

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES DE CADARACHE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INVIVO AGROSOLUTIONS

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED 62)

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de Docteur en Microbiologie

Arnaud LAVEILHÉ

ÉTUDE DU POTENTIEL D'UN INOCULUM MIXTE DANS L'AMÉLIORATION DE LA SANTE DU COLZA

Soutenue le 20 octobre 2017 devant le jury :

Feth el Zahar HAICHAR (MCU, HDR, Lyon) : rapporteur

Pierre-Alain MARON (DR Inra, Dijon) : rapporteur

Chantal TARDIF (PU, AMU, Marseille) : examinatrice

Lucie MICHÉ (MCU, AMU, Marseille) : examinatrice

Antoine BONHOMME (Directeur R&D, InVivo, Paris) : examinateur

Thierry HEULIN Directeur de thèse

LABORATOIRE D'ÉCOLOGIE MICROBIENNE DE LA RHIZOSPHERE ET D'ENVIRONNEMENTS EXTREMES
UMR 7265 CNRS-CEA-UNIVERSITE AIX-MARSEILLE
DRF/BIAM CEA CADARACHE 13108 SAINT PAUL LEZ DURANCE CEDEX

INVIVO AGROSOLUTIONS
83-85 AVENUE DE LA GRANDE ARMÉE 75116 PARIS CEDEX 16

Résumé

Le modèle de production agricole actuel est en pleine évolution. Là où jadis prévalaient le volume et la qualité des productions, les enjeux actuels intègrent de nouvelles exigences reposant sur l'éthique et le développement durable. La question n'est donc plus de « comment produire plus » mais bien « comment produire plus efficacement ».

Désormais, il n'est donc plus envisageable de dépendre uniquement de l'usage de produits phytosanitaires pour garantir un rendement suffisant des cultures. La sortie de cette dépendance passe par l'exploration de nouvelles voies d'amélioration basées sur des démarches scientifiques.

Parmi les éléments de réponse proposés, l'axe exploré dans le cadre de ce travail repose sur l'amélioration de la compréhension des mécanismes mis en jeu au sein de la rhizosphère. Cette rhizosphère, définie comme étant la fraction du sol immédiatement influencée physico-chimiquement et biologiquement par les racines vivantes des plantes, est le siège de nombreuses relations mutualistes impliquant un bénéfice réciproque entre la plante et les populations microbiennes associées. Ces bactéries, appelées PGPR pour «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria» ont sur la plante de multiples effets bénéfiques (phytostimulation, biocontrôle, nutrition, hydratation, etc.) qui seront détaillés dans la première partie de ce travail.

Un panel de sept souches bactériennes du type PGPR a été testé en interaction avec le colza, plante modèle pour cette étude dans le but d'évaluer la réponse de cette plante à l'inoculation. Des résultats préliminaires encourageants ont été obtenus *in vitro* quant à la capacité de ces rhizobactéries à croître en ayant les exsudats racinaires pour seule ressource de carbone et d'énergie.

Ce travail a été complété par une étude sur l'expression des gènes phytobénéfiques, *phlD* et *hcnA*, de *Pseudomonas brassicacearum* co-cultivé avec des champignons phytopathogènes et deux autres rhizobactéries (*Kosakonia sacchari* anciennement *Enterobacter radicincitans* et *Rhizobium alarii*) en présence ou en l'absence de plante, et en fonction de la disponibilité du fer.

La meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant les équilibres écologiques entre populations microbiennes au sein de la rhizosphère permettra d'apporter de nouveaux éléments de réponse aux problématiques soulevées par l'évolution des techniques de cultures vers des pratiques plus respectueuses de la Terre et des Hommes.

Abstract

Agricultural production is changing. Now, this way of production includes new considerations as ethics and sustainable development. The main question is not any more “how to produce more” but “how to produce better?” The use of chemicals inputs cannot remain a solution to yield well and alternatives methods based on the recent scientific results are under investigation.

