



لجمهورية الجزائر الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et écologie végétale **اقسم بيولوجي وعلم البيئة النباتية**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie et génomique végétale

Intitulé :

Caractérisation et évolution de la taille de la communauté
bactérienne totale et fonctionnelle dans la rhizosphère du haricot et
création d'une base de données

Présenté et soutenu par : BENTOBBAL BOUBA

Le : 20/06/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury : HAMIDCHI M A (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : MAOUGAL R T (MCB - UFM Constantine).

Examineurs : TAMAGOULT M (MAA- UFC Constantine).

Année universitaire
2016 - 2017

DÉDICACE

Je dédie ce travail à :

Mon très cher Père et ma très chère mère qui ont toujours cru en moi, pour les sacrifices et tous Les efforts qu'ils ont fait pour faire de moi la femme que je suis aujourd'hui. Que Dieu Les récompense pour tous ces bienfaits

Mon frère Walid et mon mari Amine pour leur affection et leur patience ainsi qu'à leur enthousiasme et leur solidarité

Ma copine et mon âme sœur Choubaila qui a toujours cru et était la pour moi

Mes cousins et cousine Batoul Kharwla Asma Amira Hadjer Naila Mahi Amar.

Mes beaux parents pour leurs soutiens, leurs encouragements

Ma grand-mères et mon grand père à qui je souhaite bonne sante et longue vie et que dieu les garde pour moi.

Toute ma famille

Tous mes amis

REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui ma donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu je tiens à remercier du fond du cœur Dr. MAOUGAL RYM T enseignante à INATA Constantine, qui a encadrée ce travail au quotidien. Elle fut toujours présente, en particulier lorsque je me suis confrontée au doute, je lui suis reconnaissante pour : sa grande disponibilité, son ouverture d'esprit, ainsi que pour ses multiples et précieux conseils scientifiques, professionnels ou tout simplement humaines.

Un grand remerciement à mon Co-encadreur Mr chehili hamza enseignant à l'université des frère Mentouri-Constantine pour son aide et ses conseils.

Je tiens à remercier également le président du jury Mr Mohamed Abdelhafid HAMIDECHI, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mentouri-Constantine, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Merci à Mr M.TAMAGOULTE enseignant à l'université Mentouri-Constantine membres du jury d'avoir accepté d'assister et de juger mon travail.

Merci à Mr N.belbekri, ingénieur de laboratoire, ainsi qu'à Chafika Zahraoui et ryma bouldjadj pour leur soutien moral, technique, leur disponibilité et leur dynamisme.

Merci à mes collègues de master pour leur enthousiasme et leur solidarité.

Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Abréviations

ANOVA	Analyse of Variance
ATP	Adénosine Triphosphate
BD	Base de Données
BET	Bromure d'ethidium
CNCC	Centre national de certification et control des semences
CTAB	Cetyle Trimethyl Ammonium Bromure
Milieu LB	Milieu Luria Bertani
NBRIP	National Botanical Research Institute phosphate
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
P	Phosphore
PBS	Phosphate Sodium Buffer
Pi	Phosphore inorganique
Pm	Phosphore minéral
Po	Phosphore Organique
RILs	Recombinant Inbred Line
SGBD	Système de gestion des bases de données
SR	Sol Rhizosphérique
UFC	Unité Formant Colonie

Résumé

Un lien étroit existe entre les microorganismes du sol et la plante parmi ces liens le processus de rhizodeposition est connu pour moduler la structure, la densité et l'activité des communautés microbiennes dans l'environnement rhizosphérique. Des expériences menées dans cette étude consistent à élargir les connaissances du fonctionnement de la rhizosphère, et de la structuration des communautés bactériennes. Les communautés bactériennes totales, actives et cultivables de la rhizosphère sont caractérisées en relation avec différentes perturbations (variations au niveau du génotype et stade phénologique de la plante,). L'établissement, *in vitro*, du profil fonctionnel des populations bactériennes associées à différents RILs et stades de développement du haricot, permet de mettre en évidence les fonctions bactériennes dont la fréquence est affectée par ces deux facteurs liés à la plante. Il ressort que la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique totale varie entre $2,3 \cdot 10^6$ Log UFC.g⁻¹ et $7,3 \cdot 10^7$ Log UFC.g⁻¹ de sol. La lignée 115 semble héberger la communauté la plus élevée alors que la lignée 83 (déficiente en utilisation du phosphore) présente la communauté la plus basse. Les communautés bactériennes fonctionnelles sont présentes dans le sol de la plante *P. vulgaris*. Toutefois les différents RILs ont un effet sur la taille de ses dernières dans la rhizosphère il y a une plus grande mobilisation des bactéries fonctionnelles chez les lignées déficientes en P et le passage de la montaison de la plante semble être un stade critique, à partir duquel l'influence de la plante augmente.

Mots clefs : rhizosphère, communauté bactérienne totale et fonctionnelle, aspect cultivable, *Phaseolus vulgaris*, phytate,.

Abstract

A close link exists between the soil microorganisms and the plant among these bonds the rhizodeposition process is known to modulate the structure, density and activity of microbial communities in the rhizospheric environment. Experiments carried out in this study consist in widening the knowledge of the functioning of the rhizosphere and the structuring of bacterial communities. The total, active and cultivable bacterial communities of the rhizosphere are characterized in relation to different perturbations (variations in the genotype and phenological stage of the plant). The establishment, in vitro, of the functional profile of the bacterial populations associated with different RILs and stages of development of the bean, makes it possible to highlight the bacterial functions whose frequency is affected by these two factors related to the plant. The size of the total rhizospheric bacterial community varies between $2.3 \cdot 10^6$ Log UFC.g⁻¹ and $7.3 \cdot 10^7$ Log UFC.g⁻¹ soil. Line 115 appears to harbor the highest community, while line 83 (deficient in phosphorus use) has the lowest community. Functional bacterial communities are present in the *P. vulgaris* soil. However, the different RILs have an effect on the size of rhizospheric bacterial communities the latter in the rhizosphere there is a greater mobilization of functional bacteria in the P-deficient lines and the passage of the plant upstream seems to be a critical stage, Influence of the plant increases.

Keywords: rhizosphere, total and functional bacterial community, cultivable aspect, *Phaseolus vulgaris*, phytate.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Bactéries mise à disposition du phosphore	7
Figure 2 Le cycle du phosphore dans le sol (adapté de pirzynski <i>et al.</i> 2002).....	11
Figure 3 structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités d'interagir tant avec des cations métalliques comme avec des résidus des protéines (Kerovuo <i>et al.</i> , 2000).....	14
Figure 4 Classification des phosphatases présentant les deux principaux groupes de phytases: les histidines phytases et les phytases métallo-dépendantes (B.Mitchell et K. Vogel, 1997).....	15
Figure 5 Classification des BD biologiques (DJEKOUN A, HAMIDCHI A H)	22
Figure 6 Décomposition d'un SGBD.....	23
Figure 7 La culture de <i>Phaseolus vulgaris</i> au champ dans la parcelle du CNCC au khroub dans la wilaya de Constantine	26
Figure 8 Photo du site où se sont effectués les récoltes des sols(CNCC)	27
Figure 9 Schéma représentant la méthode d'ensemencement par la technique dite de la goutte.....	28
Figure 10 Croissance des bactéries isolées depuis le sol des différentes RIL de <i>Phaseolus vulgaris</i> après 48h d'incubation sur milieu LB.....	38
Figure 11 La densité bactérienne des lignées suffisantes en P versus les lignées déficientes en P aux trois stades du développement de la plante <i>Phaseolus vulgaris</i> . Log UFC.g ⁻¹ sur milieu LB	39
Figure 12 Croissance des bactéries isolées depuis le sol des différentes RIL de <i>Phaseolus vulgaris</i> après 96h d'incubation sur milieu NBRIP montrant un halo significatif à la présence de bactéries solubilisatrices de P	42
Figure 13 La densité bactérienne spécifique des lignées suffisantes en P versus les lignées déficientes en P aux trois stades du développement de la plante <i>Phaseolus vulgaris</i> .LogUFC.g ⁻¹ sur milieu NBRIP	43
Figure 14 Dépôt des produits de l'extraction dans les puits sur le gel d'agarose 1,5%	47

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I Références bibliographiques :	4
I-/La vie dans le sol	4
1-Définition du sol :	4
2-Rhizosphère :	4
3-Diversité microbienne du sol :	5
3-1/Le rôle des micros organismes :	6
3-2/ Les bactéries du sol :	6
3-3/Les échanges induites par les racines :	7
4-/ La rhizodéposition :	7
II-/ Le phosphore dans le sol	8
1-/Le phosphore :	8
2-/La biodisponibilité du P dans le sol :	9
3-/Le phosphore et son importance pour la plante :	9
4-/Le cycle du phosphore :	10
5-/Différentes formes du phosphore dans le sol :	11
5-1-/Phosphore inorganique (minéral) :	12
5-2-/Phosphore Organique :	12
6-/Le phytate :	13
7-/Les phytases :	13
Classification des phytases :	14
III-/ Bactéries minéralisatrices de phytate dans la rhizosphère :	15
1-/Minéralisation du phosphate par les microorganismes du sol :	15
2-/Gène responsable de la solubilisation du Phosphore chez les micro-organismes :	16
3-/Les bactéries solubilisatrices du Phosphore inorganique :	16

4-/Les bactéries solubilisatrices du Phosphore organique :	17
VI-/La plante modèle : Le haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>) :	17
1-/description morphologique de la plante :	17
2-/Classification de <i>Phaseolus vulgaris</i> :	18
3-/Nutrition phosphaté chez le haricot :	18
Chapitre II Les bases de données	21
1-/Généralité sur les bases de données :	21
2-/Une banque de données biologique :	21
3-/Les différents modèles de bases de données :	22
4-/Les principaux SGBD :	23
Chapitre III : Matériel et méthode	25
I-/Méthode :	25
1-/ Matériel végétal et conditions de culture :	25
2-/Prélèvement du sol :	26
3-/Isolement et Comptage bactérien:	27
3-1/ Numération des bactéries totales cultivables :	27
4-/Criblage et numération des bactéries minéralisant le phytate :	28
4-1/Qualification de la dégradation du phosphore par les bactéries isolées sur le milieu NBRIP:	28
4-2/Numération des bactéries minéralisatrices du P :	29
4-3/Conservation des isolats :	29
5-/Analyse statistique :	29
6-/Extraction et purification de l'ADN du sol :	29
6-1/L'extraction et purification de l'ADN :	29
6-2/Purification de l'ADN et quantification de l'ADN par spectrophotométrie :	30
II-/Création de la base de données :	31
1 La création de la table Access	31

Voici les étapes de la création de l'objet table de Ms Access :.....	31
-Aller sur "démarrer" au bas gauche de votre bureau. -Cliquer sur le menu "Tous les programmes". -Chercher dans la liste qui s'affiche le menu "Microsoft Office". - Cliquer sur "Microsoft Office Access 2007" pour ouvrir Access.	31
2-/Acquisition des données (Démarche) :	32
Chapitre VI Résultats et discussions	38
1-/Prélèvement du sol :.....	38
2-/ Dénombrement bactérien sur milieu LB :.....	39
3-/ Dénombrement bactérien sur milieu NBRIP :.....	42
4-/Comparaison entre la taille du pool bactérien du milieu LB et celle du pool bactérien du milieu NBRIP :.....	45
Mis en évidence de l'extraction de l'ADN du sol :.....	46
Conclusion et perspective :	49
Références bibliographiques	52
Annex	58

Introduction générale

La nutrition végétale est l'ensemble des processus qui permettent aux végétaux d'absorber dans le milieu ambiant et d'utiliser les éléments nutritifs (FAO, 2004).

Le Phosphore (P) est un élément nécessaire à la croissance des plantes, il agit sur le développement des racines en activant leur démarrage, c'est un facteur limitant pour la croissance et la productivité des plantes en raison de sa lente diffusion et de sa haute fixation dans le sol (Shen *et al.*, 2011 ; yang et finnegan, 2010). La carence en P se traduit par une réduction de développement des racines avec peu de ramification (Bennai et benabbas, 2007)

Le phosphore est généralement peu mobile dans le sol et peu disponible pour les plantes. Ainsi, l'application des engrais phosphatés peut compenser la faible disponibilité de phosphore dans les systèmes culturaux, causant son accumulation sous forme minérales et organiques (Richardson, 1994). Le phosphore organique P_o est présent en grande quantité dans le sol, il peut représenter de 25 à 80% du phosphore total dans les sols (Antoni, 2009 ; Condron et Tiessen, 2005)

La classe dominante du phosphore organique est l'inositol de phosphate, plus connu sous le nom de Phytate qui est une substance de réserve phosphorique que l'on trouve dans les graines des végétaux et dans bon nombre de racines et tubercules (Dipak et Mukherjee, 1986). La minéralisation microbienne du phytate par les enzymes phytases est un processus clé pour le recyclage du phosphore dans la biosphère (Nguyen, 2009).

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. La rhizosphère, à la jonction entre le sol et la plante, favorise une activité intense en raison de la stimulation de la microflore par la rhizodéposition et de la variété des micro-habitats. Un lien étroit existe entre les microorganismes du sol et la plante (jossi, 2008)

Les microorganismes rhizosphériques jouent un rôle fondamental dans le cycle des nutriments et la croissance des plantes. En effet ils peuvent améliorer la croissance des plantes par la production d'hormones et/ou l'augmentation et de disponibilité de nutriments qui peuvent être limitant dans les sols.

Durant la croissance de la plante, les racines produisent de nombreux composés organiques qui peuvent être libérés activement ou passivement dans le sol (Lynch et Whipps, 1990). Ainsi, du fait du processus de rhizodéposition, 40 à 90% du carbone issu de la photosynthèse peuvent être transférés dans le sol. Ce processus représente alors un flux

considérable de carbone dans la région de la rhizosphère (Lynche et Wipps, 1990). Le carbone, ainsi libéré dans la rhizosphère, est à l'origine d'une structuration de la communauté microbienne ainsi que d'une stimulation de l'activité et de la taille de la biomasse microbienne (Beniziri et Amiraïd, 2005 ; Bais *et al.*, 2006).

L'objectif de notre travail a été de caractériser la communauté bactérienne fonctionnelle impliquée dans le processus de minéralisation du phosphore organique en phosphore minéral, au sein d'environnements rhizosphériques de géotypes de haricot en étudiant la densité bactérienne chez différentes lignées contrastantes en matière d'utilisation du P et d'apprécier l'existence d'un effet structurant de ces communautés bactériennes selon la variation temporelle de la rhizodéposition au cours de la phénologie de la plante.

Le mémoire est présenté en 4 chapitres :

Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique sur la vie dans le sol, diversité microbienne du sol, le phosphore dans le sol, le phytate, le phytase, bactéries minéralisatrices de phytate dans la rhizosphère et La plante modèle : Le haricot (*Phaseolus vulgaris*).

