l'INRA. Les sols sont sableux et limoneux (Figure 3) avec un pH d'environ 8.5 et un P faiblement assimilable du fait de l'interaction avec Ca. Pour chacune des placettes, l'échantillonnage a été réalisé en quatre points de prélèvements distants d'environ 3 m et de 30 cm de profondeur, sur 5 plants prélevés au stade de floraison (Figure 4) où la symbiose fixatrice d'azote est maximale. Au laboratoire, les plantes et les sols autour des racines ont été dissociés et les racines ont été lavées à l'eau distillée. Les parties aériennes, racinaires et nodulaires ont été séchées 24 h à 70°C, avant pesées et détermination des biomasses aériennes (MSa) et nodulaires (MSn). Les moyennes des MSa et MSn de *V. faba* ont été comparées, dans chacune des placettes culturales. L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EURS) a été déterminée par la pente relationnelle de la croissance aérienne en fonction de la nodulation (Bargaz et al., 2011) de 20 plants par placette.



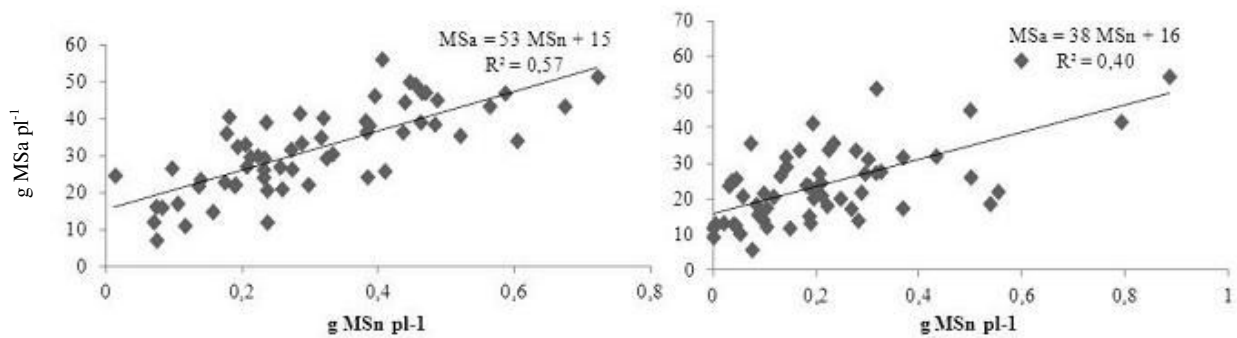
**Figure 1.** Site de la Rozière en Camargue



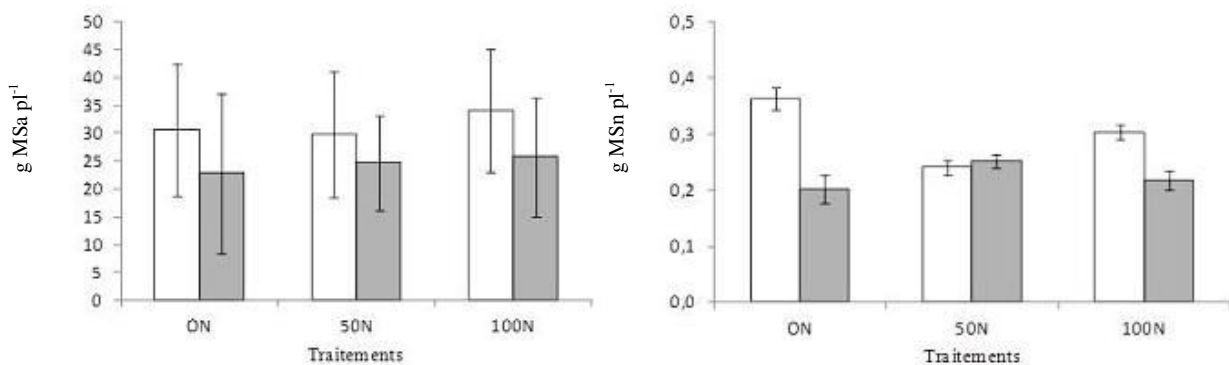
**Figure 2.** Systèmes de culture

## RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure 5 montre des corrélations significativement positives entre les biomasses des parties aériennes et nodulaires de *V. faba*, au niveau de tous les systèmes de cultures : *V. faba* ( $R^2 = 0.57^{***}$ ) et *V. faba*-blé ( $R^2 = 0.40^{***}$ ). Une plus forte efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne est observée en monoculture par rapport à la culture associée, avec des EURS de  $53 \pm 15$  et  $38 \pm 16$  g sDW g<sup>-1</sup> nDW, respectivement. Le système cultural semble avoir un effet important sur la croissance de *V. faba* qui est favorisée en monoculture. Néanmoins, la fertilisation en N n'a eu aucun effet significatif sur la croissance de *V. faba* (Figure 6). Une explication possible est que la symbiose fixatrice d'azote au niveau nodulaire, couvre les besoins des plantes. C'est pourquoi, l'addition d'intrant N n'a entraîné aucune différence significative sur la croissance des plantes, au niveau des trois tests de fertilisations réalisés en placettes de Camargue.



**Figure 5.** Corrélation entre les biomasses des parties aériennes et nodulaires ( $\text{g plant}^{-1}$ ) de *V. faba* cv minor en monoculture (gauche) et associée au blé (droite). La collecte des plantes a été réalisée au stade de floraison.



**Figure 6.** Biomasses sèches moyennes ( $\text{g pl}^{-1}$ ) aériennes (gauche) et nodulaires (droite) de *V. faba* cv. Minor sur placettes soumises à différentes fertilisations N. Moyennes et DS de 20 plantes issues de monocultures (□) et associées au blé (■). Le prélèvement des plantes a été réalisé au stade de floraison.

**REMERCIEMENTS:** Ce travail a été soutenu par le grand projet fédératif FABATROPIMED, financé par Agropolis fondation sous la référence ID 1001-009. Les auteurs remercient les agriculteurs de Camargue.

## REFERENCES

- Aschi et al. (2017). *Applied Soil Ecology* 120 : 219-228  
 Bargaz, A. et al. (2011). *Symbiosis* 53 : 157-164.  
 Perkins, J. H., & Jamison, R. (2008). Springer Netherlands p. 59-83.

## Article 4. Soumis pour le bilan du projet

### **The efficiency in use of the rhizobial symbiosis with *Vicia faba* is decreased by intercropping with wheat in Camargue.**

Domergue, O.<sup>1,2\*</sup>, Mc Donald, P.<sup>2</sup>, Blavet, D.<sup>2</sup>, Pansu, M.<sup>2</sup>, Drevon, J. J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRA, IRD, CIRAD, LSTM, Campus de Baillarguet TA A82/J 34398 Montpellier

<sup>2</sup> INRA, IRD, Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

[\\*Odile.domergue@supagro.inra.fr](mailto:Odile.domergue@supagro.inra.fr)

#### **ABSTRACT**

The area of Camargue in South France represents a complex ecosystem subjected to strong edaphic and climatic Mediterranean constraints. The irrigated rice culture allows a salt disruption of the soils but requires the use of large amount of pesticides and herbicides. One alternative to reduce these inputs and to avoid the development of weeds and pathogens in the rice cultures is cropping systems diversification by the introduction of legume species. In symbiosis with rhizobia and mycorrhiza, the legumes may promote the efficient acquisition and use of N and P and increase the soil organic matter, therefore contributing to agricultural sustainability and environmental safety. In Camargue, beside alfalfa, cultivated in association under wheat after rice, such grain legumes as faba bean (*Vicia faba* cv minor) may be considered as promising. In order to test the adaptation of *V. faba* in Camargue, a nodular diagnosis was performed by measuring nodulation and growth, at flowering stage, in various sites of the Rozière farm. The efficiency in use of rhizobial symbiosis (EURS) was determined by the slope of the linear relationship between shoot and nodule dry weights.