One of these solutions is a better understanding of the mechanisms governing the microbial interactions in the rhizosphere. Rhizosphere is defined as the part of the soil directly under influence of living roots of plants. This soil fraction is characterized by an intense biological activity where plant and microorganisms interact under saprophytic, associative or symbiotic mechanism. Beneficial microorganisms, called PGPR for «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria», are able to use root exudates as sole carbon and energy source and produce beneficial molecules stimulating plant growth, improving water and nutrients uptake or preventing plants diseases. These beneficial mechanisms are reviewed in the first part of this work.

Seven bacterial strains have been tested for their phytobeneficial abilities and their effect on rapeseed growth. Results from preliminary *in vitro* experiments have been confirmed using *in planta* experiments for which plant root exudates were the sole carbon and energy source for the tested rhizobacteria.

The main objective of this study was to propose a mixt inoculum able to generate complementary phytobeneficial effects on rapeseed. Several trials have been carried out to evaluate the capacity of the inoculated strains to persist and grow in a non-sterile soil and their impact on the endogenous microbiota using a 16S rDNA metabarcoding analysis.

This work has been completed by an evaluation of the expression of phytobeneficial genes, *phlD* and *hcnA*, in *Pseudomonas brassicacearum* co-cultivated with plant pathogen fungi and two other rhizobacteria (*Kosakonia sacchari* previously *Enterobacter radicincitans* and *Rhizobium alarii*) in presence or absence of plant, as well as in relation to iron availability. We found that *P. brassicacearum* antifungal activity is dependant on DAPG production.

A better understanding of the microbial phytobeneficial mechanisms acting in the rhizosphere at the community level is a prerequisite of a successful application of microbial inoculation to face new challenges of modern agriculture.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Wafa Achouak et Thierry Heulin qui m'ont accordés leur confiance et m'ont permis d'entreprendre ce travail au sein du LEMIRE .Je vous remercie de m'avoir aidé à porter ce projet et je vous suis reconnaissant pour votre soutien. Grâce à vous, j'ai pu garder le cap et mener ce projet à son terme. Pour les mêmes raisons, je souhaite remercier Antoine Bonhomme, Bernard Raynaud et Jérôme Thibierge qui m'ont accueilli et m'ont offert l'opportunité de réaliser ce travail pour le compte d'Invivo AgroSolutions.

Je souhaite, en outre, exprimer toute ma reconnaissance à Sylvain Fochesato et Marie Bertrand pour toutes les connaissances qu'ils m'ont apportées, pour leur aide dans mon travail et leur soutien dans ce projet.

Bien qu'un travail de thèse nécessite une grande autonomie, cela reste néanmoins un travail d'équipe. Aussi, je tiens à exprimer toute ma gratitude au noyau dur (et tendre) du LEMIRE : Mohamed Barakat, Gilles De Luca, Philippe Ortet et Catherine Santaella pour leur amitié et tout ce qu'ils m'ont apporté.

Un grand merci à tous ceux qui sont passés par le LEMIRE pendant ces quelques années et qui m'ont témoigné de l'amitié, de l'aide et du soutien : Elsy Akkari, Loubna Benidire, Clothilde Bonnet, Agnès Gastaud, Mohamed Hamidat, Lamia Harfouche, David Lalaouna, Wei Liu et Cécile Simonet.

Ce travail a nécessité l'utilisation des techniques qui m'ont ouvert les portes d'autres laboratoires dans lesquels j'ai reçu aide et soutien. J'adresse tous mes remerciements à Hélène Javot au LBDP, Patricia Henri au LEMP, Pascaline Auroy, Caroline Cagnon et Pierre Richaud du LB3M et une mention spéciale à Séverine Boiry, Frédéric Espanet, Christine Marol et Patrice Ruellan qui sont devenus, en quelque sorte, une deuxième famille tout le temps que j'ai pu passer en expérimentations au GRAP auprès d'eux.

J'adresse aussi mes remerciements à Carol Fortuno qui m'a facilité la vie administrative au centre, à Daniel Chaumont qui m'a grandement aidé dans mes expérimentations en me permettant de travailler plus longtemps quand j'en ai eu besoin et à Patrice Brahic pour sa contribution à l'élaboration du dispositif de culture.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude à ma femme Anne-Sophie, mon frère Vincent, nos parents, familles et amis, et à mon cousin Pierre Daram qui m'ont soutenu dans les moments difficiles et grâce à qui j'ai pu aller de l'avant. Un grand merci à Dominique Féménia qui, en des circonstances très particulières, m'a apporté son soutien.