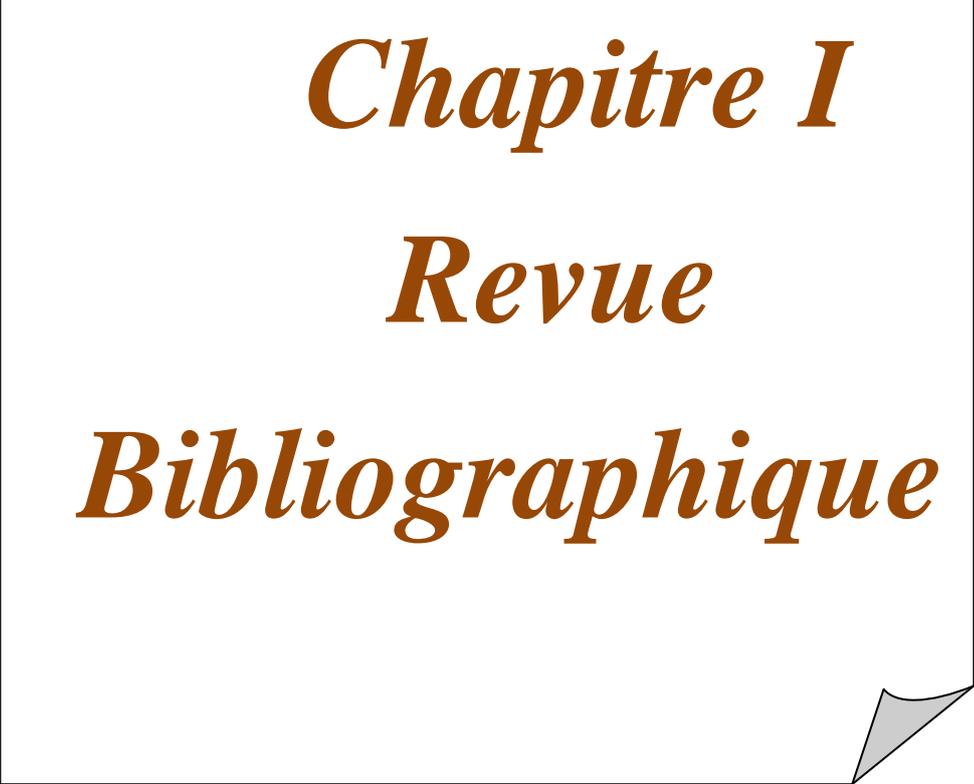
Le deuxième chapitre visualise les bases de données des bactéries minéralisant le phytate.

Le troisième chapitre qui est le chapitre du matériel utilisé et les méthodes employées : conditions de culture, prélèvement du sol, isolement et comptage bactérien et criblage des bactéries minéralisant le phytate.

Le quatrième chapitre représente les résultats de nos expériences et leurs discussions

La rédaction se termine par une conclusion et des perspectives, suivie de la liste des références bibliographiques ainsi que les annexes.

Chapitre I
Revue
Bibliographique



Chapitre I Références bibliographiques :

I-/La vie dans le sol

1-Définition du sol :

Le sol, où cohabitent les racines des végétaux, les animaux et les microorganismes, est un assemblage complexe de substances minérales et organiques, de gaz et d'eau, à l'intérieur duquel se déroulent simultanément des phénomènes de dégradation et de synthèse.

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes continentaux. Leur ensemble, dénommé pédosphère, résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. C'est l'altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne naissance au régolite (manteau superficiel de débris), lui-même transformé en ce que l'on appelle sol. Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (R. M et Bartha R, 1992).

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci). Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (Quénéa.K, 2004).

2-Rhizosphère :

La rhizosphère, terme employé pour la première fois en 1904 par Hiliner, correspond à la zone du sol soumise à l'influence des racines vivantes.

Les composantes physico-chimiques et biologiques de la rhizosphère diffèrent nettement de celles d'un sol non cultivé (Bowen et Ravin, 1999 ; Miah *et al.* 2000). Les racines elles-mêmes, par leur développement, induisent mécaniquement des modifications structurales telles que la compaction du sol à leur proximité et par conséquent une diminution de sa porosité (Foster et Bowen, 1982 ; Whiteley et Dexter, 1984 ; Young,

1998). Par ailleurs, la libération dans le sol de mucilage, substance organique gélatineuse sécrétée principalement par les apex racinaires (Rovira, 1969), permet d'augmenter la stabilité des agrégats (Helal et Sauerbeck, 1989 ; Morel *et al*, 1991 ; Traore *et al*, 2000).

L'environnement de la rhizosphère n'est pas homogène, mais il constitue une mosaïque d'habitats avec, pour chacun, des populations bactériennes propres, cette zone est composée (Davet., 1996) :

Du rhizoplan : considéré comme l'interface racine et sol, c'est la surface de la racine constituée des hyphes mycéliennes et des colonies bactériennes fortement adhérentes.

De l'endorhizosphère : le terme endorhizosphère désigne l'intérieure de la racine y compris cortex racinaire, épiderme et poils racinaires (Balandreau et Knowles, 1978).

Il évoque le passage graduel du sol à l'intérieur de la racine : c'est l'introduction des champignons et bactéries dans les cellules du parenchyme cortical de la plante, utilisant ses exsudats sans provoquer de lyse cellulaire.

De l'exorhizosphère : c'est le sol adhérent à la partie racinaire de la plante.

3-Diversité microbienne du sol :

Le sol supporte une large proportion de la biodiversité terrestre. Il héberge en effet une grande diversité d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) dont la plupart sont responsables de processus de biotransformation et de transfert des éléments ou des composés. Cette diversité biologique est associée à une importante diversité fonctionnelle et à une grande complexité des interactions écologiques. Ainsi de nombreux processus se déroulant dans le sol sont assurés par des organismes très variés (bactéries, champignons, protozoaires, racines, faune).

Les organismes du sol affectent aussi la productivité végétale, que ce soit de manière directe ou indirecte (modifications des cycles du carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites et pathogènes). La distribution dans le temps et dans l'espace des processus biologiques n'est ni aléatoire, ni homogène. Les activités des organismes du sol sont concentrées dans des sites généralement associés à la disponibilité en substrats carbonés. C'est ainsi que les habitats microbiens sont associés aux fractions organiques, aux agrégats, à la litière en décomposition, au sol influencé par les vers de terre et au contact étroit des racines (rhizosphère) (Lynch, 1990).

3-1/Le rôle des micros organismes :

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol. On compte les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues (Paul et Clark, 1996).

Considérant que 80-90% des processus dans le sol sont des réactions induites par les microbes (Nannipieri *et al*, 2003), les micro-organismes peuvent être considéré comme des acteurs clés dans les cycles des éléments nutritifs (Gobat *et al.*, 2004). D'après Paul et Clark(2007) ils sont impliqués dans différents processus clés dans les écosystèmes, tels que la décomposition de la matière organique, la formation de l'humus, l'agrégation des sols, la conservation et le recyclage des éléments nutritifs, ainsi qu'aux divers rapports symbiotique et parasitaire avec les plantes.

3-2/ Les bactéries du sol :

Une communauté bactérienne correspond à l'ensemble des populations bactériennes dans un habitat donné. Chaque membre de la communauté prend part à un système d'interaction complexe existant dans la rhizosphère entre le sol, les plantes et le biote du sol (Jossi, 2008).

Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne 6.10^8 cellules par gramme de sol et un poids de 10000 kg/ha équivalant à 5% du poids sec des composés organiques du sol.

On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). Les échanges entre la plante et le sol sont influencés par les rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont élevées. Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère (Glick, 1995).

En effet, les bactéries et les champignons sont très polyvalents et peuvent effectuer presque toutes les réactions biologiques connus (Jossi, .2008).



Figure 1 Bactéries mise à disposition du phosphore

3-3/ Les échanges induits par les racines :

Plusieurs études ont montré que les racines émettent différents composés carbonés et différents signaux chimiques dans leur rhizosphère qui attirent sélectivement des populations microbiennes capables de métaboliser ces molécules et qui se multiplient préférentiellement dans la rhizosphère (Droge *et al.* 2012).

L'exsudation racinaire, la partie principale de la rhizodéposition, implique la libération d'une grande variété de composés organiques, habituellement séparés en masse moléculaire faible composés par exemple par des acides aminés, des acides organiques, des sucres, des composés phénoliques et des poids moléculaire élevé composés par exemple par des mucilages et enzymes extracellulaires) (Marschner, 1995). Il se compose principalement par composés contenant du carbone (Uren, 2000).

Les exsudats racinaires relâchés dans le sol par les plantes attirent les bactéries (Lynch, 1990) en créant un environnement de diversité très sélectif (Marilley et Aragno, 1999; Lucas.Gracia *et al.* 2004 ; Barriuso *et al.* 2005). Ainsi un gramme de sol sec peut contenir de 10^7 jusqu'à 10^{10} de bactéries correspondant à des milliers de différentes espèces (Gobat *et al.*, 2004).

Ces communautés microbiennes associées aux racines formant le « rhizomicrobiome » (Chaparro *et al.*, 2013) ont une composition différente de celle du sol non colonisé par les racines. Des études ont également montré que la composition des exsudats racinaires peut changer le long du système racinaire (Berg et Smalla, 2009), ce qui expliquerait pourquoi le rhizo-microbiome est modifié par le stade de développement de la plante.

4-/ La rhizodéposition :

La rhizodéposition consiste en une substance libérée dans le milieu extérieur de la plante par les racines après l'assimilation des composés photo synthétisés dans les cellules de la plante (Maougal, 2014) Elle constitue un mélange complexe de sucres, d'acides organiques, d'acides aminés, vitamines, purines, nucléosides, ions inorganiques, enzymes et cellules de

bordure de racine qui ont des effets directs ou indirects sur l'acquisition des nutriments minéraux requis pour la croissance végétale et microbienne (Dakora et Phillips, 2002, Jones *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2006).

II-/ Le phosphore dans le sol

1-/Le phosphore :

Le phosphore (P) est le cinquième élément composant la matière vivante. Quelle que soit sa forme, l'atome de P est toujours associé à des atomes d'oxygène pour former le groupement phosphate PO_4^{3-} .

La formation d'une liaison anhydride d'acide entre deux groupements phosphate (ex. ATP) riche en énergie (ΔG° de $-7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) lui confère un rôle central dans le stockage de l'énergie cellulaire.

Le phosphore crée des liaisons extrêmement forte avec d'autres atomes, c'est dans ces liaisons que tous les êtres vivants stockent leur énergie sous forme d'ATP (Adénosine Triphosphate), Il est au centre du métabolisme énergétique de tous les êtres vivants : végétaux, animaux, bactéries, champignons Sans le phosphore, pas de photosynthèse, la plante ne peut plus utiliser l'énergie solaire. Elle ne peut plus respirer ni dupliquer son patrimoine génétique « acides nucléiques (ADN, ARN) »

Le groupement phosphate entre aussi dans la composition de nombreuses enzymes, des phosphoprotéines et des phospholipides, ce qui lui confère un rôle structurel fondamental. Il est indispensable à la croissance cellulaire.

Ce P disponible est soit dans la solution du sol avec des concentrations très faibles en ions ortho phosphates libres (de $0,1$ à $10 \mu\text{M}$) (Hinsinger, 2001) soit sous des formes de P qui vont pouvoir alimenter rapidement le pool de P_i de la solution du sol.

Malgré une importance indéniable dans le cycle du vivant, l'approvisionnement en P à partir du milieu reste toutefois une contrainte majeure pour de nombreux organismes vivants du sol, en particulier pour les plantes.

Ceci est dû au fait que seuls les ions ortho phosphates (H_2PO_4^- et HPO_4^{2-}) notés P_i peuvent être absorbés par les êtres vivants. Ainsi, quelle que soit la richesse en P total d'un sol, seule une infime fraction de ce P est disponible pour les organismes vivants lors de leur cycle de développement.

Tout consiste donc à solubiliser le phosphore pour le rendre assimilable par la plante. Des solutions existent pour optimiser un apport de phosphore de plus en plus cher : Certains micro-organismes (bactéries, mycorhizes), véritables liens entre le sol et la plante, solubilisent le phosphore et le rendent bio disponible. (Hellsten et Huss-Danell K, 2001).

2-/La biodisponibilité du P dans le sol :

Le phosphore (P) est un élément nutritif majeur très peu mobile dans les sols, en raison de la forte réactivité des ions ortho phosphates. La biodisponibilité de P, définie comme le flux de P susceptible d'être absorbé par une plante, est gouvernée par l'absorption racinaire et par la disponibilité chimique de P dans le sol, qui dépend de sa spéciation (Hinsinger, 2007).

En fait, elle repose aussi sur d'autres processus physico-chimiques et biochimiques qui ont lieu dans la rhizosphère, et qui résultent en une modification de la disponibilité de P dans ce volume singulier du sol. L'absorption de P par la racine résulte dans la plupart des sols en une diminution de la concentration en P en solution (appauvrissement) dans la rhizosphère et, par suite, en un gradient de diffusion des ions orthophosphates, ainsi en un déplacement des équilibres physico-chimiques d'adsorption-désorption ou précipitation-dissolution. Cependant, la rhizosphère n'est pas systématiquement appauvrie en P, ce qui suggère l'intervention d'autres processus tels que l'excrétion par les racines ou micro-organismes associés de composés modifiant la spéciation de P dans le sol (Plassard.C, 2007).

Les plantes, qui interagissent avec les microorganismes du sol, peuvent largement modifier l'environnement au voisinage des racines, c'est-à dire la rhizosphère qui est une zone «bio-influencée» par la plante, à la base du concept de « biodisponibilité ».

La biodisponibilité du P dans le sol peut ainsi varier considérablement d'une espèce végétale à l'autre selon ses capacités à modifier elle-même la disponibilité de Pi ou *via* les organismes naturellement présents dans sa rhizosphère. (Harmsen, 2007).

3-/Le phosphore et son importance pour la plante :

Le phosphore est un élément majeur pour la plante. Il exerce plusieurs rôles vis-à-vis des végétaux. Il favorise la croissance : son action est conjuguée à celle de l'azote. Les besoins en azote et en phosphore évoluent parallèlement, plus le développement des racines et l'accroissement de la masse des racelles, favorisant l'alimentation et la croissance de la

plante, ainsi qu'à la précocité favorisant un développement racinaire rapide, la rigidité des tissus, ainsi ils sont plus résistants à la verse et aux maladies dues à des champignons. (Brun Fet Richard-Molard C *et al.* 2010)

Il a un impacte sur la fécondation, la fructification, et la qualité des produits Son cycle est assez complexe et les entrées au sol sont dues principalement aux apports minéraux et organiques, la déposition atmosphérique est négligeable (Nguyen C., 2003).

L'agriculture a besoin du phosphore pour nourrir les plantes. Cependant, il est de plus en plus onéreux et souvent bloqués dans les sols. Des micro-organismes apportent des solutions pour débloquent le phosphore déjà présent dans les sols ou apporter par la fertilisation.

4-/Le cycle du phosphore :

Le cycle de phosphore est centré autour de la seule forme de Phosphore utilisable par les organismes vivants qui est le Phosphore en solution. L'approvisionnement de ce pool de phosphore en solution est sous l'influence de deux sous-cycles ; l'un est biologique (pools organiques) et l'autre géochimique (pools minéral), provient majoritairement de l'altération des roches mères (Larsen, 1967). L'adsorption des différentes formes de P sur la phase solide du sol limite fortement leur diffusion dans la solution du sol. Les cations métalliques Al, Ca ou Fe forment avec le P des minéraux phosphatés insolubles et peu mobiles. Cependant, le réapprovisionnement de la solution du sol en P est assuré par un ensemble de processus chimiques et physiques à partir de la phase minérale par désorption. Les organismes vivants participent activement au processus de recyclage du P du sol. Ils sont capables de libérer P par solubilisation du P minéral (Pm) et par minéralisation du P organique (Po) malgré une forte immobilisation de cet élément (Munns et Mosse, 1980).