#### **INTRODUCTION**

Intensification of cropping systems, during the so called ‘green revolution’ from the 1950s to the 1970s (Perkins and Jamison, 2008), enabled an increase in food production but led to Earth’s biogeochemical cycle disruption, biodiversity reduction together with soil, water and ecosystem pollution. The challenge is now to discover how an ecological intensification of agricultural systems can be achieved whilst protecting natural resources and environmental quality for next generations. It entails improvements in the selection of crop varieties that are

efficient in use of nutrients, water, and energy, in methods to promote soil fertility, in and innovations for improved cropping systems. With their symbiotic nitrogen fixation capacity, legumes can offer ecosystemic services and agro-system management alternative (Aschi et al., 2017). In this work, the relationship between nodulation and growth of *V. faba* was studied, in a farmer's field of Camargue (Occitanie region South France), in the perspective to improve the MOMOS model by extending it to incorporate the role of nodules.

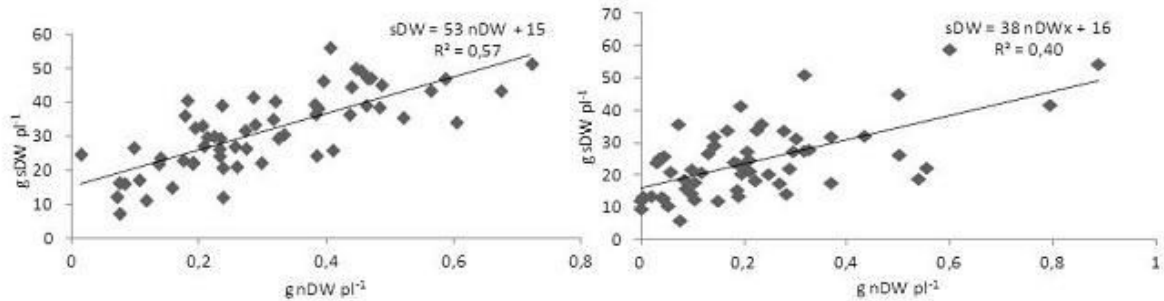
## MATERIAL AND METHODS

The farmer's field sites were located at the Rozière, in Camargue area (Occitanie region South France). The sites correspond to fields where durum wheat and *V. faba* were grown either separately or in associations and submitted to different N fertilization levels. The farmer agreed to collaborate with INRA in the view of participatory research. The soils from Camargue sites are sandy-loamy with an approximate pH of 8.5. P availability is generally low in these soils, immobilized by calcium. Four sampling points about 3 m far from each other were performed within each site by excavating 30 cm in depth and around 5 plant-root systems at flowering stage, when symbiotic nitrogen fixation is at its peak. Back to laboratory, plants and soil around the roots were separated; roots were washed with distilled water. Shoots, root and nodules were dried 24 h in a drying oven at 70°C, before being weighted to determine the shoot dry weight (sDW) and nodular dry weight (nDW). Means of sDW and nDW of *V. faba* were compared, in each cropping system sites. The efficiency in use of the rhizobial symbiosis (EURS) was assessed by the regression slope between sDW and nDW (Bargaz et al., 2011) of 20 plants per site, where such regression was significant.

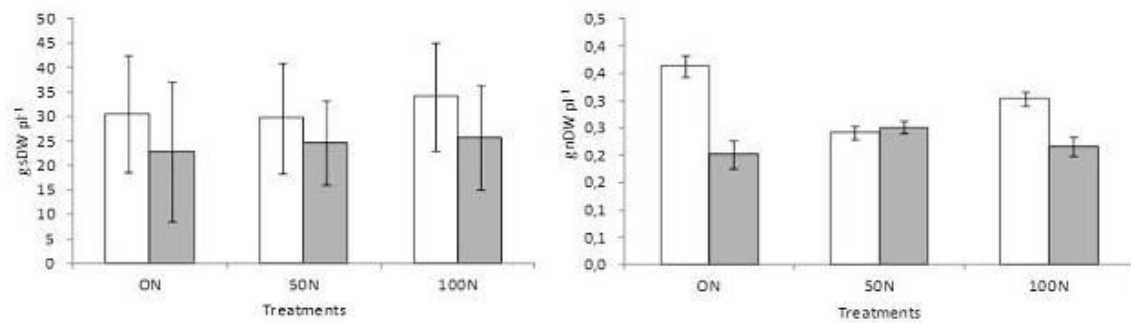
## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows significant positive correlations between *V. faba* shoot and nodule biomass in both cultural systems: *V. faba* ( $R^2 = 0.57^{***}$ ) and *V. faba*-wheat association ( $R^2 = 0.40^{***}$ ). A higher efficiency in use of rhizobial symbiosis was observed in monoculture than in association, with EURS of  $53 \pm 15$  and  $38 \pm 16$  sDW  $g^{-1}$  nDW, respectively. Mode of culture seems to have an important effect on *V. faba* plant growth which was favored in wheat non-associated system. Nevertheless, N fertilizer has no significant effect on *V. faba* plant growth. A possible explanation could be that symbiotically-fixed N from plant nodules covers the

plants needs and therefore additional N input does not make a significant difference on plant growth, at the three levels tested in Camargue sites.



**Figure 1.** Correlation between shoot and nodule dry weight ( $\text{g plant}^{-1}$ ) of *V. faba* cv minor (left) and with wheat association (right) cultures. Plants are harvested at flowering stage.



**Figure 2.** Shoot (left) and nodule (right) dry weight ( $\text{g plant}^{-1}$ ) of *V. faba* cv minor in sites submitted to different N fertilizations. Data are means and SD of 20 replicate harvested at flowering stage without (□) and with wheat association (■). Plants are harvested at flowering stage.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This work was supported by the Great Federative Project FABATROPIMED financed by Agropolis Fondation under the reference ID 1001-009. The authors thank farmers from Languedoc-Roussillon.

## REFERENCES

- Aschi et al. (2017). Applied Soil Ecology 120 : 219-228.  
 Bargaz, A. et al. (2011). Symbiosis 53 : 157-164.  
 Perkins, J. H. & Jamison, R. (2008). Springer Netherlands, p 59-83.

## Article 5. Chapitre d'ouvrage

### Légumineuses et efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne en milieu rizicole de Camargue

O., Domergue<sup>1\*</sup>, D., Blavet<sup>2</sup>, P., Mc Donald<sup>2</sup>, J.C., Mouret<sup>3</sup>, J.J., Drevon<sup>4</sup> <sup>1</sup>INRA, LSTM, Campus de Baillarguet TA A82/J 34398 Montpellier, France <sup>2</sup>IRD, Eco&Sols, 1 Place Viala, 34060 Montpellier, France <sup>3</sup>INRA, Innovation, 1 Place Viala, 34060 Montpellier, France <sup>4</sup>INRA, Eco&Sols, 1 Place Viala, 34060 Montpellier, France [\\*Odile.domergue@supagro.inra.fr](mailto:Odile.domergue@supagro.inra.fr)

#### Table des matières

Résumé.....	215
Introduction.....	215
Méthode d'investigation.....	216
Résultats et discussion.....	218
1. Féverole.....	218
1.1. <i>Croissance et nodulation</i> .....	218
1.2. <i>Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR)</i> .....	218
2. Luzerne.....	219
2.1. <i>Croissance et nodulation</i> .....	219
2.2. <i>Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR)</i> .....	220
Conclusion.....	223
Remerciements.....	223
Références.....	224



## Résumé

La Camargue se caractérise par des écosystèmes complexes soumis à des contraintes édaphiques et climatiques fortes des régions Méditerranéennes. La culture de riz irrigué permet une désalinisation des sols, mais nécessite de gros apports de pesticides et herbicides. L'une des alternatives pour réduire les intrants et éviter le développement de pathogènes et de mauvaises herbes est de diversifier les systèmes de cultures en introduisant des légumineuses. En symbioses avec des rhizobia et des mycorhizes, les légumineuses fixatrices d'azote atmosphérique, permettent une acquisition et une utilisation efficace de N et P, ainsi qu'une augmentation de la matière organique (MO) du sol. Elles répondent ainsi aux exigences d'une agriculture durable, respectueuse de l'environnement. Pour la luzerne, en première année sous couvert du blé, le nombre de nodules a varié de 4 à 22 par plante pour une production moyenne de 1 à 11 g de matière sèche aérienne par plante. Dans un groupe de placettes où la nodulation était relativement forte, l'absence de corrélation avec la croissance aérienne suggère l'existence de rhizobia peu efficaces. En revanche dans un autre groupe de placettes, plus nombreuses, une relation positive est trouvée entre ces deux paramètres permettant d'estimer l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR). Pour la féverole, les croissances et nodulations, ainsi que l'EUSR, s'avèrent plus élevées en monoculture qu'en association avec le blé. Dans les systèmes bas intrants, la fixation d'azote peut donc être optimisée.