Glossaire

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

ACP : analyse en composante principale

ADE : autorisation de distribution pour expérimentation

ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

AIA : Acide Indole Acétique

ANOVA : analysis of variance

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN (RNA) : acide ribonucléique

BSA : Bovin Serum Albumin

CAA : milieu Casamino acids

CEE : Communauté Economique Européenne

CFU : Colony-forming unit

CSLM : confocal laser scanning microscope

CV : coefficient de variation

DAPG : diacetylphloroglucinol

DO : Densité optique

DOM : Département d'Outre-Mer

EGFP : Enhanced-GFP

GES : Gaz à Effet de Serre

GFP : green fluorescent protein

HCN : cyanure d'hydrogène

I : modalité inoculée

ICP-AES : Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

IFT : Indicateur de Fréquence de Traitement phytosanitaires

ISR : résistance systémique induite

JA : acide jasmonique

Kan^R : résistance à la kanamycine

LB : Luria-Bertani lysogeny broth

MAPG : monoacetylphloroglucinol

MET : microscope électronique à transmission

MIT : Massachusetts Institute of Technology

MLSA : Multilocus Sequence Analysis

ncsRNA : non coding small RNA

nd : absence de donnée

NI : modalité non inoculée

ONG : Organisation Non Gouvernementale

OTU : Operational Taxonomic Unit

PA : partie aérienne

PAF : milieu Pseudomonas Agar F

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGPR : Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria

PLT : pyolutéorine

PNUD : Programme des Nations Unies pour le Développement

PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement

ppp : points par pouce

PR : partie racinaire

PRN : pyrrolnitrine

PTFE : polytétrafluoroéthylène

PVK : milieu Pikovskaya Agar

RBS : ribosome binding site

Réseau DEPHY : réseau de Démonstration, d'Expérimentation et de Production de références du plan EcoPHYto

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

S : écart-type

SA : acide salicylique

SA : sol adhérent aux racines

SHP1 et 2 : Shatterproof1 et 2 Mads-box genes

SI : index de solubilisation

SMAG : Smart Agriculture

SMDD : Sommet Mondial sur le Développement Durable

TAE : Tris Acetate EDTA

Tet^R : résistance à la tétracycline

TSA : milieu Tryptic Soy Agar

TSB : milieu Tryptic Soy Broth

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

VOCs : Volatile Organic Compound

WT : wilde type

\bar{x} : moyenne

α : risque de première espèce (risque de conclure à une différence qui n'existe pas)

β : risque de deuxième espèce (risque de ne pas déceler une différence qui existe)

Δ : différence vraie

kb : kilo bases

Sommaire

1	Introduction générale.....	17
1.1	Le contexte politique : Ecophyto 2018 et développement durable.....	17
1.2	Le contexte agricole	22
1.2.1	La culture du colza : approche agronomique et agricole	22
1.2.2	Le colza comme modèle d'étude : approche scientifique.....	31
1.3	Le contexte scientifique	33
1.3.1	La rhizosphère : généralités, rôle et siège des dialogues moléculaires	33
1.3.2	L'effet PGPR : généralités, effet directs et indirects	35
2	Matériels et méthodes détaillés.....	43
2.1	M&M 1 : Marquage fluorescent des souches bactériennes	43
2.2	M&M 2 : Inoculation des plantes cultivées in vitro ou dans le sol.....	46
2.3	M&M 3 : Solubilisation bactérienne du phosphate	47
2.4	M&M 4 : Compétition entre souches bactériennes.....	48
2.5	M&M 5 : Effet des souches sur la croissance et la nutrition minérale du colza	48
2.6	M&M 6 : Mesure des paramètres agronomiques d'intérêt sur les plantules de colza.....	49
2.7	M&M 7 : Dosage des éléments minéraux par ICP-AES	51
3	Résultats	55
3.1	Formulation de l'inoculum mixte : choix des souches bactériennes	55
3.1.1	Description des souches bactériennes	55
3.1.2	Sélection des souches bactériennes : essais préliminaires	63
3.1.3	Sélection des trois souches les plus performantes	98
3.2	Effets des souches sélectionnées sur la croissance du colza	100
3.2.1	Effets des souches sur la croissance et la nutrition minérale du colza	100
3.2.2	Suivi de l'inoculum par métabarcoding du gène ADNr 16S	131
3.3	Dialogue moléculaire entre <i>P. brassicacearum</i> et les autres souches testées	141
4	Conclusion et perspectives.....	169
4.1	Sélection des souches bactériennes :.....	169
4.2	Sélection des trois souches les plus performantes :	169
4.3	Test de l'inoculum en co-inoculation en sol agricole non stérilisé	170
4.4	Suivi de l'inoculum par métabarcoding du gène ADNr 16S	171
4.5	Dialogue moléculaire entre <i>P. brassicacearum</i> et les autres souches testées	171
4.6	Conditions suboptimales et notion de facteur limitant	171