Le phosphore est absorbé par les végétaux autotrophes qui le transforment en phosphates organiques. Ces derniers passent dans les réseaux trophiques des consommateurs puis des décomposeurs. Les phosphates inorganiques restitués aux sols par les déchets végétaux, les cadavres et les excréta des animaux sont attaqués par les organismes saprophytes et finalement les micro-organismes décomposeurs pour être transformé en ortho phosphates minéraux.

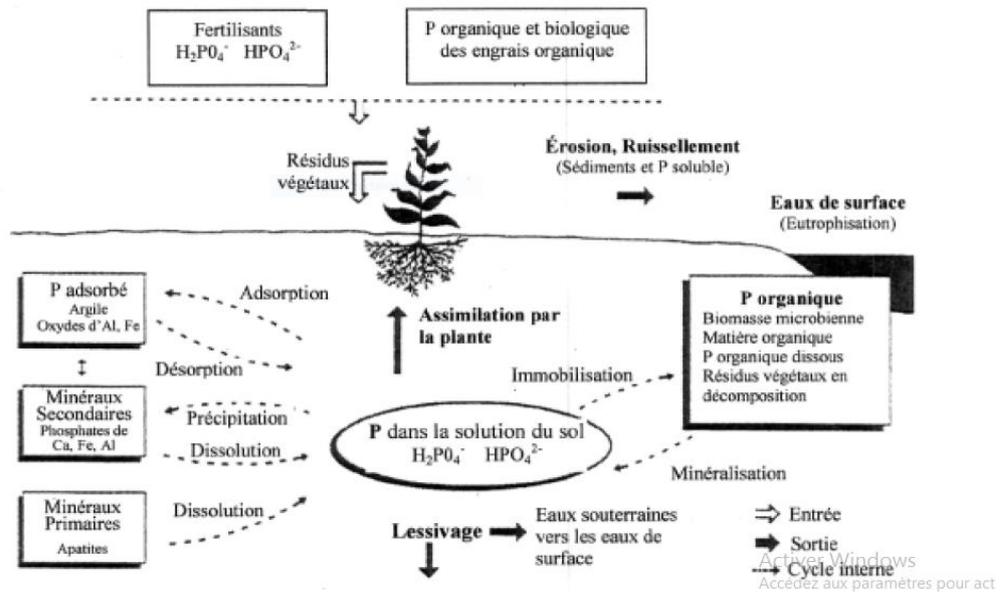


Figure 2 Le cycle du phosphore dans le sol (adapté de Pirzynski *et al.* 2002)

Le P n'a pas d'effets toxiques directs sur les humains ou les animaux (Pierzynski *et al.* 2000), mais il peut causer l'eutrophisation des eaux de surface. L'eutrophisation se définit par une croissance accélérée des algues ou des plantes aquatiques. Les effets négatifs associés à ce phénomène sont importants d'un

Point de vue écologique, économique et sanitaire : dégradation de l'habitat (réduction de la teneur en oxygène dissous), réduction de la biodiversité, diminution de la valeur économique et des usages récréatifs (Pierzynski *et al.* 2000).

5-/Différentes formes du phosphore dans le sol :

Comme l'azote, le phosphore est un constituant essentiel de la matière organique et est un nutriment indispensable pour les organismes vivants. Cependant il doit être considéré comme un polluant lorsqu'il est présent à de fortes concentrations dans l'environnement.

Le Phosphate intervient dans de très nombreuses voies métaboliques lors des réactions de phosphorylations (endergoniques) ou déphosphorylations (exergoniques) : par exemple lors de la phosphorylation du Glucose en Glucose-6-P, première étape de la glycolyse. On trouve :

5-1/-/Phosphore inorganique (minéral) :

Les ions ortho phosphates constituent la seule forme de P directement assimilable par les plantes. Seule une faible proportion de P est présente sous forme de Pi en solution et sa concentration est maintenue pour la majorité des sols entre 0,1 et 10 μM (Hinsinger, 2001).

Les mécanismes physico-chimiques responsables de la mobilisation de P sont l'altération des minéraux primaires, la destruction des agrégats qui libère des minéraux P secondaires suivie de la désorption des ions phosphate contenus dans ces minéraux et enfin les échanges ioniques qui permettent la mise en solution de Pi à partir du pool labile de P inorganique. Cependant, le mécanisme majeur qui détermine la mise en solution de Pi à partir des minéraux phosphatés ou des surfaces d'échanges du sol est la variation du pH de la solution du sol (Hinsinger, 2001).

Le phosphore minéral se trouve sous différentes formes dans le sol. Il est adsorbé sur les colloïdes humiques, sur les sables calcaires fins, sur les argiles par l'intermédiaire de ponts calcium ou par l'intermédiaire de ponts Al^{+++} et Fe^{+++} , enfin le phosphore est adsorbé sur les hydroxydes de fer et d'alumine du sol.

Il est soit naturellement peu mobile, soit rendu peu mobile en particulier du fait de conditions physicochimiques particulières dans le sol (pH, milieu calcaire, etc.).

5-2/-/Phosphore Organique :

Le P organique est défini comme l'ensemble des composés organiques produits par des organismes vivants, comprenant un ou plusieurs groupes de Pi (au moins un Pi lié à un carbone par une liaison covalente, généralement une liaison ester).

Il peut représenter jusqu'à 80% du Phosphore total dans le sol (Condrón et Tiessen, 2005). Il est essentiellement présent sous forme de phosphates d'inositol (phytate) et secondairement sous forme de sucres, acides nucléiques, et phospholipides (Mengel et Kirby, 1987). Les phosphates d'inositol constituent des réserves phosphorées (Frossard *et al*, 1995) provenant en majorité des plantes et stockées dans les graines.

La présence d'un ou plusieurs groupements phosphate dans les composés de Po entraîne une faible mobilité dans la solution du sol. En effet, ils peuvent être fortement adsorbés par les minéraux argileux et peuvent former avec la matière organique des composés difficilement dégradables ou précipiter avec les oxydes de Fe ou d'Al dans les sols acides ou de Ca et Mg dans les sols alcalins (Turner *et al*, 2005).

Le taux d'adsorption du Po dans les sols est fonction de sa structure, notamment du nombre de résidus P, de sa charge mais aussi de sa taille moléculaire. Ainsi, les phosphates d'inositol s'adsorbent plus facilement à la surface des argiles que les acides nucléiques, les phospholipides ou les sucres simples (Leytem *et al*, 2002).

6-/Le phytate :

Le phytate, le composé de phosphore organique le plus abondant dans le sol. La minéralisation microbienne du phytate par les phytases est un processus clé pour le recyclage du phosphore dans la biosphère.

C'est aussi une substance de réserve de phosphore que l'on trouve dans les graines des végétaux et dans bon nombre de racines et tubercules (Dipak et Mukherjee, 1986). L'acide phytique a la capacité de lier le calcium, le zinc, le fer et d'autres minéraux et réduit de ce fait leur assimilabilité dans l'organisme (Davis et Olpin, 1979; O'Dell et Savage, 1960). En outre, la formation complexe de l'acide phytique avec des protéines peut inhiber la digestion enzymatique de la protéine (Singh et Krikorian, 1982). Les carences en fer et en zinc se produisent chez les populations qui vivent de pain complet sans levain pour les quelles il représente la principale source de ces minéraux. Les carences ont été attribuées à la présence de phytates.

7-/Les phytases :

L'hydrolyse des phosphomonoesters dans les systèmes biologiques est un processus important relié directement tant au métabolisme des molécules énergétiques, à sa régulation ainsi qu'à la grande variété des mécanismes de transduction des signaux chez la cellule. Ainsi, l'hydrolyse biologique d'une grande variété de phosphomonoesters est catalysée par un groupe d'enzymes : les phosphatases.

Ces enzymes peuvent être classifiées en phosphatases basiques, pourpre acide phosphatases, acide phosphatases tant de haut poids moléculaire comme de bas poids moléculaires ainsi que phosphatases protéiques. Cette classification est basée en fonction du pH optimal pour leur activité catalytique, leur spécificité pour un substrat donné, leurs besoins de métaux ainsi que leur mécanisme de réaction. (Kerovuo *et al*, 2000).

Le phytate, est la plus abondante source de phosphate chez les plantes, constituant plus de 80 % du total du phosphore dans les céréales et les légumes. Puisque l'hydrolyse du

phytate est de grande importance dans les systèmes biologiques, la nature s'est occupée de développer un type d'enzyme spécifique, les phytases, capable de déphosphoryler ce type de substrat.

Les phytases sont très répandues dans la nature, tant chez les micro-organismes, chez les plantes, ainsi que dans certains tissus des animaux.

Le rôle des phytases dans chacun de ces organismes est différent. Chez les plantes, les phytases sont responsables de la libération de phosphore inorganique (Pi) pendant la germination des semences (les réserves de phosphore dans les semences sont sous forme de phytate), ainsi que la production du myo-inositol libre (non phosphaté) qui est un important facteur de croissance. D'autre part, l'hydrolyse du phytate libère aussi de cations qui pourraient être liés au phytate par chélation dû à sa grande charge négative. (Hatzack et F Hübel, 2001).

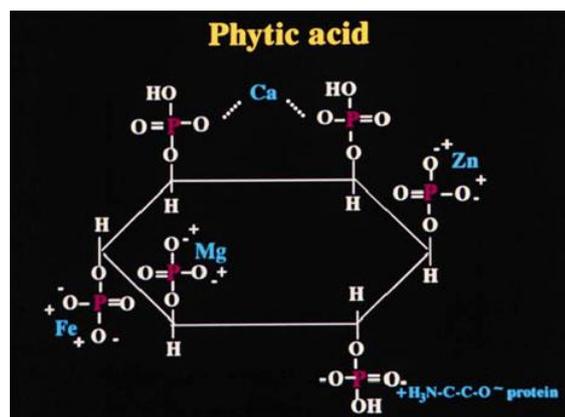


Figure 3 structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités d'interagir tant avec des cations métalliques comme avec des résidus des protéines (Kerovuo *et al.*, 2000).

Classification des phytases :

Les phytases font partie du groupe des acides phosphatases de haut poids moléculaire. Des études postérieures ont montré qu'il était possible de réaliser une classification des phytases en fonction de la similitude de sa séquence, préférentiellement au niveau du site actif. (Yao *et al.*, 2011)

De cette façon, un bon groupe d'enzymes spécifiques pour le phytate présentait dans sa séquence, un motif très conservé au niveau du site actif : RHGxRxP. De plus, la catalyse

de la réaction était toujours réalisée en deux étapes ; une première caractérisée par l'attaque nucléophile sur le phosphore par un résidu Histidine présent dans le motif conservé ; suivit par l'hydrolyse de cet intermédiaire comme deuxième étape.

D'autre part, un deuxième groupe de phytases a été identifié, dans la plupart de cas, ne présentant pas d'homologie avec la séquence des histidines phytases, même pas au niveau du motif conservé. De plus, une caractéristique particulière de ce type d'enzymes correspond à leur dépendance aux ions métalliques pendant l'activité catalytique (B. Mitchell et K. Vogel, 1997).

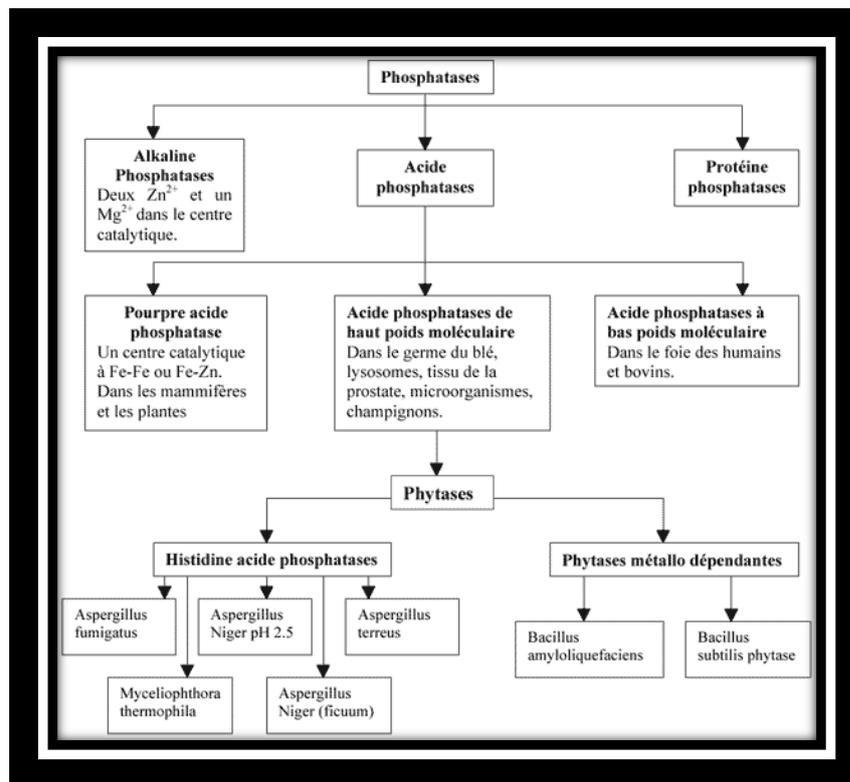


Figure 4 Classification des phosphatases présentant les deux principaux groupes de phytases: les histidines phytases et les phytases métallo-dépendantes (B. Mitchell et K. Vogel, 1997)

III-/ Bactéries minéralisatrices de phytate dans la rhizosphère :

1-/Minéralisation du phosphate par les microorganismes du sol :

L'utilisation du phosphore organique par les plantes et les microorganismes nécessite la minéralisation (hydrolyse) du substrat par les enzymes phosphatases. L'augmentation de l'activité des phosphatases se produit en réponse à une carence en P (Jossi, 2008). Les microorganismes du sol produisent une gamme de phosphatases et ont la capacité d'utiliser P

sous ses diverses formes organiques qui existent dans le sol, en incluant le phytate (Lim *et al.*, 2007; Shears et Turner, 2007).

Les micro-organismes capables de dégrader les phytates ont été isolés à partir d'une gamme de milieux terrestres et aquatiques. Ils comprennent les levures, les champignons filamenteux et les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Hill et Richardson 2007).

L'augmentation de la minéralisation de la matière organique du sol associée à l'activité microbienne ultérieure se produit également dans la rhizosphère à la suite d'un effet activateur microbien en raison de l'utilisation de l'exsudat C à la minéralisation subséquente des nutriments de matière organique du sol (Cheng, 2009).

Des études menées par Richardson *et al.*, (2001) ont montré que lorsqu'ils sont cultivés dans des milieux définis, l'utilisation des phytates par l'herbe et les espèces fourragères légumineuses a été améliorée par inoculation avec des microorganismes du sol. Plus précisément cela a été démontré en utilisant un isolat bactérien avec une forte activité de phytase.