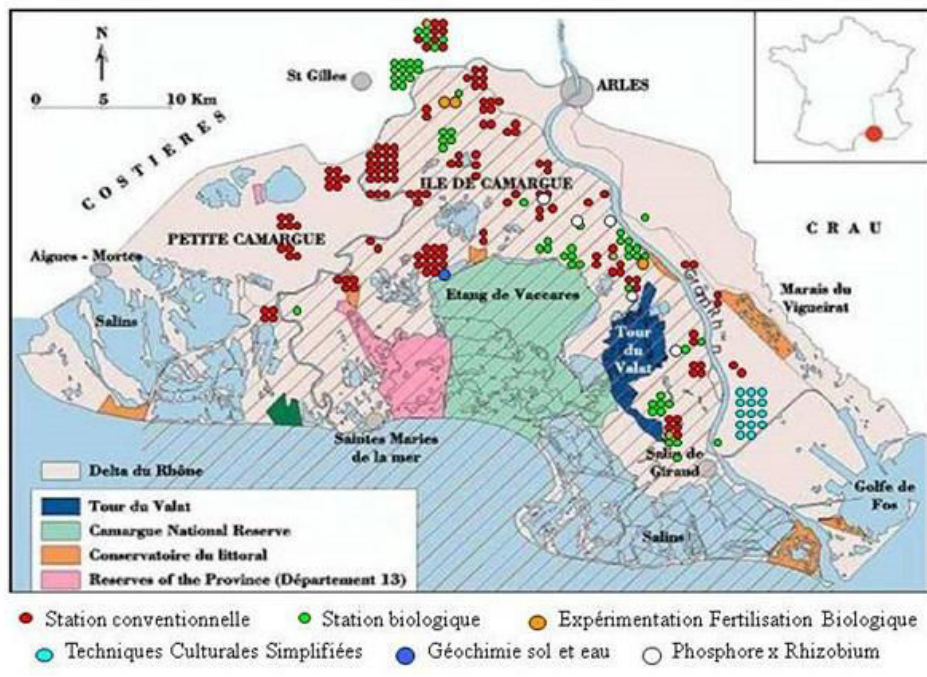
## Introduction

L'intensification des systèmes de cultures, durant la "Révolution Verte", a permis d'augmenter la production alimentaire (Perkins and Jamison, 2008), mais celle-ci a des impacts négatifs sur les cycles biogéochimiques, ainsi que sur la biodiversité, les sols et les eaux des écosystèmes. L'actuel défi est de découvrir comment conduire une intensification écologique des agrosystèmes en conservant les ressources naturelles et la qualité de l'environnement pour les générations futures. Ceci implique des approches d'amélioration de la fertilité des sols et d'innovation des systèmes de cultures. La sélection variétale peut y contribuer en améliorant l'efficacité d'utilisation des éléments nutritifs, l'eau et l'énergie. Les légumineuses peuvent y jouer un rôle majeur par leurs services écosystémiques fondés sur leur aptitude à (i) fixer biologiquement l'azote atmosphérique, en association avec des bactéries du sol nommées rhizobia, (ii) diversifier les systèmes de cultures en association ou rotation avec des céréales (Aschi et al., 2017). Cependant, la fixation symbiotique de l'azote

(FSN) est fortement impactée par l'efficacité d'utilisation du phosphore (EUP) et dépendante de l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) (Drevon et al., 2011). Dans notre étude, l'EUSR a été évaluée chez la féverole (*Vicia faba* cv minor) et la luzerne (*Medicago sativa*) en systèmes de culture céréalière de Camargue, sur des placettes agronomiques d'agriculteurs où la teneur en P bio-disponible était variable.

### Méthode d'investigation

Cette étude consiste en une démarche de diagnostic agronomique en réseau de placettes chez des agriculteurs mobilisés dans le cadre de recherches participatives. Elle repose sur un choix d'exploitations agricoles en cultures conventionnelles ou biologiques, avec une prise en compte des disparités spatiales du territoire liées à la constitution géomorphologique du delta de Camargue et sa relation avec la texture et la salinité des sols (Fig. 1).



**Figure 1.** Situations des placettes agronomiques

Ces sols sont argilo-calcaires, sableux et limoneux, souvent hydromorphes (Fig. 2), avec un pH alcalin favorable à une interaction forte entre Ca et P, pouvant conduire à une diminution de la biodisponibilité de P du sol pour les plantes.



**Figure 2.** Hydromorphie des sols

Dans cette étude sont comparées différents niveaux de fertilisation N sous forme d'urée et d'ammonium, sur luzerne sous couvert de blé, et sur féverole, en rotation *versus* association avec le blé dur (Fig. 3).



**Figure 3.** Systèmes de culture.

En quatre points dans chaque placette, cinq plantes sont prélevées à la floraison, stade où la FSN est maximale.

Au laboratoire, les racines sont séparées du sol proche les environnant, elles sont ensuite lavées et les nodules sont prélevés et dénombrés (Nn). Pour chaque plante échantillonnée, les parties aériennes, racinaires et nodulaires sont séchées 24 h à 70 °C pour la mesure des biomasses aériennes (MSa) et nodulaires (MSn).

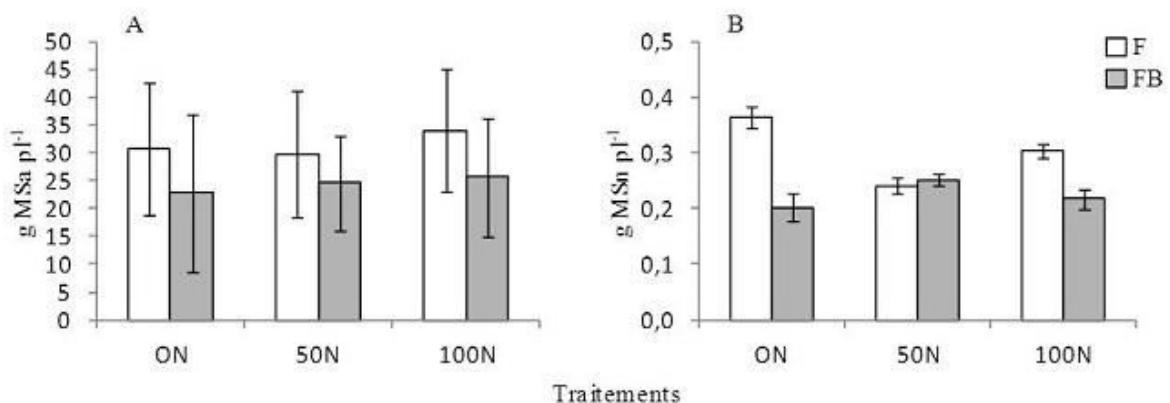
L'analyse statistique de l'EUSR est réalisée par analyse de régression de la croissance aérienne en fonction de la nodulation (Lazali et al., 2016b).