5	Bibliographie.....	179
6	Annexes	195
6.1	Annexe 1 : Liste mise à jour des substances dont on envisage la substitution : Journal officiel de l'Union Européenne, règlement d'exécution (UE) 2015/408 de la commission du 11 mars 2015	195
6.2	Annexe 2 : Fiche technique des milieux utilisés.....	195
6.3	Annexe 3 : Dispositif de culture pour les essais en sol agricole non stérile (pots MW).....	196
6.4	Annexe 4 : schémas d'un tube de collecte du sol adhérent.....	197
6.5	Annexe 5 : Analyse pédologique du sol agricole non stérile utilisé	198
6.6	Annexe 6 : Macro-instruction attribuant un numéro aléatoire unique non répétitif de 1 à 8 à chaque modalité afin de leur attribuer une place au sein d'un bloc.	199
6.7	Annexe 7 : Analyse détaillée de l'effet bloc sur les paramètres mesurés.....	199
6.8	Annexe 8 : détail des données obtenues à l'issue de l'analyse des échantillons par métabarcoding du gène ADNr 16S.....	200
7	Index des illustrations.....	209
7.1	Figures	209
7.2	Tableaux	212

1. INTRODUCTION

1 Introduction générale

1.1 Le contexte politique : Ecophyto 2018 et développement durable.

De la notion de développement durable au plan Ecophyto 2018.

Le Club de Rome est un groupe de réflexion indépendant qui regroupe une centaine de personnalités multiculturelles issues des domaines politique, scientifique et financier. Son but est d'identifier les problèmes cruciaux auxquels sera confrontée l'humanité dans l'avenir et de trouver des pistes afin de les résoudre. En 1970, le Club de Rome a mandaté une équipe de l'institut W. Forrester du MIT (Massachusetts Institute of Technology) dirigée par Donnella et Dennis Meadows ainsi que Jorgen Randers pour concevoir un modèle permettant de prédire le devenir de la croissance mondiale du monde. Un certain nombre de scénarios ont pu être établis. Une majorité d'entre eux mettent en évidence une surexploitation des ressources naturelles liées à la croissance économique et démographique internationale, et prédisent un point de rupture situé autour de 2030. Seules des mesures drastiques garantissant la protection de l'environnement et des populations pourraient nous prémunir contre cette décroissance annoncée. C'est en 1971 que ces conclusions ont été consignées dans l'ouvrage : « *Limits of growth* » mis à jour en 2004 par les auteurs.

C'est dans ce contexte qu'en 1972, lors de la conférence des Nations Unies sur l'Environnement humain de Stockholm, a été prise la décision « *d'intégrer l'équité sociale et la prudence écologique dans les modèles de développement économique* » qui a abouti à la création du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) et du Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD).

En 1980, une ONG, l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN), a introduit pour la première fois la notion de « *sustainable development* », en français « *développement durable* ». Cette notion sera reprise en 1987 et définie par Gro Harlem Brundtland, Premier Ministre de Norvège et présidente de la Commission Mondiale sur l'Environnement et le Développement (rattachée à l'Organisation des Nations Unies) dans son rapport « *Our Common Future* » comme un développement qui répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs.