Une fois que le P est minéralisé, il peut être absorbé par les plantes, immobilisé par la biomasse bactérienne, précipité dans les complexes inorganiques ou adsorbés sur les surfaces minérales (Paul et Clark, 2007).

2-/Gène responsable de la solubilisation du Phosphore chez les micro-organismes :

Le gène responsable de la minéralisation du P est le **β -propeller phytase** présent chez les bactéries phytasique, ses dernières sont omniprésentes dans le sol de *P.vulgaris*, et que leur densité est plus importante dans le sol rhizosphérique (Maougal, 2014).

3-/Les bactéries solubilisatrices du Phosphore inorganique :

Appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderie*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, etc., ces bactéries sont capables de libérer le Phosphore inorganique complexé aux minéraux dans le sol (Ca, Fe, Mg, Al, etc.)

Cette création se fait à la production d'acides organique par les bactéries, acide malique, acide oxalique et acide lactique. Autour de la bactérie, et donc à proximité des racines, le pH

va légèrement diminuer. Or à pH plus acide, les formes de phosphate inorganique complexées se solubilisent. Les ions phosphates deviennent alors disponibles pour les racines des plantes.

4-/Les bactéries solubilisatrices du Phosphore organique :

D'autres types de bactéries peuvent agir sur la mise à disposition du Phosphore organique majoritairement immobilisé sous forme de phytates. Ces molécules contiennent des ions phosphates mais elles sont liées à d'autres atomes complexes, et sont donc piégés. Des bactéries comme *Rhizobium*, *Enterbacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *klebsiella*, *Pseudomonas*, ou encore *Bacillus*, sont capables de produire des enzymes appelées Phytase. Ces enzymes vont permettre de libérer les ions phosphates à partir des phytates, et seront ainsi disponibles pour les racines des plantes.

Au vue de leurs propriétés, les bactéries qui solubilisent et minéralisent le phosphore ont un intérêt majeur dans le cadre d'une fertilisation agricole. En effet, une fois introduites dans le sol, elles peuvent tirer parti des réserves en phosphore présentes dans le milieu, en grande parties indisponibles, pour les rendre disponible pour les plantes et plus précisément Pour les légumineuses et pour cela, elles solubilisent et minéralisent le phosphore inorganique et organique, et permettent ainsi de libérer des phosphates solubles aux racines de la légumineuse *Phaseolus vulgaris*.

VI-/La plante modèle : Le haricot (*Phaseolus vulgaris*) :

1-/Description morphologique de la plante :

Le genre *Phaseolus* appartient à la tribu des Phaseolées et a la famille des fabaceae ou Papilionaceae qui fait partie de la grande famille des leguminosae. Le genre *Phaseolus* regroupe les espèces de haricot au sens strict, soit environ 55 espèces (Martínez-Romero, 2003), même si la distinction entre les espèces n'est pas toujours facile et que il est probable que certaines ne soient pas des espèces à part entière (Debouck, 1999) cinq d'entre elles ont été domestiquées, et sont les plus importantes ; ce sont *P. acutifolus*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. polyanthus* et *P. vulgaris*, (Debouck, 1999 ; Martínez-Romero, 2003). Cette dernière, la plus connue, est communément appelée haricot commun.

Les espèces du genre *Phaseolus* présentent l'avantage d'avoir un cycle de développement relativement court (3 mois). Plantes herbacées, lianescentes, à croissance indéterminée, Leur appareil végétatif comprend une tige angulaire et rameuse, leurs feuilles sont alternes en trois folioles ovales, acuminées aigues. Les fleurs sont de deux centimètres

de longueur, blanchâtres, jaunâtre ou lilas et les fruits sont des gousses allongées déhiscentes, contenant 5 à 12 graines de taille et de couleur très variable selon les espèces et variétés.



2-/Classification de *Phaseolus vulgaris* :

- Règne :	Végétal
- Embranchement :	Spermaphytes
- Sous Embranchement :	Angiospermes
- Classe :	Dicotyledones
- Ordre :	Fabales
- Famille :	Fabaceae
- Genre :	<i>Phaseolus</i>
- Espèce :	<i>Phaseolus vulgaris</i>

Les espèces du genre *Phaseolus* présentent l'avantage d'avoir un cycle de développement relativement court (3 mois). Plantes herbacées, lianescentes, à croissance indéterminée ; Leur appareil végétatif comprend une tige angulaire et rameuse, leurs feuilles sont alternes en trois folioles ovales, acuminées aigues. Les fleurs sont de deux centimètres de longueur, blanchâtres, jaunâtre ou lilas et les fruits sont des gousses allongées déhiscentes, contenant 5 à 12 graines de taille et de couleur très variable selon les espèces et variétés.

3-/Nutrition phosphaté chez le haricot :

Malgré son importance, la production du haricot commun est sévèrement limitée par les carences en P dans les régions tropicales et subtropicales, où les sols ont une grande teneur en oxydes de fer ou d'aluminium qui diminuent fortement la disponibilité du P pour les

plantes (Atemkeng *et al*, 2011 ; Liao *et al*, 2004). En Afrique, au moins 50% de la superficie de production de haricot est gravement déficiente en phosphore (Liao *et al*, 2001).

Comme toutes les légumineuses, le haricot a la capacité de fixer l'azote atmosphérique à travers les relations symbiotique qu'il établit avec les rhizobactéries. Le phosphore est un élément nutritif essentiel pour les symbioses rhizobium pour convertir N_2 en NH_4 utilisable pour la nutrition azotée des légumineuses et du cycle N dans les écosystèmes. Ce processus de fixation N_2 se produit dans les nodules avec un coût énergétique élevé (Lazali *et al*, 2013).

En effet, la fixation biologique de l'azote est catalysée par un complexe enzymatique qui exige 16 ATP pour la fourniture de l'énergie d'activation pour la fixation d'une seule molécule. C'est ce qui fait du haricot l'un des plus grand consommateurs de P (Broughton *et al*, 2003 ; Djadjaglo et Richter, 2008).

Chapitre II
***LES BASES DE
DONNEES***

Chapitre II Les bases de données

1-/Généralité sur les bases de données :

La bioinformatique permet grâce aux BD biologiques d'accéder très rapidement à toute l'information disponible sur un champ d'étude précis. Souvent les termes de bases ou banques sont utilisés sans distinction particulière. Toutefois il existe une différence non seulement pour l'utilisateur mais aussi pour l'implantation informatique de ces dernières.

Qu'est-ce qu'une base de données ?

Une BD est un ensemble structuré de données enregistrées sur des supports accessibles par l'ordinateur pour satisfaire simultanément plusieurs utilisateurs de manière sélective en un temps opportun.

La performance Les BD peuvent être plus ou moins longues ou complexes suivant la capacité de l'ordinateur et du programme utilisé (KHICHANE C., 2004). Elles peuvent être utilisables sur une machine par un utilisateur (BD locales) ou bien les informations sont stockées sur des machines distantes et accessibles par un réseau (BD réparties). La gestion de BD se fait au moyen d'un SGBD qui permet d'interagir avec celle-ci. Le SGBD permet de stocker les données dans des tables, puis de définir les relations entre celles-ci. Il permet également de manipuler les données présentes dans la BD (insertion, suppression, modification) : ces opérations sont dites les mises à jour.

2-/Une banque de données biologique :

Une banque de données biologique, est une BD généralisée ; mais qui contient des informations sur nombreuses espèces, nombreuses molécules, en même temps. Son utilisation concerne plusieurs domaines à la fois. Elle est donc généraliste (Figure 5) et correspond à un ensemble de données exhaustif avec des informations hétérogènes. (virus, bactéries, champignons, végétaux, animaux).

Une BD biologique peut contenir des informations sur des protéines, alors qu'une autre peut contenir des informations sur des gènes, elle concerne des données spécifiques à une discipline, une maladie, une espèce vivante, une molécule, ... elle est donc spécifique. On peut aussi dire qu'elle est plus spécialisée. La base de structure PDB en est un parfait exemple.

3-/Les différents modèles de bases de données :

Les bases de données sont apparues à la fin des années 60, à une époque où la nécessité d'un système de gestion de l'information souple se faisait ressentir. Il existe cinq types de BD qui se distinguent de par la façon dont les données sont structurées et sont différenciés selon la représentation des données qu'elle contient (figure 5).

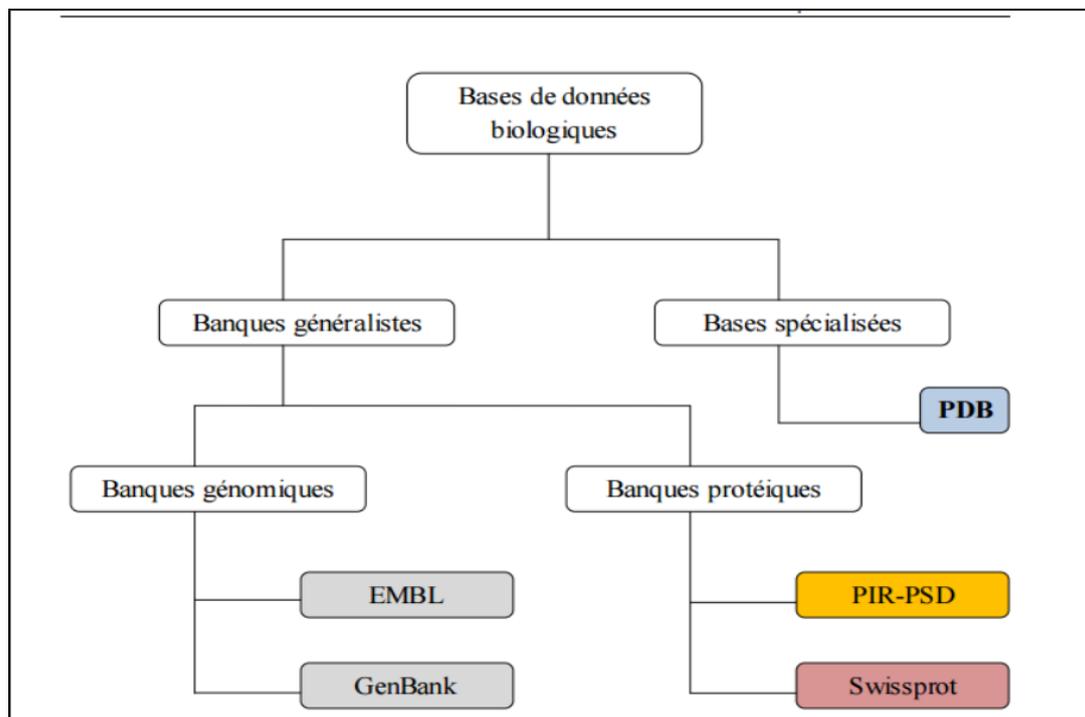


Figure 5 Classification des BD biologiques (DJEKOUN A, HAMIDCHI A H)

Afin de pouvoir contrôler les données ainsi que les utilisateurs, le besoin d'un système de gestion s'est vite fait ressentir. La gestion de la base de données se fait grâce à un système appelé **SGBD** (système de gestion de bases de données) ou en anglais DBMS (Data base management system). Le SGBD est un ensemble de services (applications logicielles) permettant de gérer les bases de données, c'est-à-dire :

- permettre l'accès aux données de façon simple.
- autoriser un accès aux informations à de multiples utilisateurs manipuler les données présentes dans la base de données (insertion, suppression, modification).

Le SGBD peut se décomposer en trois sous-systèmes (voir figure 6) :

- le système de gestion de fichiers : permet le stockage des informations sur un support physique
- le SGBD interne : gère l'ordonnancement des informations
- le SGBD externe : représente l'interface avec l'utilisateur.

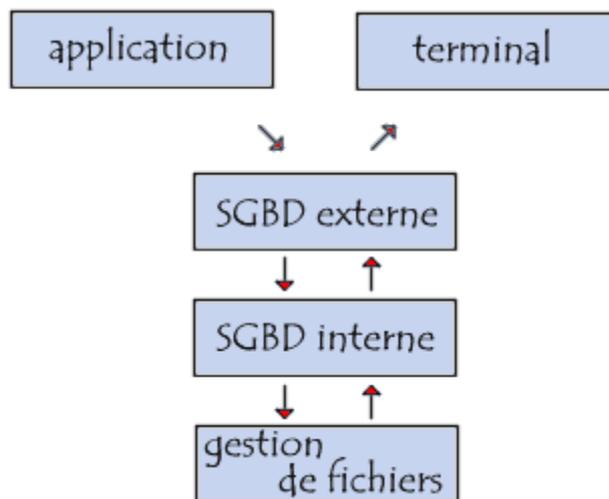


Figure 6 Décomposition d'un SGBD

4-/Les principaux SGBD :

Les principaux systèmes de gestion de bases de données sont :

-Borland Paradox,	-Interbase
-Filemaker	-Microsoft SQL server
- IBM DB2	-Microsoft Access
-Ingres	-Microsoft FoxPro
- Oracle	-Sybase
-MySQL	-PostgreSQL
- mSQL.	-SQL Server 11

Chapitre III
MATERIEL ET
METHODE

Chapitre III : Matériel et méthode

I-/Méthode :

Notre objectif est d'évaluer et de caractériser la taille la communauté bactérienne fonctionnelle du sol qui permet la minéralisation du phytate, forme assimilée par les plantes, sous couvert d'haricot.

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes du laboratoire de recherche de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, à Chaabet El Rsass, Université des frères Mentouri Constantine.

1-/ Matériel végétal et conditions de culture :

Le travail a consisté en un essai au champ dans la parcelle du CNCC (centre National de Certification et Contrôle des Semences) au Khroub dans la wilaya de Constantine (latitude, 36°11'N; longitude, 5°25'E; altitude, 1081 m) (Figure 7).

La culture a été réalisée en système irriguée avec une gestion du semis et de culture sans application d'engrais durant la saison de culture de l'année 2016. Six lignée recombinantes (RIL) de haricot utilisées, i.e. RIL 147, 115, 104, 83, 34 et 29, ces RIL, ont été choisis parmi un précédent screening parmi 100 descendants issues du croisement de deux lignées parentales, BAT477 et DOR364 (Drevon *et al*, 2011) respectivement efficace en utilisation du P pour la FSN et tolérante à la mosaïque dorée.



Figure 7 La culture de Phaseolus vulgaris au champ dans la parcelle du CNCC au khroub dans la wilaya de Constantine

2-/Prélèvement du sol :

Quatre dates d'échantillonnage, correspondant à des étapes de développement représentatives de la plante, ont été choisies simultanément pour les RILs: stade végétatif (2 feuilles), stade montaison, et le dernier stade pleine floraison (soixante- cinq jours après le semis)

Le sol rhizosphérique (SR), défini comme le sol adhérent aux racines, a été prélevé de la surface des racines nodulées de chaque RIL. Au laboratoire, chaque plante a été doucement secouée. Les échantillons sont ensuite aliquotés et conservés à -20 °C.



Figure 8 Photo du site où se sont effectués les prélèvements des sols (CNCC)

3-/Isolement et Comptage bactérien:

La caractérisation de la densité et de la structure de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant le phosphore a été appréhendée à partir d'une approche basée sur la culture des microorganismes. Ainsi nous avons mis en suspension le sol rhizosphérique ($1g.ml^{-1}$) dans du tampon phosphate (annexe) et cette suspension a été appelée la solution mère. Cette étape s'est faite sur deux milieux différents afin de distinguer les bactéries totales des bactéries solubilisatrices du P.