## Résultats et discussion

### Féverole

#### 1.1. Croissance et nodulation

La figure 4A montre une croissance supérieure de la féverole en culture pure (F) qu'en culture associée au blé dur (FB). Pour les deux systèmes de culture, la fertilisation N n'a aucun effet significatif sur la croissance. L'une des explications serait que la symbiose rhizobienne couvre les besoins en azote de la légumineuse, comme semble l'attester la figure 4B en F non fertilisée (ON).

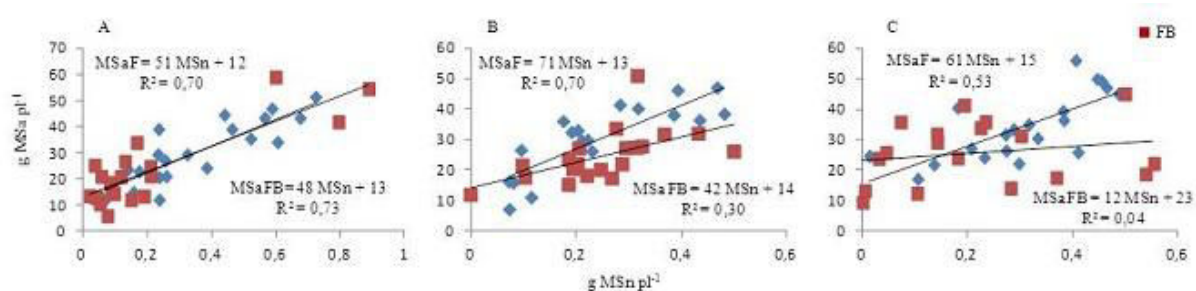


**Figure 4.** Biomasses sèches moyennes (g pl<sup>-1</sup>) des parties aériennes (A) et nodulaires (B) de féveroles en culture pure (F) ou associée au blé dur (FB) sur des placettes soumises à trois niveaux de fertilisations N. Les données sont les moyennes et écart-type de 20 plantes de féveroles par traitement, prélevées au stade floraison.

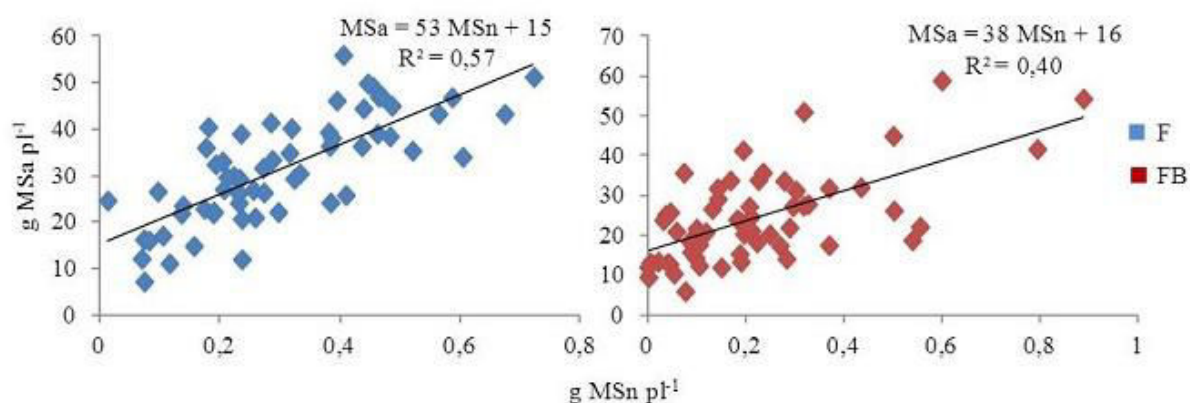
#### 1.2. Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR)

La Figure 5 montre que les corrélations entre les biomasses des parties aériennes (MSa) et nodulaires (MSn) de la féverole, en culture pure (F) sous les trois niveaux d'apport d'intrants azotés sont significativement positives et que les niveaux de fertilisation n'influencent pas significativement la pente de la régression, qui est une estimation de l'EUSR.

En culture associée (FB), une diminution de corrélation entre MSa et MSn est associée à une augmentation de fertilisation N. En revanche aucun effet significatif du système de culture sur l'EUSR n'est observé sous 0N et 50N. Toutes fertilisations N confondues, les corrélations entre MSa et MSn sont significativement positives avec une EUSR en F supérieure à FB (Figure 6)



**Figure 5.** Corrélations entre les biomasses des parties aériennes et nodulaires de la féverole, en culture pure (F) ou associée au blé dur (FB), sous trois types de fertilisations. Les corrélations entre les biomasses ( $\text{g plant}^{-1}$ ) des parties aériennes (MSa) et nodulaires (MSn) de la féverole, en culture pure, sont significativement positives :  $R^2 = 0,70$  (A) ;  $R^2 = 0,70$  (B) et  $R^2 = 0,53$  (C). Quel que soit le niveau de fertilisation, aucun effet significatif n'est à noter sur l'EUSR :  $\text{MSa} = 51 (\pm 12) \text{ MSn}$  (A) ;  $\text{MSa} = 71 (\pm 13) \text{ MSn}$  (B) et  $\text{MSa} = 61 (\pm 15) \text{ MSn}$  (C). En culture associée, une diminution de corrélation entre MSa et MSn est associée à une augmentation de fertilisation N :  $R^2 = 0,70$  (A) ;  $R^2 = 0,30$  (B) ;  $R^2 = 0,04$  (C), sans effet significatif sur l'EUSR avec  $\text{MSa} = 45 (\pm 13) \text{ MSn}$  (A) et (B), et non significatif en (C). L'échantillonnage a été réalisé au stade floraison, après culture sous 0 N (A), 50 N (B) ou 100 N (C).



**Figure 6.** Corrélations entre les biomasses aériennes et nodulaires de la féverole en culture pure (A) ou associée au blé dur (B), sous trois fertilisations confondues. Les corrélations entre les biomasses ( $\text{g plant}^{-1}$ ) des parties aériennes (MSa) et nodulaires (MSn) de la féverole, en culture pure (F) et associée au blé dur (FB), sont significativement positives :  $R^2 = 0,57$  (F) et  $R^2 = 0,40$  (FB). Avec des EUSR =  $53 \pm 15 \text{ g MSa g}^{-1} \text{ MSn}$  (F) et EUSR =  $38 \pm 16 \text{ g MSa g}^{-1} \text{ MSn}$  (FB), une EUSR supérieure en F est à noter par rapport à FB. L'échantillonnage a été réalisé au stade floraison, après culture sous 0 N (A), 50 N (B) ou 100 N (C).

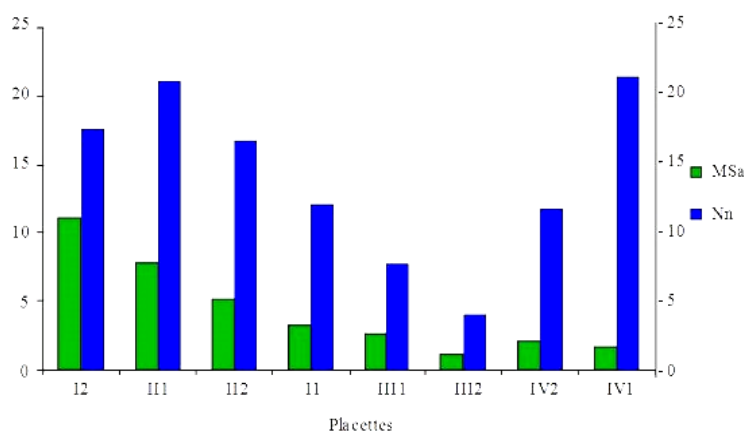
## 2. Luzerne

### 2.1. Croissance et nodulation

En étudiant la production moyenne de matière sèche aérienne de la Figure 7 nous pouvons distinguer 2 groupes de producteurs : 1) les producteurs I et II avec une croissance moyenne

de 3 à 11 g MSa; 2) les producteurs III et IV avec une croissance moyenne réduite entre 1 et 2,5 g MSa. On observe également une variabilité de la nodulation selon les placettes : de 4 nodules par plante en moyenne dans la placette III2, à 22 nodules par plante en moyenne dans la placette IV1 (Fig. 7).