En juin 1992, la dynamique initiée par G. H. Brundtland s'est concrétisée par l'organisation par les Nations Unies du Sommet de la Terre à Rio de Janeiro. Cette conférence a réuni 172 gouvernements décidés à assurer le développement durable de la planète car ils étaient convaincus que l'inaction risquait de coûter bien plus cher que le financement de futures mesures.

Deux programmes ont alors été initiés : « *Action 21* » détaille les actions à entreprendre par domaines d'activité et la « *Déclaration de Rio sur l'Environnement et le Développement* » établit un certain nombre de principes d'actualité dont celui du pollueur – payeur : « *c'est le pollueur qui doit, en principe, assumer le coût de la pollution* », celui de précaution : « *l'absence de certitude scientifique absolue ne doit pas servir de prétexte pour remettre à plus tard l'adoption de mesures urgentes visant à prévenir la dégradation de l'environnement* » et les bases de la prise en compte de l'impact carbone de l'industrie sur l'environnement à l'origine du Protocole de Kyoto de 1997. Ces principes ont été ratifiés par 55 pays responsables de 55% des émissions mesurées en 1990 : « *tous*

les Etats sont tenus de fournir périodiquement des rapports à jour sur les niveaux d'émissions et les mesures prises pour atténuer les changements climatiques ». Ces deux programmes ont été ratifiés par plus de 150 pays.

En 2002, le Sommet Mondial sur le Développement Durable (SMDD), communément appelé sommet de Johannesburg, avait pour vocation de faire le bilan des actions décidées lors du Sommet de 1992. En France, il a jeté les bases du Grenelle de l'Environnement.

Le Grenelle de l'Environnement initié en 2007 par le Président N. Sarkozy et conduit par J. L. Borloo, ministre d'Etat de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement Durables, avait pour vocation d'établir un programme concerté visant à piloter la politique environnementale et le développement durable de la France. En septembre 2009 est publiée la première loi du Grenelle de l'Environnement (Grenelle 1) orientant les politiques à appliquer, par secteur. Les alinéas 7 et 8 jettent les bases du plan Ecophyto 2018 :

- *Alinéa 7, Agriculture : Généraliser les pratiques agricoles plus durables (retrait d'ici à fin 2010 des 40 substances les plus préoccupantes dans les produits phytosanitaires).*
- *Alinéa 8, recherche : L'effort national de recherche privilégiera la compréhension des écosystèmes*

Le plan Ecophyto 2018 : vers une agriculture de pointe : performante et durable.

Piloté par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, le plan Ecophyto 2018 repose sur l'engagement 129 du Grenelle de l'environnement stipulant :

Engagement 129 : Phytosanitaires : retrait, à raison de leur substituabilité, des produits les plus préoccupants : 30 d'ici fin 2008, 10 d'ici fin 2010, et réduction de moitié d'ici fin 2012 des produits pour lesquels il n'existe pas de substitution ; objectif de réduction de moitié des usages des pesticides en accélérant la diffusion des méthodes alternatives et sous réserve de leur mise au point. Lancer dès 2008 un état des lieux de la santé des salariés agricoles et des agriculteurs et un programme de surveillance épidémiologique ; interdiction de l'épandage aérien sauf dérogations

Afin de parvenir à cet objectif, 8 axes de travail ont été proposés :

- *Axe 1 - Évaluer les progrès en matière de diminution de l'usage des pesticides,*
- *Axe 2 - Recenser et généraliser les systèmes agricoles et les moyens connus permettant de réduire l'utilisation des pesticides en mobilisant l'ensemble des partenaires de la recherche, du développement et du transfert,*
- *Axe 3 - Innover dans la conception et la mise au point des itinéraires techniques et des systèmes de cultures économes en pesticides,*
- *Axe 4 - Former à la réduction et à la sécurisation de l'utilisation des pesticides,*
- *Axe 5 - Renforcer les réseaux de surveillance sur les bio-agresseurs et sur les effets non intentionnels de l'utilisation des pesticides,*
- *Axe 6 - Prendre en compte les spécificités des DOM,*
- *Axe 7 - Réduire et sécuriser l'usage des produits phytopharmaceutiques en zone non agricole,*
- *Axe 8 - Organiser le suivi national du plan et sa déclinaison territoriale, et communiquer sur la réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques.*

La première étape a consisté à établir une liste des produits phytosanitaires disponibles sur le marché afin de réévaluer leur redondance ainsi que leur dangerosité (project confié à l'ANSES :

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, liste actuelle en Annexe 1).