3-1/ Numération des bactéries totales cultivables :

Le principe général du comptage consiste à dénombrer le nombre de bactéries présentes ou UFC (pour Unités Formant une Colonie) sur un milieu solide issu d'une dilution.

Le dénombrement des bactéries a été effectué sur boîte de Pétri. Pour chaque échantillon, les six RILs en 3 répétitions, nous avons effectué des dilutions successives au 1/10ème (1ml de solution mère dans 9ml d'eau physiologique à 9%) puis 20µl ont été prélevés aux dilutions 10^{-3} et 10^{-4} et ont été étalés sur milieu LB (3 gouttes boîtes par

dilution) en utilisant la technique dite « de la goutte » ou les boîtes sont divisé en quatre parties figure(9), chaque partie est ensemencé une fois avec une dilution (Harris, Sommer, 1967).

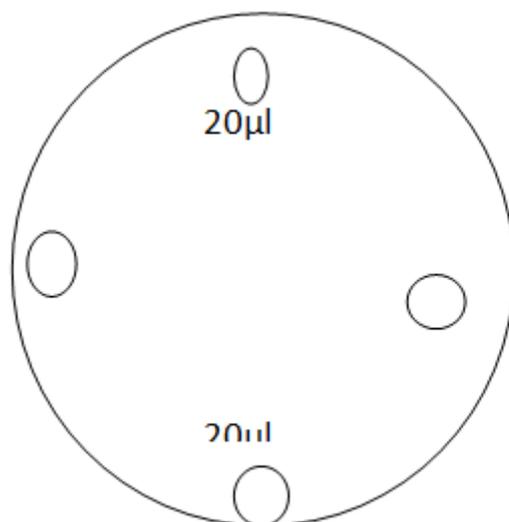


Figure 9 Schéma représentant la méthode d'ensemencement par la technique dite de la goutte

La taille de la communauté bactérienne cultivable a été estimée par comptage du nombre de CFU par gramme de sol le dénombrement bactérien a été déterminé après 24 h et 48 h d'incubation à 28 °C. Cette période d'incubation permet la stabilisation du nombre d'UFC. Tous les isolats ont été maintenus sur milieu solide (à 4 °C) et conservés dans une solution de glycérol 40% à -80° C.

4-/Criblage et numération des bactéries minéralisant le phytate :

4-1/Qualification de la dégradation du phosphore par les bactéries isolées sur le milieu NBRIP:

Pour chaque sol des différentes lignées , nous avons ensemencé les isolats sur un milieu spécifique NBRIP(National Botanical Research Institute Phosphate) (Nuatiyal, 1999) (annexe3) contenant comme seule source de phosphore le Phosphate de calcium $Ca_3(PO_4)_2$ afin de tester la capacité de ces bactéries à dégrader le phosphore sur milieu solide (Richardson, Hadobas, 1997).

Le milieu est ensemencé, et la capacité des souches à solubiliser le phosphate dans le milieu est déterminée par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie correspondante après incubation à 28°C pendant quatre jours.

4-2/Numération des bactéries minéralisatrices du P :

Le comptage de la communauté bactérienne fonctionnelle est effectué après 3 et 4 jours d'incubation à une température de 28°C.

4-3/Conservation des isolats :

Les isolats positifs sur milieu sélectif sont purifiés et stockés à -80° C en présence de 70% de glycérol.

5-/Analyse statistique :

La taille des communautés bactériennes totales ainsi que fonctionnelles ont été comparées par une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs sur le nombre des colonies bactériennes dénombré sur les deux milieux de culture des six lignées et à trois stades du développement de la plante.

6-/Extraction et purification de l'ADN du sol :

La nécessité d'une numération des bactéries non cultivables du sol dépend principalement de l'extraction directe de l'ADN à partir du sol, c'est un environnement aux multiples facettes qui est un important bassin de la diversité génétique microbiennes.

6-1/L'extraction et purification de l'ADN :

Nous avons utilisé la méthode d'extraction et de purification au CTAB (Wagner *et al.* 1987) modifiée par Faria fatima *et al* (2014) dont le Principe est la lyse, l'extraction et la précipitation en utilisant le détergent ionique cétyl triméthyl ammonium bromure (CTAB), qui forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans un environnement à faible teneur en sels. Dans ces conditions, les polysaccharides, les composés phénoliques et les autres contaminants restent dans le liquide surnageant et peuvent être lavés. Le complexe d'ADN est solubilisé en élevant la concentration en sels et précipité avec de l'éthanol ou de l'isopropanol.

Un gramme d'échantillon de sol a été broyé à l'aide d'azote liquide. Ceci a été suivi d'une addition de 5 ml de solution saline tamponnée au phosphate 120 mM (pH 7,4). Cette

dernière a été agité à 150 tr / min pendant 10 minutes à 4 ° C. Ensuite la suspension du sol est centrifugée à 7 000 tr / min pendant 10 min.

Après la centrifugation le culot a été relaver avec du tampon PBS et mis en suspension dans 10 ml d'un tampon d'extraction d'ADN contenant le **Tris-HCl 1 M (pH 8,0)**, le **Na Cl 5 M**, le **EDTA 0,5 M (pH 8,0)**, **10% CTAB**, **10% SDS** et **0,2 M Mannitol**. La suspension a été incubée pendant 1 h à 65 ° C avec une agitation occasionnelle de 150 tr/min.

A partir de cette étape nous avons choisi d'utiliser la méthode d'extraction par Mannitol-PBS-PCI (Mannitol -Phosphate Buffered Salin-Phénol/Chloroforme/Alcool Iso amylique) :

Après centrifugation de la suspension de sol pendant 1 h à 65°C et avec une agitation de 150tr/min, le surnageant ainsi obtenu a été extrait avec un volume égal de PCI (Phénol / Chloroforme / Alcool Iso amylique) par centrifugation à 12 000 tr / min pendant 10 minutes à 4 ° C.

La fraction aqueuse a été mélangée avec 1/10ème volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) et 2 volumes d'éthanol refroidi à 70% à 4 ° C. Enfin, le culot a été récupéré par centrifugation à 12 000 tr / min pendant 10 min à 65 ° C et dissous dans 25µl de TE buffer (**tris-HCl 10mM (pH 7.8)** et **EDTA 1mM (pH8)**).

6-2/Purification de l'ADN et quantification de l'ADN par spectrophotométrie :

L'ADN peut être mesurés directement dans des solutions aqueuses sous forme diluée ou non diluée en mesurant l'absorption A (également définie comme étant la densité optique, DO) en lumière ultraviolette (mais aussi dans le spectre visible).

Si l'échantillon est pur, la concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé « blanc ».

L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique.

L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les

peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A260/A230 devrait être d'environ 2,2.

II-/Création de la base de données :

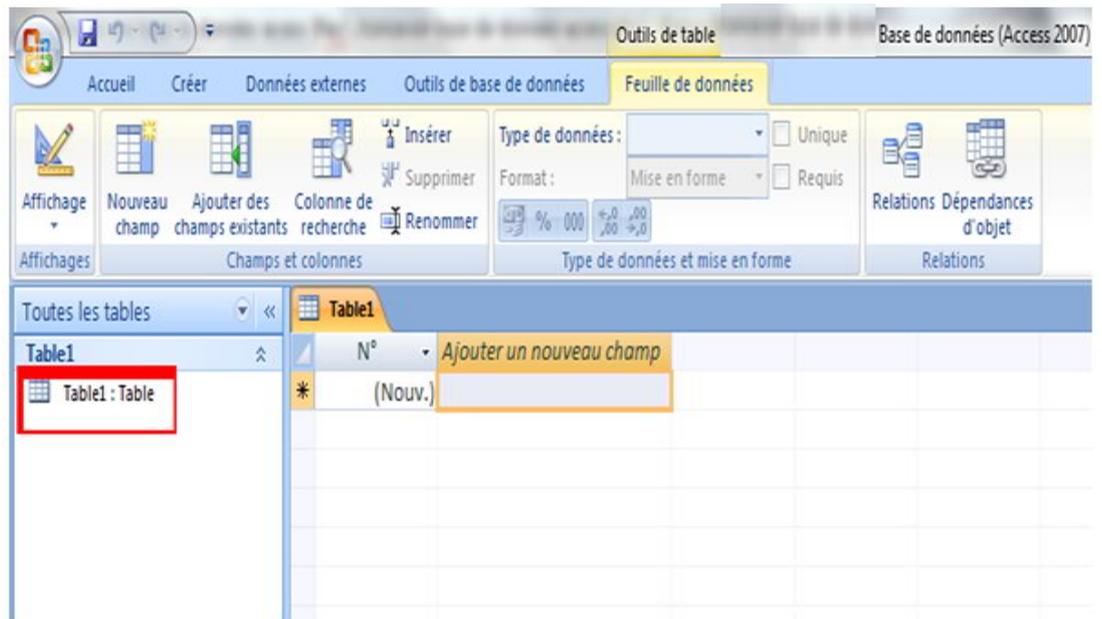
1 La création de la table Access

Voici les étapes de la création de l'objet table de Ms Access :

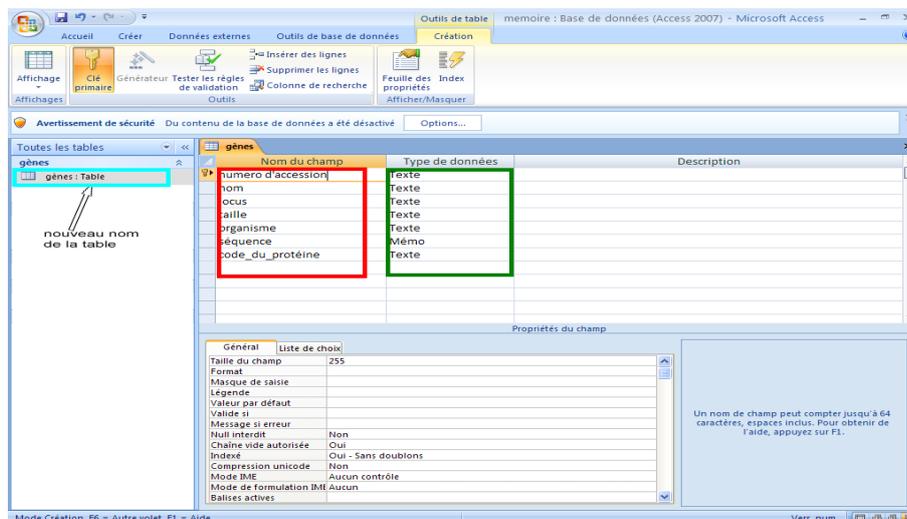
- Aller sur "démarrer" au bas gauche de votre bureau.
- Cliquer sur le menu "Tous les programmes".
- Chercher dans la liste qui s'affiche le menu "Microsoft Office".
- Cliquer sur "Microsoft Office Access 2007" pour ouvrir Access.



- cliquer sur l'onglet intitulé "base de données vide" flèche rouge en haut à gauche
- Sur la droite, une colonne avec un champ blanc dans lequel est inscrit "base de données1" apparaît (cercle vert).
- ensuite renommer la base de données, après cliquer sur le bouton «créer». Une fenêtre s'ouvre.



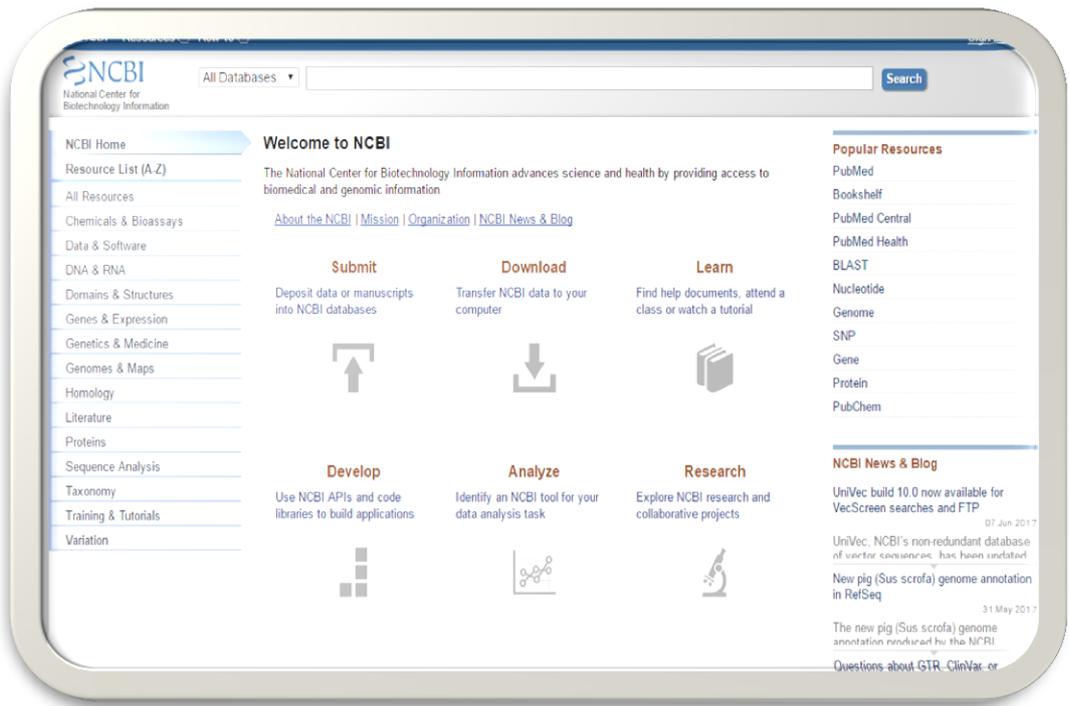
Cette fenêtre propose une table déjà créée, rectangle rouge. Créer la table de la base de données en tenant compte des différents points du cahier de charge. Pour le faire il faut afficher la table en mode création.



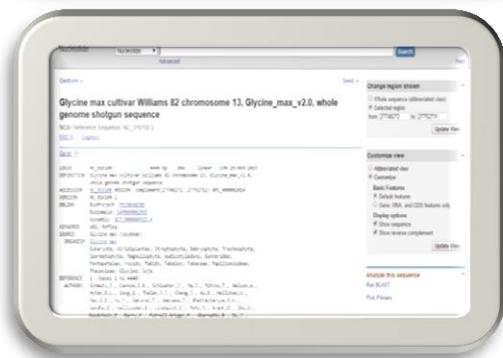
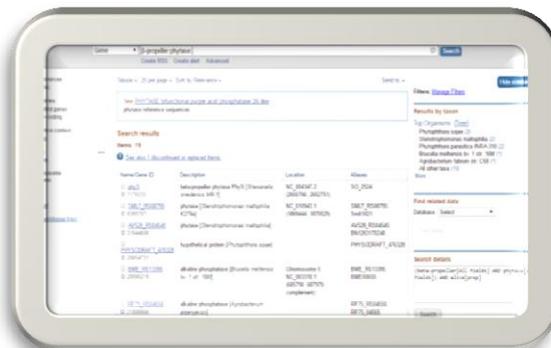
Le nom de la table a changé (voir flèche à gauche) sur l'image. Ensuite remplir les champs avec des noms, la conception de la table sur Access a été terminée, après cliquer sur l'onglet qui représente la disquette tout en haut à gauche pour enregistrer la table. Et pour l'afficher cliquer sur "affichage" sous l'onglet disquette.