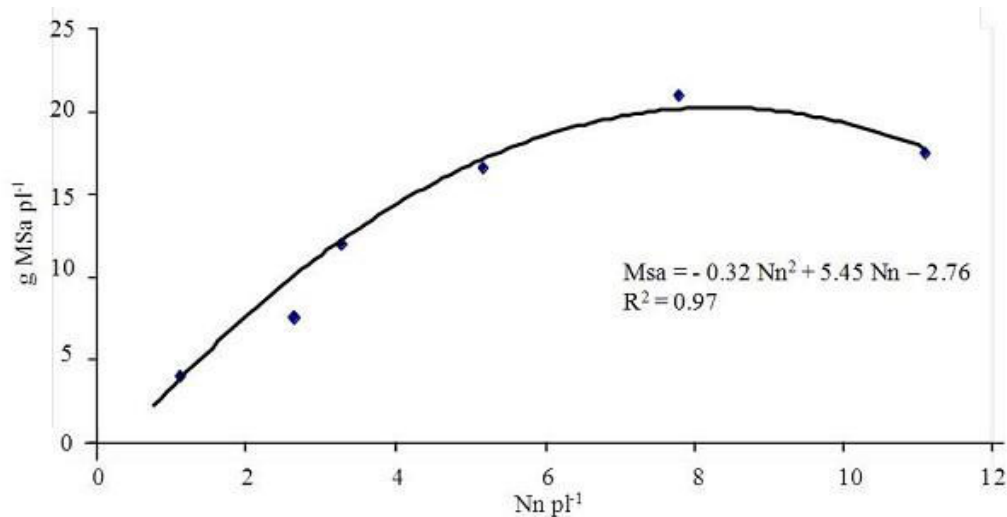
Les placettes II1, II2, I1, III1 et III2 constituent une série dans laquelle une augmentation du nombre moyen de nodules par plante se traduit par une production moyenne de MSa croissante. Cette série nous suggère que la symbiose rhizobienne est liée à la croissance de la plante. A l'inverse, la luzerne dans les placettes IV a produit une faible MSa pour un nombre moyen de nodule par plante élevé, voire maximal (Fig. 7). Ces deux placettes sont donc totalement hors de la série auparavant définie.



**Figure 7.** Moyenne des matières sèches (MSa) et du nombre de nodules (Nn) de luzerne chez 4 agriculteurs de Camargue

## 2.2. Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR)

Sur les moyennes de croissance et de nodulation par placette, en excluant les placettes IV de la figure 7, une régression polynomiale de degré 2 explique significativement la relation entre la production de MSa et le nombre de nodules (Fig. 8). Selon cette régression, une augmentation du nombre de nodules est liée à une production plus importante de MSa pouvant atteindre un nombre maximal de 8 nodules par plante. Au-delà de ce niveau de nodulation, la régression suggère une tendance inverse.

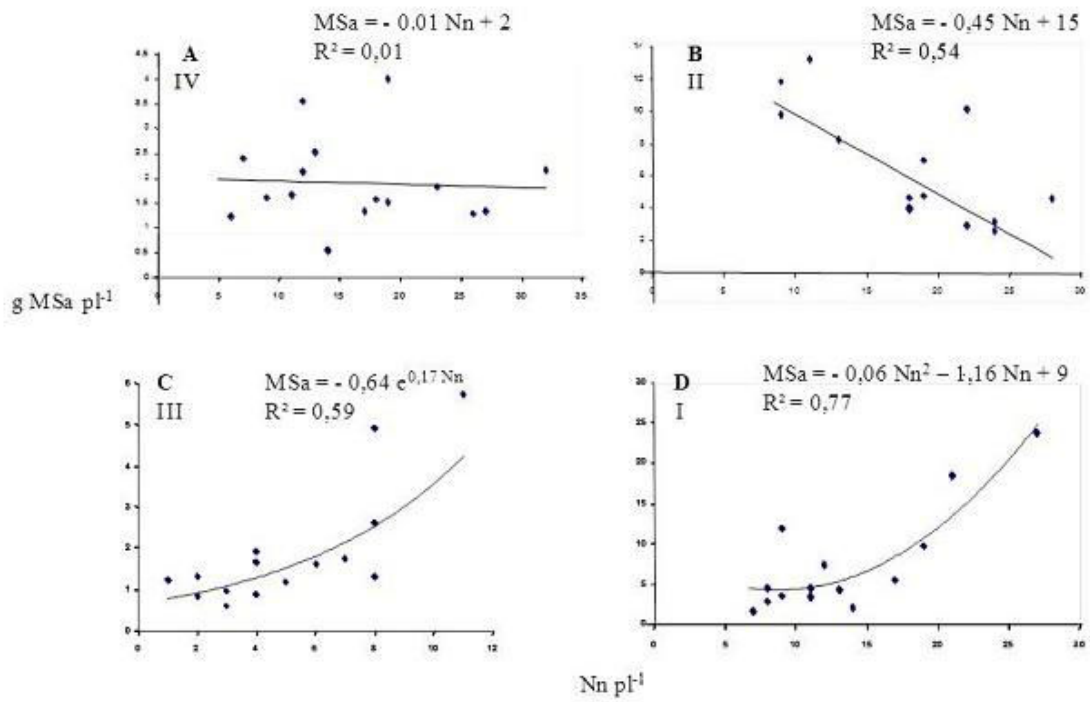


**Figure 8.** Corrélations entre les moyennes de biomasses des parties aériennes (g Msa plant<sup>-1</sup>) et du nombre de nodules (Nn plant<sup>-1</sup>)

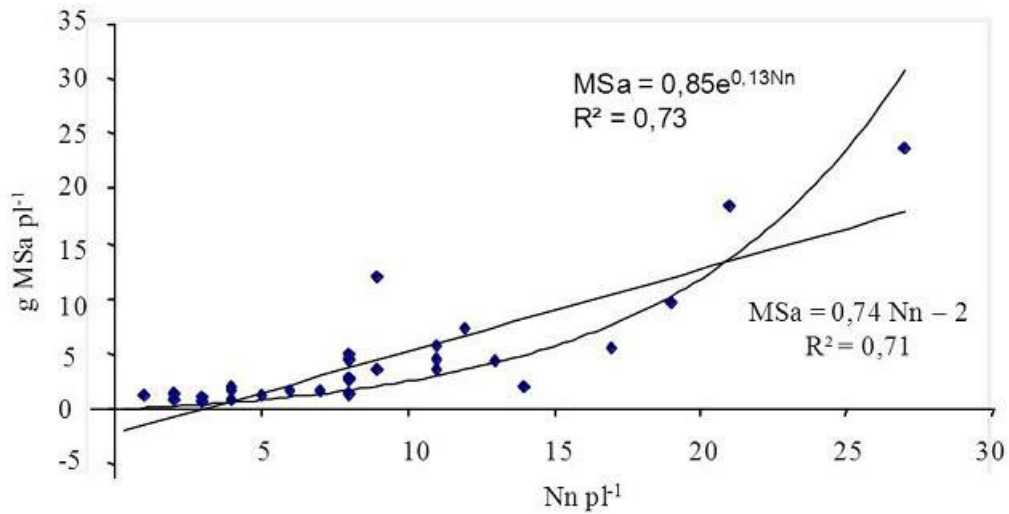
Lorsqu'on regroupe les données obtenues sur les deux placettes de chaque producteur nous pouvons distinguer 3 situations : 1) dans les 2 placettes IV, la Msa et le nombre de nodules ne sont pas corrélés (Fig. 9A) ; dans les 2 placettes II, la Msa et le nombre de nodules sont négativement corrélés, ce qui serait dû à un apport d'azote minéral ou à un épandage important de fumier de mouton dans cette grande exploitation hébergeant un herbassier, selon une tradition ancienne d'association agriculture – élevage, soit, moins probablement, à la présence d'une infection des racines de luzerne par des rhizobia non-efficaces (Fig. 9B) ; dans les cas des producteurs III (Fig. 9C) et I (Fig. 9D), le nombre de nodules par plante est significativement corrélé à la production de Msa.

En regroupant dans la figure 10, les résultats des figures 9C et 9D, on observe une EUSR de 0,74 g Msa nod<sup>-1</sup>. La régression de type exponentielle suggèrerait le fait qu'il faudrait passer un seuil de nodulation de 15 nodules par plante pour que la symbiose rhizobienne soit la plus efficace pour la production de Msa de luzerne. Des modèles de régression de type exponentiel ont été utilisés pour ces 4 stations. Pour un faible nombre de nodules, la symbiose ne jouerait qu'un rôle réduit sur la croissance de la plante.





**Figure 9.** Relations entre nombre de nodules et production de MSA chez les 4 producteurs camarguais



**Figure 10.** Nombre de nodules en fonction de la production de MSA dans les placettes III et I.



## Conclusion

La croissance des légumineuses et l'efficacité de la symbiose rhizobienne varient selon qu'elles sont cultivées en monoculture ou en culture associée à la céréale. Les tests multiloaux montrent aussi certains sols hébergeant de microbes bénéfiques à l'adaptation des légumineuses N<sub>2</sub>-dépendantes en sols pauvres en P. Une prospection raisonnée de ces microbes bénéfiques permettrait une inoculation de précision pour transférer ces microbes dans les sols qui paraissent moins bien pourvus selon le diagnostic nodulaire.

Globalement, nos observations en Camargue et dans d'autres agro-écosystèmes du bassin Méditerranéen nous conduisent à proposer l'hypothèse suivante d'un cercle vertueux de fertilité par les microbes symbiotiques et rhizosphériques associés aux légumineuses: puisque les légumineuses ont besoin de P pour leur FSN, elles auraient développé d'intenses interactions avec les microbes pour acquérir le P du sol, et le bénéfice pour la fertilité des sols serait d'autant plus élevé que l'EUP pour FSN des légumineuses est élevée.

Puisque le phosphore devient une ressource rare, non substituable, l'efficacité du P (EUP) pour la FSN peut être suggérée aux améliorateurs afin d'assurer que les légumineuses sélectionnées fixent l'azote en nécessitant des quantités modérées de P. De fait, une variabilité génétique en EUP pour la FSN a été trouvée en culture hydroaéroponique sous serre climatisée pour diverses espèces de légumineuses incluant *P. vulgaris*, *V. unguiculata*, *V. subterranea* et la légumineuse modèle *M. truncatula*. D'autant plus que des tests multiloaux avec le haricot en agro-écosystèmes autres que ceux de Camargue, montrent que les génotypes à forte EUP pour FSN sont mieux adaptés aux sols pauvres en P disponible. La sélection en hydroaéroponie serait donc une méthodologie pertinente pour sélectionner des légumineuses pour les sols pauvres en P. Elle pourrait être appliquée aux luzernes et féveroles cultivables en Camargue.

En conclusion, l'introduction de diverses espèces de légumineuses peut être envisagée dans une approche d'ingénierie écologique pour améliorer les fonctions environnementales et la biodiversité des systèmes de production céréaliers en Camargue, et ce d'autant mieux que leur efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation d'azote seraient élevées.