2-/Acquisition des données (Démarche) :

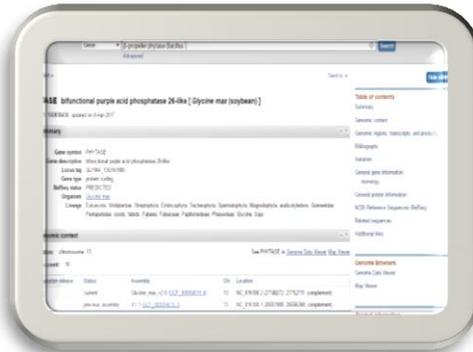
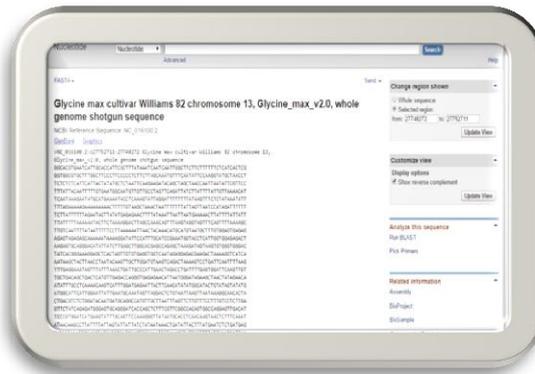
1-Sur une page web, tapez l'adresse de NCBI : (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)



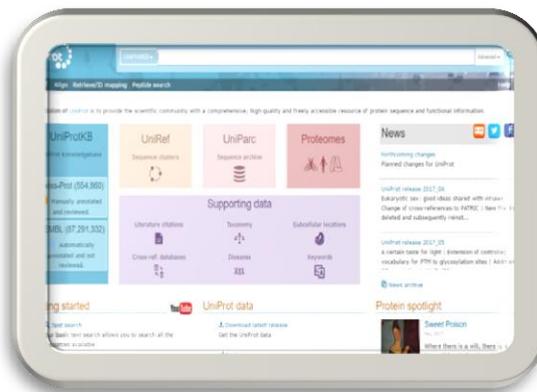
2-Dans cette page, sélectionnez **gène** dans la rubrique **Search**, et tapez le nom du gène : **β -propeller phytase** et cliquez sur **Search** : vous obtenez:



3-Cherché FASTA sur la page afin d'afficher la séquence complète du gène.



4-Maintenant pour chercher la protéine en vas sur BD protéique : UNITPRO a l'adresse suivante: <http://www.uniprot.org/> et en tape le nom de la protéine.



5-Pour chercher les domaines de notre protéine en vas sur **PRODOM** à l'adresse suivante: <http://prodrom.prabi.fr/prodrom/current/html/form.php> puis enter le code de la protéine obtenu par BD UNIPROT.

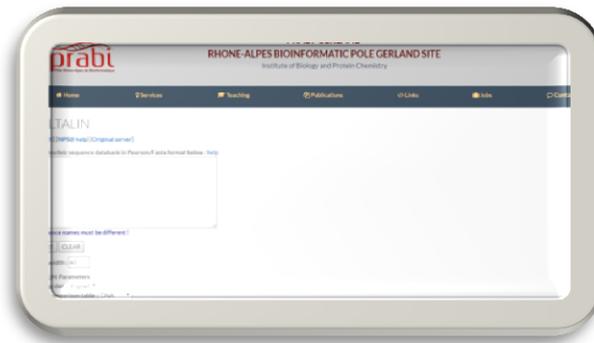


6-Pour chercher les motifs de notre protéine en vas sur PROSITE a l'adresse suivantes : <http://prosite.expasy.org/scanprosite/> puis En choisie l'outil scanprosite Sur le champ de recherche en tape le code de la protéine et on aura ça :



7-Pour en finir on cherche la structure secondaire de notre protéine en vas sur pbil l'adresse suivante :

http://npsa_pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html. On tape notre séquence protéique en forma FASTA.



Ces expériences ont permis de représenter nos informations biologiques en se servant des bases de données automatisées.

Chapitre IV
Résultats et
discussions

Chapitre VI Résultats et discussions

1-/Prélèvement du sol :

Les échantillons du sol, prélevés à partir des racines des six lignées ont été suspendu en premier lieu dans du PBS (1ml.g^{-1}), le tableau(1) présente les quantités de sol prélevé et le volume de PBS ajouté.

Tableau(1) : poids prélevé des différentes fractions du sol, et volumes de PBS ajoutés.

Les RIL	104	34	115	147	83	29
Poids du sol	9g	6g	6g	6g	6g	6g
Volume du PBS	9ml	6ml	6ml	6ml	6ml	6ml

Ses différentes quantités de sol, ont été diluées au $1/10^{\text{ème}}$ dans l'eau physiologique.

Du comptage des colonies bactériennes effectué après 24h et 48h d'incubation à 28°C nous n'avons gardé que les plus élevés.

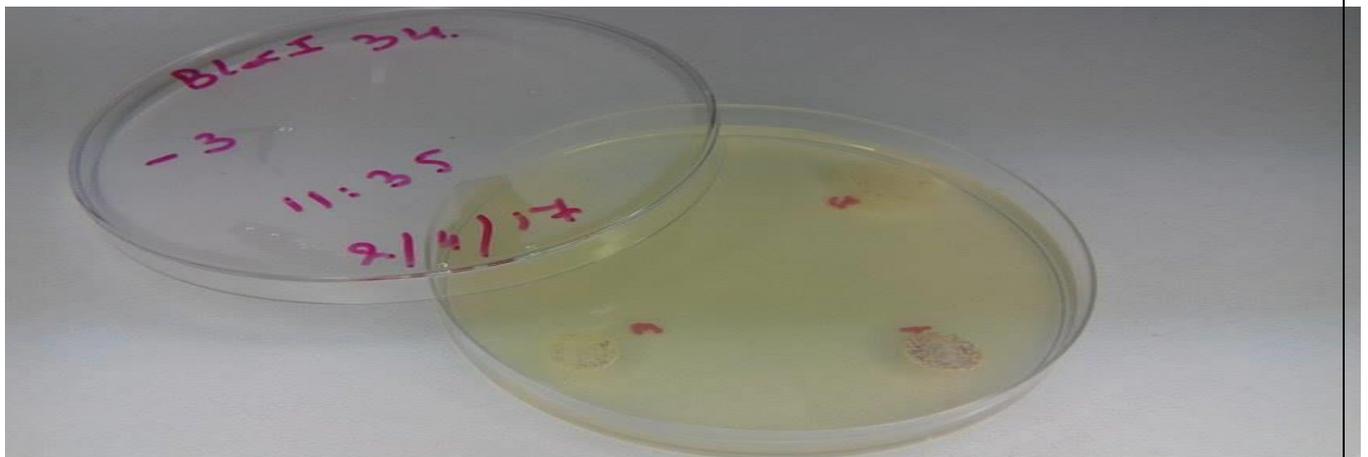


Figure 10 Croissance des bactéries isolées depuis le sol des différentes RIL de phaseolus vulgaris après 48h d'incubation sur milieu LB

2-/ Dénombrement bactérien sur milieu LB :

Le nombre de colonies bactériennes totales par gramme du sol (UFC.g^{-1}) des six lignées, a été déterminé après 48h d'incubation à 28°C sur milieu LB pour les trois stades du développement de la plante.

Les résultats sont présentés dans la figure (2), qui illustre le nombre de bactéries totales exprimé en Log.UFC.g^{-1} de sol des six lignées suffisantes et déficientes.

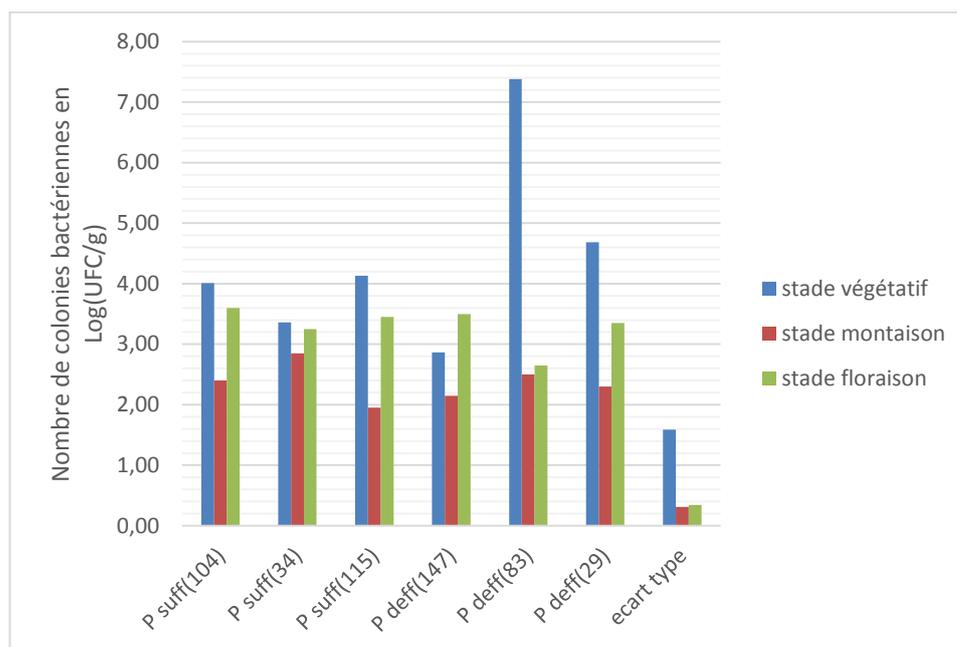


Figure 11 La densité bactérienne des lignées suffisantes en P versus les lignées déficientes en P aux trois stades du développement de la plante *Phaseolus vulgaris*. Log UFC.g^{-1} sur milieu LB

La figure 11 montre que le nombre de bactérie varie entre $2,3 \cdot 10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$ et $7,3 \cdot 10^7 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ de sol.

En observant nos données on relève que le sol sous couvert de la RIL 104 à un nombre de bactéries en moyenne de $4 \cdot 10^7 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ cours du stade végétatif, et en moyenne de $3,6 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ au cours du stade montaison alors qu'au stade floraison le nombre de bactéries totales de la RIL 104 est en moyenne de $2,4 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$.

Dans le sol sous couvert de la RIL 34 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif, est en moyenne de $4 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ et en moyenne de $3,2 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ au

stade montaison alors qu'au stade floraison la taille de la communauté bactérienne totale est en moyenne de $3,4 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$

Dans le sol sous couvert de la RIL 115 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif, est en moyenne de $7,3 \cdot 10^7 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ (figure 11). Au stade montaison le nombre de bactéries totales de la RIL 115 est en moyenne de $2,7 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ Et au cours du stade floraison la taille de la communauté bactérienne totale de cette dernière est en moyenne de $2,5 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$.

Dans le sol sous couvert de la RIL 147 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif est en moyenne de $2,8 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ Et Au stade montaison en moyenne le nombre de bactéries totales de la RIL 147 est de $3,5 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ Alors qu'au stade floraison la taille de la communauté bactérienne totale est en moyenne de $2,1 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$.

Le sol sous couvert de la RIL 83 le nombre de bactéries est en moyenne de $4,9 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ au cours du stade végétatif, et en moyenne de $3,4 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ au cours du stade montaison alors qu'au stade floraison le nombre de bactéries totales de la RIL 83 est en moyenne de $2,3 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$

Dans le sol sous couvert de la RIL 29 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif, est en moyenne de $3,4 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ et en moyenne de $3,2 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ au stade montaison alors qu'au stade floraison la taille de la communauté bactérienne totale est en moyenne de $2,8 \cdot 10^6 \text{ Log UFC.g}^{-1}$.

La figure indique que les lignées suffisantes 104, 34 et 115 au stade végétatif représente une communauté bactérienne totale cultivables plus dense que celle du stade montaison et floraison. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celle mentionnées par Jossi (2008) sur le dénombrement de cellule cultivable dans le sol de la plante *Lolium perenne*. Tungao et al en 2012 travaillant sur *P. vulgaris* a montré un nombre de bactéries qui varie entre $4,6 \cdot 10^7 \pm 2,3 \cdot 10^6$.

La taille de la communauté bactérienne totale des trois lignées déficientes 147, 83 et 29 est presque semblable sauf que pour la lignée 83 au stade végétatif qui a un nombre élevé de bactérie par rapport à la même lignée des deux autres stades du développement.

On peut remarquer également que la taille de la communauté bactérienne totale dans la rhizosphère des lignées suffisantes est supérieure à la taille de la communauté bactérienne totale dans la rhizosphère des lignées déficientes.

La taille des bactéries dans la rhizosphère du haricot au stade végétatif est supérieure à celle du stade montaison ainsi que le stade floraison, mais il existe une grande différence entre la taille de la communauté bactérienne au stade floraison par rapport au stade montaison.

Il ressort de nos travaux qu'aucune différence significative d'abondance de croissance bactérienne n'a pu être mise en évidence sous un couvert donné, au cours du temps. De plus l'ANOVA n'a pas mis en évidence de différences significative du nombre de bactéries par g de sol entre les différents lignées et ceci quel que soit le stade de développement. Il est connu que l'apport de C au sol, issu du processus de rhizodéposition, diminue avec le développement de la plante (Curl, Truelove, 1986). De plus certains auteurs (Vong *et al.*, 2007) ont montré que le colza qui est une dicotylédone comme notre plante, contient dans ses racines davantage de composés carbonés hydrosolubles (et pouvant être considérés comme étant, en partie, à l'origine de la rhizodéposition (Dilkes *et al.*, 2004). Ainsi nous aurions pu nous attendre à observer une densité bactérienne plus importante. Par conséquent, le fait qu'aucune différence significative du nombre de bactéries n'ait été mise en évidence d'une part entre les couverts et d'autre part entre les stades de développement est plutôt un résultat surprenant.

3-/ Dénombrement bactérien sur milieu NBRIP :

La présence du halo indique ce ses bactéries qui poussé sur le milieu spécifique ont une activité phytase. (Figure 12)

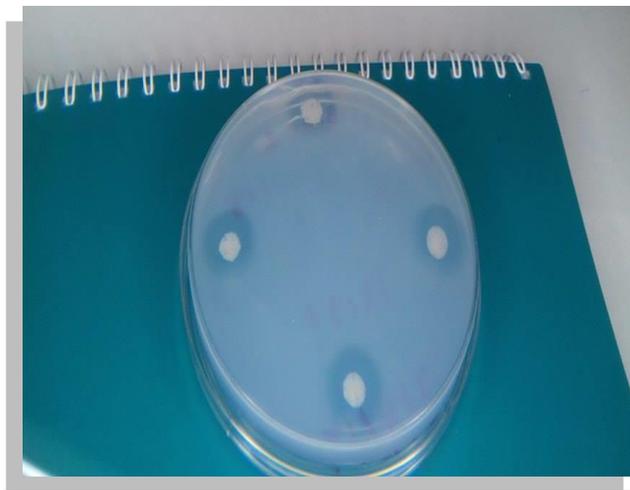


Figure 12 Croissance des bactéries isolées depuis le sol des différentes RIL de *Phaseolus vulgaris* après 96h d'incubation sur milieu NBRIP montrant un halo significatif à la présence de bactéries solubilisatrices de P

Les résultats sont présentés dans la figure (13), qui représente le nombre de bactéries spécifique exprimé en Log.UFC.g⁻¹ de sol des six lignées suffisantes et déficientes en matière d'utilisation du P.