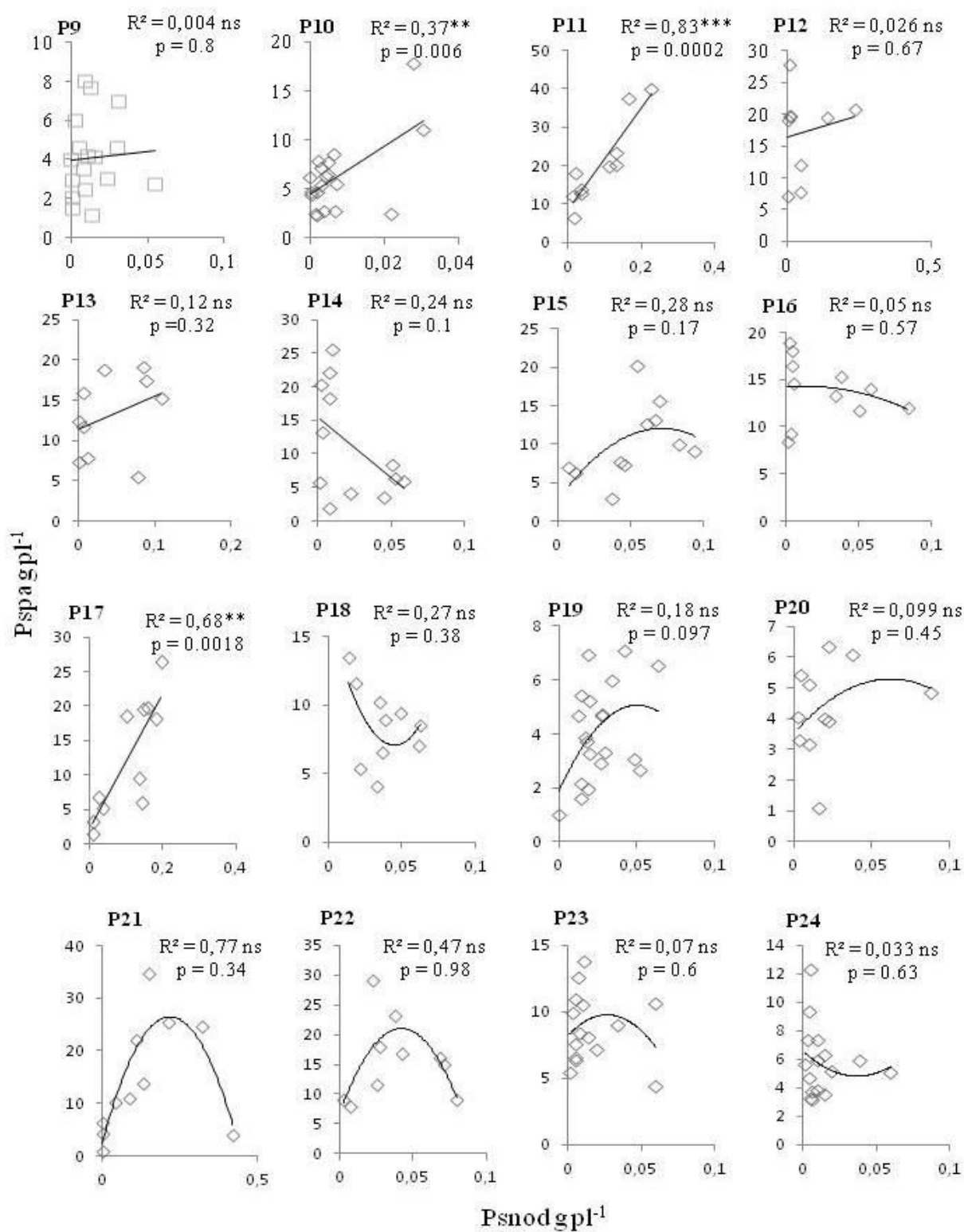
## Remerciements

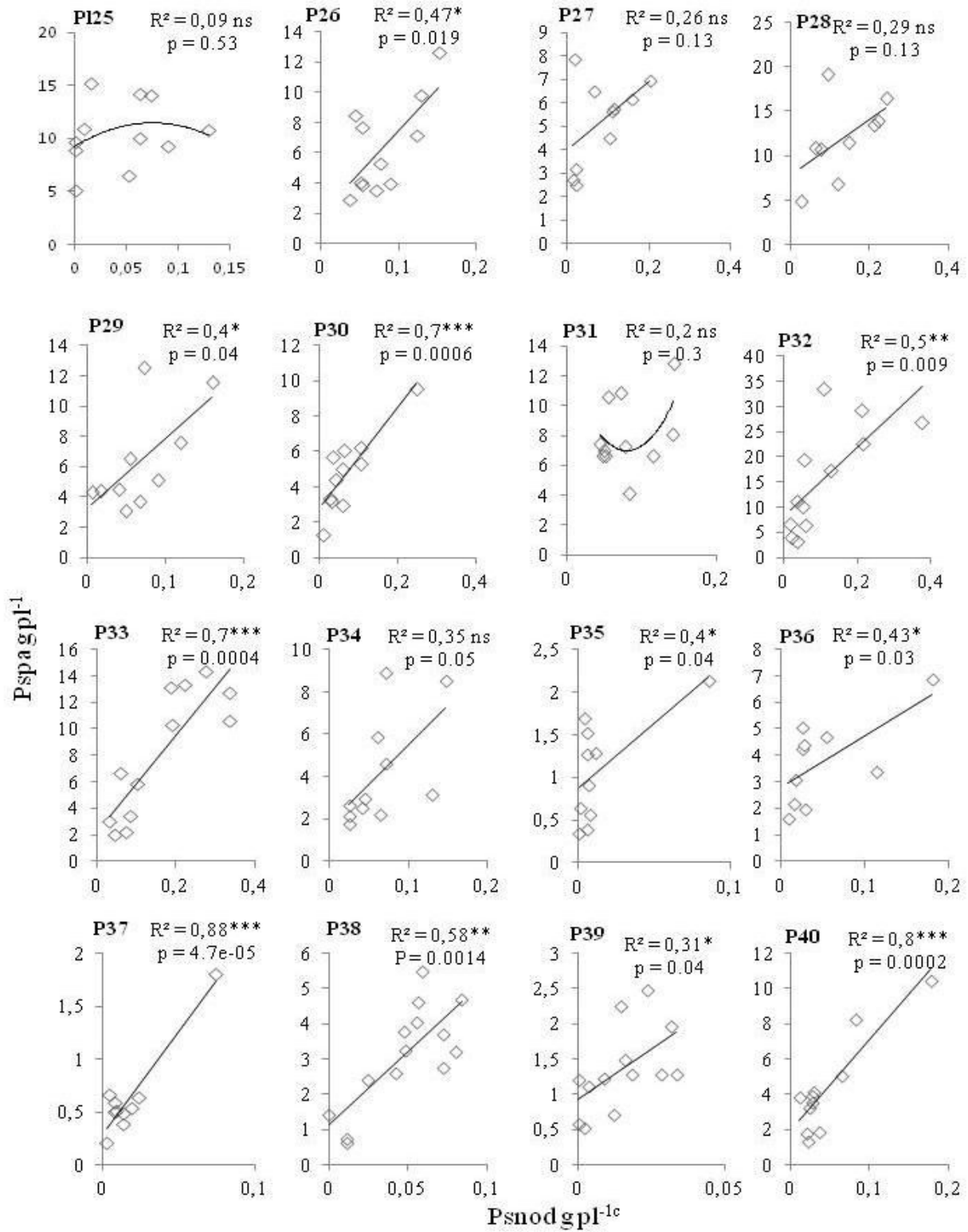
L'étude sur la féverole et la luzerne a été soutenue respectivement par le grand projet fédérateur FABATROPIMED, financé par Agropolis fondation sous la référence ID 1001-009, et l'IFR 124 Ecosystem financé par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. Pour l'ensemble du travail, les auteurs remercient les agriculteurs de Camargue.

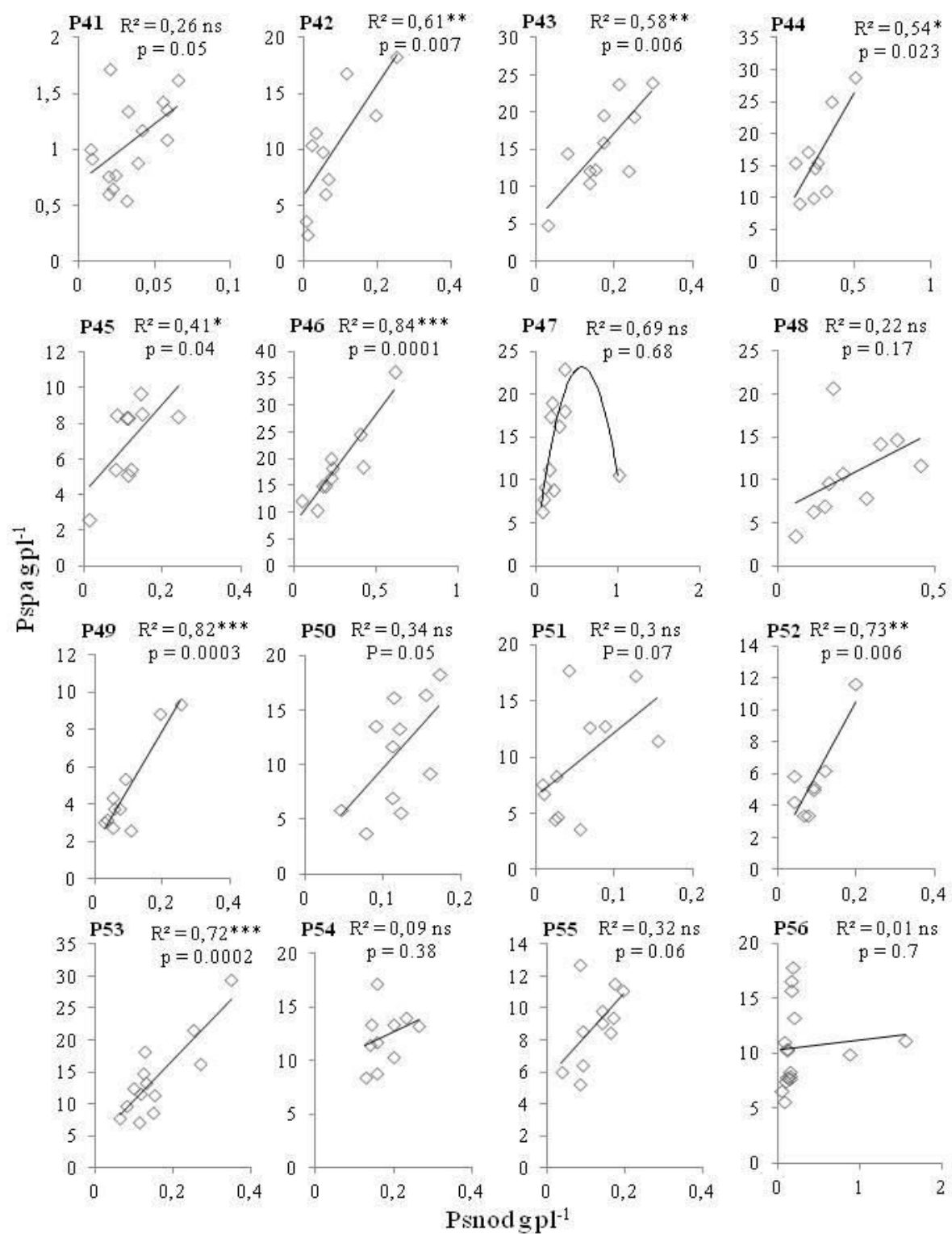
## Références

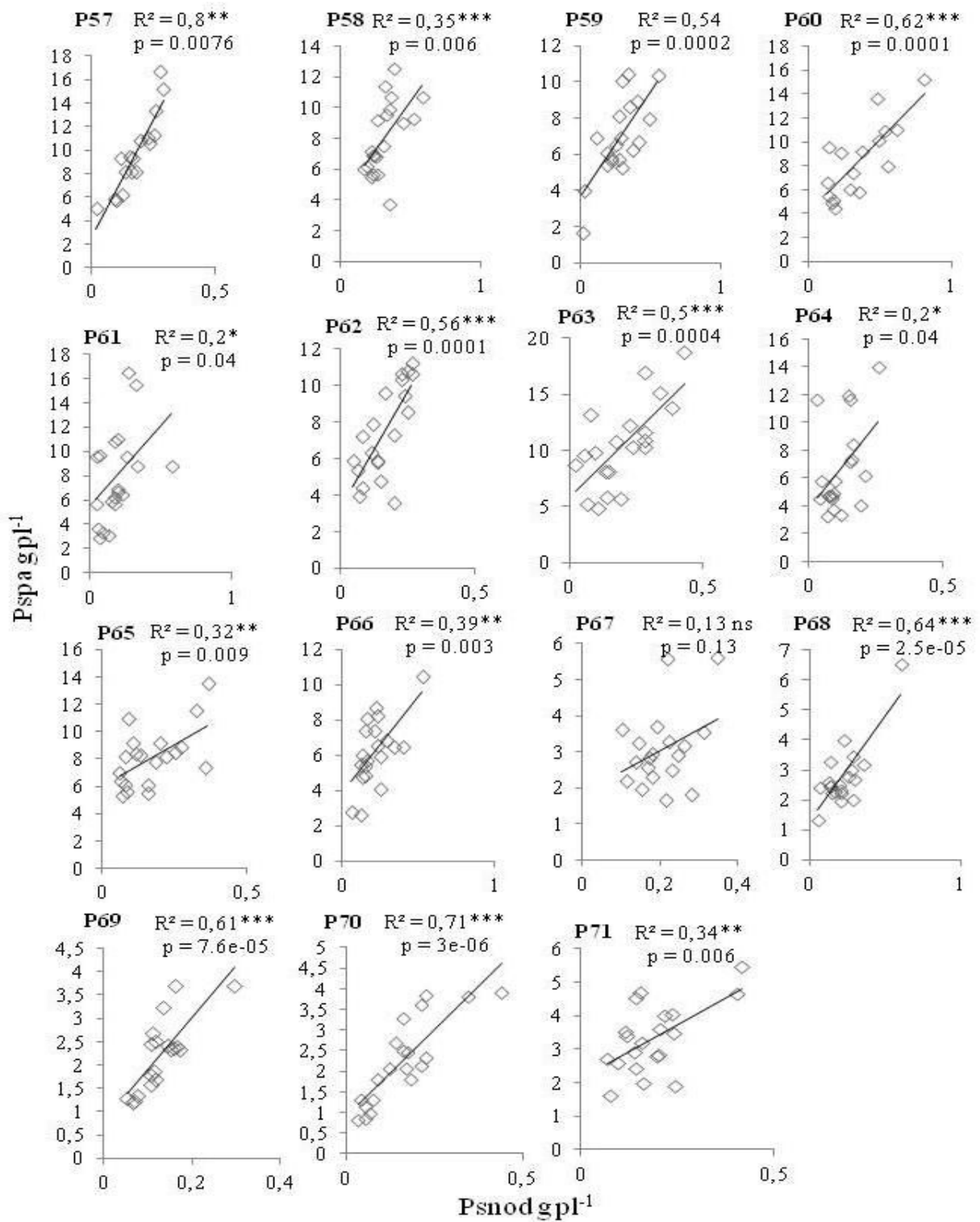
- Aschi, A., Aubert, M., Riah-Anglet, W., Néliu, S., Dubois, C., Akpa-Vinceslas, M., Trinsoutrot-Gattin, I. 2017. Introduction of Faba bean in crop rotation: Impacts on soil chemical and biological characteristics *Applied Soil Ecology* 120 : 219-228.
- Decroux, J., Muller, J.C., Schwartz, C. 2005. Guide de la fertilization raisonnée. Editions France Agricole, p. 414.
- Drevon, J. J., Alkama, N., Araujo, A., Beebe, S., Blair, M. W., Hamza, H. & Tajini, F. 2011. Nodular diagnosis for ecological engineering of the symbiotic nitrogen fixation with legumes. *Procedia Environmental Sciences*, 9, 40-46.
- Lazali, M., Brahim, S., Merabet, C., Latati, M., Benadis, C., Maougal, R. T. & Ounane, S. M. 2016. Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* in multi-local field tests under Mediterranean climate. *European Journal of Soil Biology*, 73, 100-107.
- Perkins, J. H., & Jamison, R. 2008. History, ethics and intensification in agriculture. In *The ethics of intensification* (pp. 59-83). Springer Netherlands.

## Annexe 2. EURS pour chacune des 63 placettes











## Résumé

L'aptitude des symbioses rhizobium-légumineuses à fixer l'azote atmosphérique, peut offrir d'importants services aux agro-écosystèmes. Cependant, associés à des contraintes biotiques (i) absence et/ou (ii) inefficacité symbiotique des rhizobia du sol, des facteurs abiotiques (i) excès d'intrants azotés et/ou (ii) carences en phosphore (P) peuvent limiter la fixation symbiotique d'azote (FSN). Le Myo-inositol hexakisphosphate (phytate), principale composante de P organique (Po) du sol, représente une potentielle source de P disponible du sol, bio-disponible pour la plante, en lien à des activités phytases microbiennes, minéralisatrices du phytate. Afin de rechercher des rhizobia, symbiontes de *Vicia faba*, efficaces dans l'utilisation du P (EUP) pour la FSN, nous avons réalisé un diagnostic nodulaire multilocalisé, en agro-écosystèmes sud de France. Le niveau d'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR), en intra- et inter-placettes agricoles et en conditions hydroaéroponiques en serre, a été déterminé en corrélation des biomasses aériennes et nodulaires de plants de *V. faba*, à floraison. Parmi 59 isolats de *V. faba*, 26 sont aptes à minéraliser le phytate (Phy+), en milieu solide et six d'entre eux confirment une activité phytase, en culture liquide. L'intérêt d'une sélection de rhizobia locaux aptes à une EUP pour FSN, nous a conduits à une avancée dans la sélection de marqueurs moléculaires phytases pour le criblage d'isolats rhizobiens Phy+.

## Mots Clés

Rhizobium, diversité, phytase, féverole, *Vicia faba*, France-sud, agro-écosystème.

## Abstract

The ability of rhizobium-legume symbiosis to fix atmospheric nitrogen can provide important services to agro-ecosystems. However, associated with biotic constraints (i) missing and/or (ii) phosphorus (P) deficiency, can limit symbiotic nitrogen fixation (SNF). Myo-inositol hexakisphosphate (phytate), the main soil organic P (Po) component, represents a potential source of soil P available for plant P bio-availability, connected with microbial phytate-mineralizing activities. In order to look for rhizobium-*Vicia faba*, in P use efficiency (PUE) for SNF ability, nodular diagnosis was performed from a multi-location survey in an agro-ecosystem in South France. The efficiency in use of rhizobial symbiosis (EUSR) was deduced from *V. faba* nodule and shoot dry weight values at flowering state, and compared in intra- and inter agricultural fields and in greenhouse hydroaeroponic conditions. Among 59 *V. faba* isolates, 26 were able to mineralize phytate (Phy+) in solid medium and six of them confirmed phytase activity in liquid culture. Looking for local rhizobia with PUE for SNF ability, led us to a forward step in molecular marker selection for Phy+ rhizobium isolate screening.

## Keywords

Rhizobium, diversity, phytase, faba-bean, *Vicia faba*, South-France, agro-ecosystem.