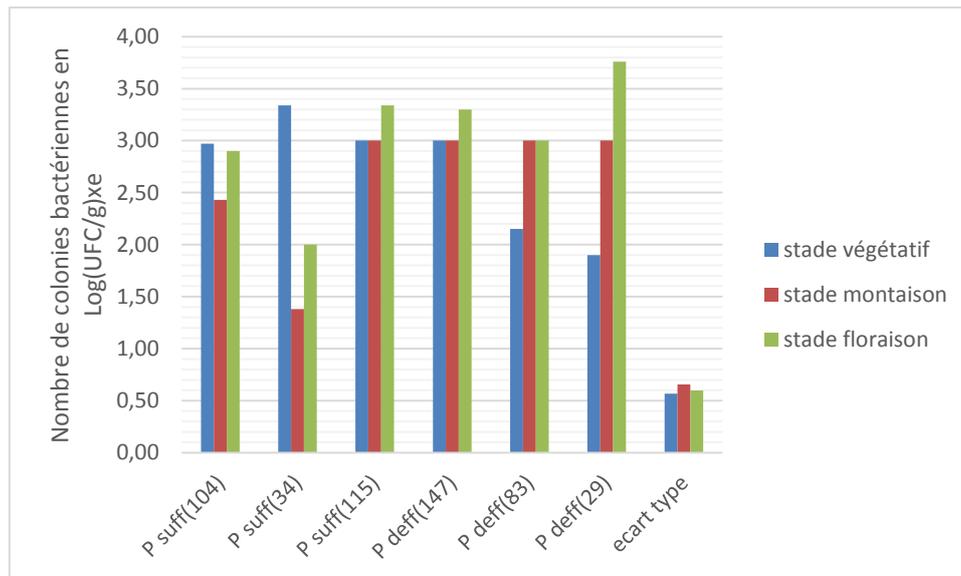


Figure 13 La densité bactérienne spécifique des lignées suffisantes en P versus les lignées déficientes en P aux trois stades du développement de la plante *Phaseolus vulgaris*. LogUFC.g⁻¹ sur milieu NBRIP

La figure 13 montre que le nombre de bactérie varie entre $1,38.10^6$ Log UFC.g⁻¹ et $3,37.10^6$ Log UFC.g⁻¹.

En observant nos données on relève que le sol sous couvert de la RIL 104 a un nombre de bactéries en moyenne de $2,910^6$ Log UFC.g⁻¹ cours du stade végétatif, et en moyenne de $2,43.10^6$ Log UFC.g⁻¹ au cours du stade montaison alors qu'au stade floraison le nombre de bactéries totales de la RIL 104 est en moyenne de $2,9.10^6$ Log UFC.g⁻¹

Dans le sol sous couvert de la RIL 34 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif, est en moyenne de $3,34.10^6$ Log UFC.g⁻¹ et en moyenne de $1,38.10^6$ Log UFC.g⁻¹ au stade montaison alors qu'au stade floraison la taille de la communauté bactérienne totale est en moyenne de $2,0.10^6$ Log UFC.g⁻¹.

Dans le sol sous couvert de la RIL 115 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif, est en moyenne de 3.10^6 Log UFC.g⁻¹ (figure 13). Au stade montaison le nombre de bactéries totales de la RIL 115 est en moyenne de $3,34.10^6$ Log UFC.g⁻¹ Et au cours du stade floraison la taille de la communauté bactérienne total est en moyenne de $3,34.10^6$ Log UFC.g⁻¹.

Dans le sol sous couvert de la RIL 147 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif est en moyenne de 3.10^6 Log UFC.g⁻¹ Et Au stade montaison en moyenne le

nombre de bactéries totales de la RIL 147 est de $3,5.10^6$ Log UFC.g⁻¹ Alors qu'au stade floraison la taille de la communauté bactérienne totale est en moyenne de $3,341.0^6$ Log UFC.g⁻¹.

Dans le sol sous couvert de la RIL 83 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif, est en moyenne de $2,15.10^6$ Log UFC.g⁻¹ (figure 13). Au stade montaison le nombre de bactéries totales de la RIL 83 est en moyenne de $3,0.10^6$ Log UFC.g⁻¹ Et au cours du stade floraison la taille de la communauté bactérienne total est en moyenne de $3,0.10^6$ Log UFC.g⁻¹

Dans le sol sous couvert de la RIL 29 le nombre de bactéries au cours du stade végétatif est en moyenne de $1,9.10^6$ Log UFC.g⁻¹ Et Au stade montaison le nombre de bactéries totales de la RIL 29 est de $3,0.10^6$ Log UFC.g⁻¹ Alors qu'au stade floraison la taille de la communauté bactérienne totale est en moyenne de $3,76.10^6$ Log UFC.g⁻¹.

La figure (13) indique que la taille de la lignée P suffisante (115) du stade végétatif est inférieure à celles du stade montaison et floraison

Et la taille de la lignée P suffisantes (34) du stade végétatif est plus importante que celles du stade montaison et floraison idem pour la taille de la lignée P suffisantes (104).

On remarque aussi que la taille la lignée déficiente (147) est supérieure à la taille de la lignée (83) et (29) du stade végétatif par contre la lignée (29) du stade floraison est plus grande de celles des deux autres lignée. Mais au stade montaison la taille des trois lignées est similaire.

En comparant le nombre de bactérie dans les trois stades on remarque qu'ils ont presque la même taille alors cette dernière est similaire aux différentes phases du développement de la plante.

D'après le Test d'homogénéité des variances, nous notons une différence entre les RIL. Les souches bactériennes ne se comportent pas tout à fait de la même façon.

Leur classement selon le test de Newman et Keuls donne: Une plus grande activité phytase a été observée dans la rhizosphère de la RIL 115 par rapport aux autres RILs alors que la RIL 83 est la moins performante des lignées.

4-/Comparaison entre la taille du pool bactérien du milieu LB et celle du pool bactérien du milieu NBRIP :

D'après les deux histogrammes précédents (figures 12 et 13) on remarque que la taille de la communauté bactérienne cultivable totale sur milieu (LB) est significativement plus grande que la taille du pool bactérien spécifique sur milieu (NBRIP).

L'analyse statistique des données a été réalisée par le logiciel SPSS, et la statistique de Levene confirme que les variances entre les deux groupes de mesures relatifs aux deux milieux LB et NBRIP ne sont pas égales. Il y a une très forte dispersion entre les valeurs mesurées des bactéries sur les deux milieux.

La table ANOVA renvoie la différence significative entre les deux milieux LB et NBRIP. Donc les bactéries ne cultivent pas de la même manière sur les deux milieux. Il semble que le milieu (LB) est plus favorable à leur croissance.

Le test de l'ANOVA indique que les trois phases n'ont aucun effet significatif sur la croissance bactérienne (annex6). Ces bactéries cultivent indépendamment de la nature des trois phases.

En se basant sur le test de Student-Newman-Keuls^a on est arrivé à conclure, sur la croissance bactérienne, que seul l'effet phase (stade du développement) n'a montré aucune influence sur la prolifération et la croissance de la communauté bactérienne.

Il serait curieux de savoir si les deux autres facteurs (Milieux et RIL) ont une influence croisée.

Pour cela on a effectué une ANOVA à deux facteurs (annex6), les résultats de cette dernière ont montré que Le facteur RIL exerce un effet sur la croissance bactérienne. Cet effet est moins prononcé que celui du facteur milieu, le facteur milieu exerce une forte influence sur la croissance bactérienne. L'interaction entre ces deux facteurs n'est pas très significative.

La présente étude a eu pour but de caractériser les bactéries totales et celles minéralisant le phytate dans six RILs de *P vulgaris* contrastante en utilisation de P. L'étude des isolats du sol afin d'évaluer la densité des bactéries fonctionnelles cultivables sur milieu solide et spécifique NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) (Nuatiyal,

1999) indique que ces bactéries, présentes dans la rhizosphère, sont favorisées à proximité des racines et que seule une faible proportion de ces bactéries sont capables de minéraliser le phytate. Cette observation conforte les résultats obtenus par Richardson et Hadobas (1997) qui ont trouvé que moins de 0,5 % de bactéries cultivables du sol sont capables d'utiliser le Phytate comme source de P et les résultats obtenus par Jossi (2008) qui a trouvé que 1,6% de bactéries dans la rhizosphère de *Lolium* sont capables de minéraliser le phytate.

L'influence des RILs sur la communauté bactérienne fonctionnelle rhizosphérique et dans une moindre mesure sur la communauté totale, serait due au fait que l'activité métabolique de la plupart des populations dans la rhizosphère est fondée sur la consommation des exsudats racinaires. La communauté bactérienne fonctionnelle peut, ainsi, être plus affectée par les changements dans l'exsudation racinaire que la communauté totale, quelle que soit la source de la modification (le génotype de la plante, le stade de développement malgré que les tests statistiques ont indiqué qu'il n'y a pas un effet sur la taille de la communauté bactérienne). Par ailleurs, d'autres études sur divers systèmes, y compris les prairies pérennes (Jossi *et al.*, 2006), ont rapporté des écarts similaires: Ce qui expliquerait que l'activité phytase soit plus importante chez la RIL 29 comparativement à la RIL 83 qui est moins performante (Figure 13).

Mis en évidence de l'extraction de l'ADN du sol :

Contrôle de l'extraction et purification de l'ADN:

Les résultats du tableau(2) 260/280 et du 260/230 indiquent que l'ADN extrait est pur.

Sample ID	Nucleic Acid Conc. ng/μl
147i	2295,7
104 I	1482,1
34 I	5517,3
115 I	1281,3
83 I.	2697,4
29 I	684,7
104 II	207,8
34 II	1397
115 II	545,7

147 II	270,9
147 III1	271,4
83 II.	1295,1
29 II	315,4
104 III	223,8
34 III	2489,3
115 III	318,1
83 III	66,6
83 III1	68,9
29 III	1353,2

Tableau(2) résultats de la vérification de la pureté d'ADN par dosage au nano drop

La méthode de révélation de l'extraction de l'ADN la plus utilisée c'est l'électrophorèse sur gel d'agarose.

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---

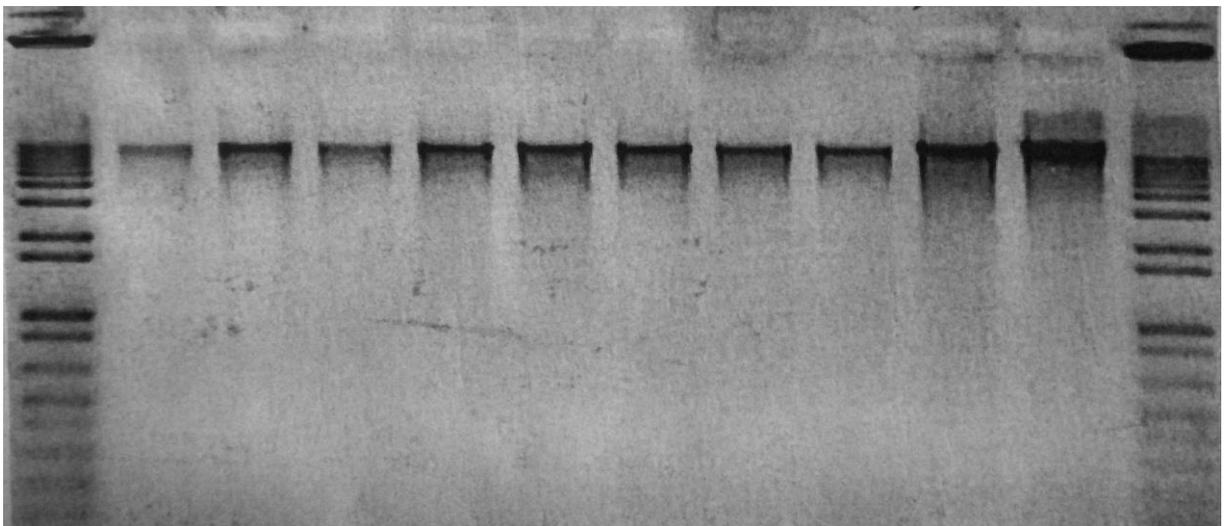


Figure 14 Dépôt des produits de l'extraction dans les puits sur le gel d'agarose 1,5%

Ce profil électrophorétique montre donc que l'extraction de l'ADN a été réalisée avec succès. Cependant, cette extraction indique la migration des dix échantillons en fonction du marqueur de taille.

On peut améliorer la visibilité des bandes, notamment des moins marquées par un colorant, ou par des traitements numériques des images réalisés avec un logiciel de traitement d'images.

Conclusion et perspective :

La faible disponibilité du phosphore (P) dans les sols constitue un problème majeur pour la production des plantes. Malgré que la plupart des sols contiennent des quantités importantes de phosphore, seule une faible partie peut être assimilée par les plantes spécialement les légumineuses considérées comme grandes consommatrices de P. Le phytate représente un composant majeur du phosphore organique du sol, et sa minéralisation, par la phytase, libère du P disponible pour les plantes. Dans le sol, ce processus est assuré par les microorganismes, qui représentent un élément clé dans la biodisponibilité du P.

Cependant, les organismes du sol tels que les bactéries ont développé de nombreuses stratégies pour l'amélioration de la disponibilité en P. La sécrétion d'enzymes spécifiques (phytases) est une de ces stratégies.

Les expériences que nous avons menées, visaient à évaluer la taille des communautés bactériennes capables de minéraliser le phytate, par la sécrétion de la phytase, dans la rhizosphère de la légumineuse *Phaseolus vulgaris*, d'où nous les avons isolées pour déterminer leur densité dans un sol rhizosphérique sous couvert de six lignées contrastantes vis-à-vis la déficience en P.

Cette étude est à notre connaissance, la première à mettre en évidence un effet de mobilisation d'une communauté bactérienne minéralisant le phytate, lors du développement d'une légumineuse *in situ*, en conditions de plein champ.

Les résultats obtenus ont montré que les bactéries phytasiques, sont omniprésentes dans le sol de *P. vulgaris*, et que leur densité est plus importante chez les lignées présentant des déficiences en utilisation du P. Nous pouvons conclure que *P. vulgaris* est à l'origine d'un effet rhizosphère marqué et en conséquence d'une structuration importante de la communauté bactérienne totale du sol. Cet effet structurant semble davantage s'expliquer par la nature des rhizodépôts que par leur quantité cette dernière est plus marquée chez les bactéries fonctionnelles par rapport aux bactéries

Toutefois, nos résultats montrent que cet effet rhizosphère est à l'origine d'une réorganisation de la structure de la communauté microbienne sans pour autant avoir de conséquence sur la densité de la communauté bactérienne totale, estimée par culture sur milieu solide (et ramenée par g^{-1} de sol sec), et ce au cours de la croissance de la plante. Cependant, cette densité, exprimée en nombre de UFC g^{-1} de sol, et qui apparaît plus faible

sous rhizosphère, semblerait exercer une pression de sélection plus importante sur la communauté bactérienne rhizosphérique.

En conclusion, l'effet rhizosphère du haricot, à l'origine de la libération de composés photosynthétiques semble limiter l'augmentation de la taille de la communauté bactérienne. Demeure, par contre, la question de savoir si cette structuration particulière, est liée notamment aux besoins que montrent cette plante en certains nutriments et spécialement le P. En effet, le haricot sélectionnerait-il par sa rhizodéposition, une communauté microbienne plus favorable à son développement et assurant ainsi, un meilleur turn-over du P?

REFERENCES
BIBLIOGRAPH
QUES

Références bibliographiques

- 1) **J. Kerovuo, J. Rouvinen, F. Hatzack. Biochem. J. (2000), 352, 623-628. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by Bacillus phytase : Indication of a novel reaction mechanism ;**
- 2) **Atlas R. M. & Bartha R., 1992.** Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), 563.
- 3) **Bennai M., benabbas B. (2007).** L'amélioration des rendements des céréales par une fertilisation adaptée aux conditions pédoclimatiques Algériennes. Constantine. Septembre 2007.
- 4) **Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P. & Vanderleyden J. 2003.** Bean (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128.
- 5) **Brun F, Richard-Molard C et al. (2010)** To what extent may changes in the root system architecture of *Arabidopsis thaliana* grown under contrasted homogenous nitrogen regimes be explained by changes in carbon supply? A modelling approach. *Journal of experimental botany* 61: 2157-2169.
- 6) **Cermola M., Fedorova E., Tate R., Riccio A., Favre R., & Patriarca E.J. (2000)** Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 733-741
- 7) **Claude Plassard, Novembre 2015.** Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol. *Innovations Agronomiques* 43 (2015), 115-138.

- 8) **Condron L.M. & Tiessen H. (2005)** Interactions of organic phosphorus in terrestrial environments. In: Turner B.L., Frossard E. and Baldwin D.S. Eds, Organic Phosphorus in the Environment. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, p. 295-307.
- 9) **Curl E.A., Truelove E. (Eds.). 1986.** The rhizosphere, Springer-Verlag, New York. pp. 228.
- 10) CYCLE Géochimique : DU CARBONE., or: L'AZOTE U DU PHOSPHORE DANS UN ÉCOSYSTÈME INONDÉ: CAS DE LA MARE. or: BATAMANI (DELTA INTÉIUEUR DU NIGER) Présenté et Soutenu par : Rabiadou Adolphe DLARRA Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Normale Supérieure.
- 11) **Demers. 2008.,** Département des sols et de génie agroalimentaire Faculté des Sciences de l'Agriculture et del'Alimentation Université Laval Québec 2008., Formes et disponibilité du phosphore de composts utilisés comme amendements de sols agricoles.13
- 12) **Devau N., Hinsinger P., Le Cadre E., Colomb B., Gerard F., 2011.** Fertilization and pH effects on processes and mechanisms controlling dissolved inorganic phosphorus in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 2980-2996
- 13) **Dilkes N.B., Jones L.D., Farrar J.F. 2004.** Temporal dynamic of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiology.* 134: 706-715.
- 14) **Dipak, H.D. & Mukherjee, K.D. 1986.** Functional properties of rapeseed protein products with varyingphytic acid contents. *J. Agric. Food Chem.,* (34): 775780.
- 15) **Frossard E., Brossard M., Hedley M.J. & Metherell A. (1995)** Reactions controlling the cycling of P in soils.
- 16) **Hellsten A, Huss-Danell K (2001)** Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica* 50,135-142.

- 17) **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.)
- 18) **Hiltner L. 1904.** Ober neuer erfahrungen und probleme auf dem gebeit der bodenbakteriologie unter besonderer nerucksichtigung der griindiingung und brache. *Arbeiten aus dem Deutschen Landwirtschafts Gesellschaft.* 98: 59-78.
- 19) **Hinsinger P(2007),** La biodisponibilité du P dans le sol peut ainsi varier considérablement d'une espèce végétale à l'autre selon ses capacités à modifier elle-même la disponibilité de Pi ou *via* les organismes naturellement présents dans sa rhizosphère. a review. *Plant Soil* 237: 126-155.)
- 20) **Hinsinger P (1998)** How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv Agro* 64: 225-265.
- 21) **F. Hatzack, F. Hübel, W. Zhang, P. Hansen, S. Rasmussen. Biochemistry (2001), Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal-dye detection HPLC and NMR;**354, 473-480.
- 22) **J. Fortin, 2000.** An agri-environmental phosphorus saturation index for acid coarse-textured soils. *J. of Environ. Quai.* 29: 1561-1567.
- 23) **Jossi M. (2008).** Rhizosphere bacterial conunities associated with lolium perenne structuration and plante-mediated influences. These d'état de la faculté de Neuchatel de Suisse.
- 24) **Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., 2007.** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agronomy for Sustainable Development* 27, 29-43
- 25) **Khiari, L., L. E. Parent, A. Pellerin, A. R. A. Alimi, C. Tremblay, R. R. Simard et Leytem A.B., Mikkelsen R.L. & Gilliam J.W. (2002)** Sorption of organic phosphorus compounds in Atlantic coastal plain soils. *Soil Sci* 167: 652-658

- 26) **KHICHANE C. (2004)**. Access xp étape par étape créer application de base de données. El maarifa. ISBN: 9961-48-116-X. El-Souna, Alger. p 234
- 27) **Maougal R.T et al., (2014)**. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated conunon beau (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *European Journal of Soil Biology*
- 28) **Merbach W., Minis E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulze J. 1999**. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and theirs possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 162: 787-796.
- 29) **Miah M.Y., Kanazawa S., Chiu C.L. Hayashi H., Chino M. 2000**. Microbial distribution and function across wheat rhizosphere with oxamide and ammonium sulfate as N sources. *Soil Sciences and Plant Nutrition*. 46: 787-796.
- 30) **Munns D. N. & Mosse B. (1980)** Mineral nutrition of legume crops. in *Advances in Legume Science* (Summerfield, R.J. and Bunting, A. H., eds). HMSO, London, UK. pp: 115-125
- 31) **Nguyen C (2003)** Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23:375396.
- 32) **Nguyen, C., 2009**. Rhizodeposition of organic C by plant: mechanisms and controls. In: *Sustainable Agriculture*. Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchère, V. and Alberola, C. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 375-396
- 33) **Parent, L.-É., (2002)**. Le flux et la dynamique du phosphore dans les sols agricoles.
- 34) **Pierzynski, G. M., J. T. Sims et G. F. Vance. 2000**. *Soils and environmental quality*. CRC Press.
- 35) **québécois**. Colloque sur le phosphore - Ordre des agronomes du Québec, Drummondville

- 36) **Quénéa K., 2004.** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
- 37) **Richardson A.E. (1994).** Soil microorganisms and phosphorus availability. Dans: Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupts, V. V. S. R., et Grace, P.R. Éd., Soil Biota, management in sustainable farming systems. CSIRO Australia, Melbourne, p. 50-62.
- 38) **Saosoong, K., Wongphathanakul, W., Poasiri, C. and Ruangviriyachai, C., 2009.** Isolation and Analysis of Antibacterial Substance Produced from *P. aeruginosa* TISTR 781
- 39) ; **B. Mitchell, K. Vogel, L. Pasamontes, Microbiology (1997), The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophora thermophila* 143, 245-252.**
- 40) **Turner B.L., Frossard E. & Baldwin D.S. (2005)** Organic phosphorus in the environment. CABI Publishing, 875 Massachusetts Avenue, Cambridge, USA, 399 p. *KKU Sci. J.* 37(2): 163-172.
- 41) **Vong P.C., Piutti S., Benizri E., Slezack-Deschaumes S., Robin C., Guckert A. 2007.** Watersoluble carbon in roots of rape and barley : impacts on labile soil organic carbon, arylsulfatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil.* 294:19-29.
- 42) **Whiteley G.M., Dexter A.R. 1984.** Displacement of soil aggregates by elongating roots and emerging shoots of crop plants. *Plant and Soil.* 77: 131-140.

ANNEX

Annex

Annex1 : préparation de l'eau physiologique

L'eau physiologique est une solution saline isotonique à 0.9% recommandé comme solution de dispersion ou comme liquide de déglutition. La concentration en chlorure de sodium (0.9%) maintient l'équilibre osmotique et permet d'obtenir une solution isotonique.

Composition :

Chlorure de sodium	9g
Eau purifiée	1L

Annex2 préparation du milieu LB

Ce milieu permet la croissance des bactéries du sol et permet de les maintenir vivantes. Sa composition est présentée dans le tableau suivant :

Tableau : composition de milieu LB en g.l⁻¹

Trypton	10
Extrait de levure	5
NaCl	5

Dissoudre ses composants dans 1l d'eau distillée. Mélanger. Ajouter 15g de poudre d'agar au mélange.

Autoclaver le milieu pendant 15min sous pression de 1.5 bar à 121°C.

Repartir environ 25ml par boîte de pétrie et laisser refroidir.

Annex 3 préparation du milieu NBRIP

Mis au point par Nautiya en 1999, pour sélectionner les bactéries phytales avec le Calcium triphosphate (TCP) comme source de phosphore.

Composition de milieu NBRIP en g.l⁻¹.

Glucose	20
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,25
MgCl ₂ -6H ₂ O	10
KCl	0,2
Extrait de levure	0,1
Agarose	15

Annex4 Préparation du PBS

C'est une solution tampon couramment utilisée en biochimie.

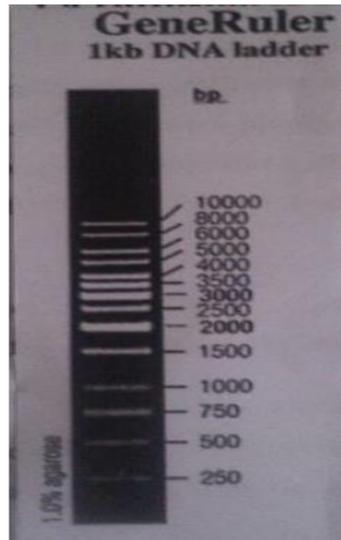
Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter

Composition du PBS : en g.l⁻¹ et pH7,4

NaCl	8
------	---

KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

Annex5 Marqueur de taille d'ADN



Figure(1) photo représentant les différentes tailles des bandes du marqueur de taille

Annex 6 Electrophorèse

Préparation du gel:

On choisit le pourcentage d'agarose de notre gel en fonction de la taille de la séquence nucléique que l'on souhaite faire migrer. Dans notre cas pour la vérification de l'extraction d'AND on choisie un pourcentage d'agarose de 1.5%

Le volume à préparer est de 1L. Nous avons pèse

1 g d'agarose normale high melting,

0,5 g d'agarose low melting.

Pour 100 ml de

Faire chauffer la préparation au four micro-onde, afin que l'agarose soit totalement dilue. Ajouter ensuite 14 de BET (Bromure d'ethidium) dans la solution. Le BET est un intercalant, il se fixe entre les bases azotées. Installer le plateau de moulage et positionner un peigne de 26 puits.

Couler la solution et laisser solidifier pendant 20 à 30min.

Retirer le peigne et installer le plateau contenant le gel dans la cuve à électrophorèse contenant la solution tampon.

Révélation :

On révèle grâce à un appareil à rayonnement UV possédant un couvercle de protection pour les yeux. Prendre une photographie.

Annex7 Analyse de variance (ANOVA)

Tableaux d'analyse de variance à deux facteurs des paramètres étudiés.

Tableau(1) Test d'homologie de variance :

Bactéries

Statistique de leven	ddl	ddl2	Sig
36.653	1	34	,000

Tableau(2)

TABLE ANOVA

Mi milieu

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	307658,809	1	307658,809	72,513	,000
Intragroupes	144255,513	34	4242,809		
Total	451914,322	35			

2 - ANOVA A UN FACTEUR : LES PHASES

L'ANOVA du facteur PHASES renvoie les résultats suivants :

Tableau (3)

ANOVA

Phases

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	2054,496	2	1027,248	,075	,928
Intragroupes	449859,826	33	13632,116		
Total	451914,322	35			

Tableau(4)

ANOVA

RILs

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	10178,804	5	2035,761	,138	,982
Intragroupes	441735,518	30	14724,517		
Total	451914,322	35			

Bactéries

Student-Newman-Keuls^a

RIL	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
147	6	107,5000
104	6	111,4433
115	6	114,5000
29	6	121,4433
34	6	139,6100
83	6	154,5000
Sig.		,984

ANOVA DEUX FACTEURS : MILIEUX x RILs

Tests des effets inter sujets

variable dépendante: Bactéries

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
RIL	10178,804	5	2035,761	,418	,831
Milieu	307658,809	1	307658,809	63,199	,000
RIL * Milieu	17242,109	5	3448,422	,708	,623
Erreur	116834,600	24	4868,108		
Total	1012910,329	36			

caractérisation et évolution de la taille de la communauté bactérienne totale et fonctionnelle dans la rhizosphère du haricot et création d'une base de données

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie et génomique végétale

Résumé

Un lien étroit existe entre les microorganismes du sol et la plante parmi ces liens le processus de rhizodéposition est connu pour moduler la structure, la densité et l'activité des communautés microbiennes dans l'environnement rhizosphérique. Des expériences menées dans cette étude consistent à élargir les connaissances du fonctionnement de la rhizosphère, et de la structuration des communautés bactériennes. Les communautés bactériennes totales, actives et cultivables de la rhizosphère sont caractérisées en relation avec différentes perturbations (variations au niveau du génotype et stade phénologique de la plante). L'établissement, *in vitro*, du profil fonctionnel des populations bactériennes associées à différents RILs et stades de développement du haricot, permet de mettre en évidence les fonctions bactériennes dont la fréquence est affectée par ces deux facteurs liés à la plante. Il ressort que la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique totale varie entre $2,3 \cdot 10^6$ Log UFC.g⁻¹ et $7,3 \cdot 10^7$ Log UFC.g⁻¹ de sol. La lignée 115 semble héberger la communauté la plus élevée alors que la lignée 83 (déficiente en utilisation du phosphore) présente la communauté la plus basse. Les communautés bactériennes fonctionnelles sont présentes dans le sol de la plante *P. vulgaris*. Toutefois les différents RILs ont un effet sur la taille de ses dernières dans la rhizosphère il ya une plus grande mobilisation des bactéries fonctionnelles chez les lignées déficiente en P et le passage de la montaison de la plante semble être un stade critique, à partir duquel l'influence de la plante augmente.

Mots clés : activité phytase, communauté bactérienne fonctionnelle, *Phaseolus vulgaris*, phytate, rhizosphère.

Laboratoire de recherche : Biochimie génétique et biotechnologie végétal

Jury d'évaluation :

Président du jury : HAMIDCHI M A (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : MAOUGAL RYM T (Enseignante INATAA - UFM Constantine),
Co-rapporteur : CHEHILI HAMZA
Examineur : TAMAGOULT M (Enseignant- UFM Constantine).

Date de soutenance : 20 /06/2017