Tout l'enjeu de ce plan réside donc en la résolution du paradoxe suivant :

Comment concilier la nécessité de maintenir un niveau de production élevé, dont la qualité satisfasse la demande des consommateurs pour des produits sains, avec une diminution nette de l'usage des produits phytopharmaceutiques dans le but de garantir la santé des professionnels de la filière et des consommateurs, les équilibres écologiques et de préserver la ressource en eau ?

Les moyens mis en place reposent essentiellement sur l'implication des acteurs du secteur agricole à tous les niveaux, du secteur de la recherche et des pouvoirs publics *via* les chambres d'agriculture, des instituts techniques mais aussi des élus locaux. Des outils ont été créés : le « Certificat individuel produits phytopharmaceutiques » (Certiphyto) qui permet la formation des agriculteurs à l'usage responsable des produits phytopharmaceutiques, un programme de contrôle des pulvérisateurs, la mise en ligne de bulletins de santé du végétal informant les agriculteurs de l'activité des parasites et la mutualisation de fermes pilotes au sein du réseau DEPHY (réseau de Démonstration, d'Expérimentation et de Production de références du plan EcoPHYto).

Ce réseau, mis en place en 2009, regroupe environ 2000 exploitations regroupées en sites expérimentaux couvrant les principales filières de production, répartis sur tout le territoire Français (Figure 1.1). Qualifié de pierre angulaire du plan Ecophyto, il met en place une démarche novatrice visant à expérimenter et à valider de nouvelles techniques de cultures plus économes en produits phytopharmaceutiques.

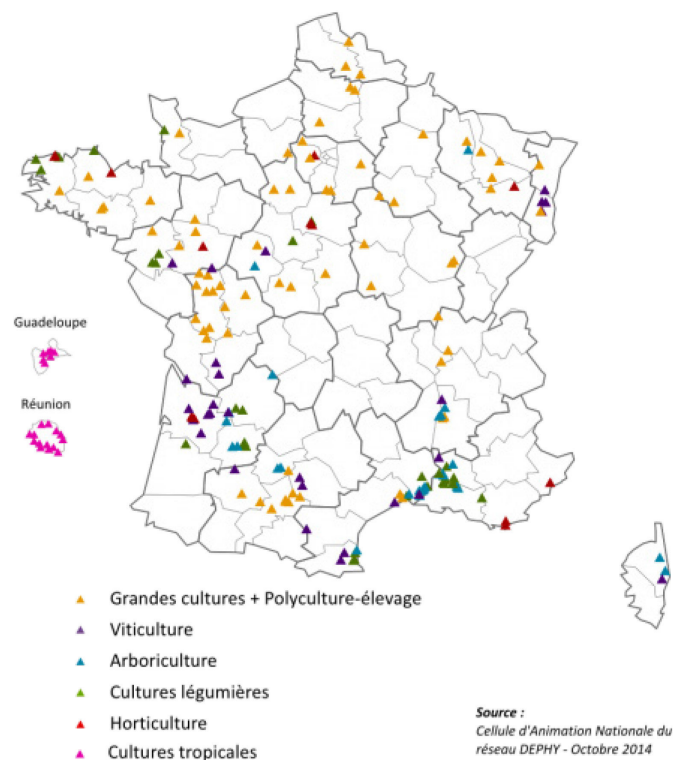


Figure 1.1 : Distribution géographique des sites expérimentaux appartenant au réseau DEPHY distingués selon la filière de production. (Source : agriculture.gouv.fr/DEPHY-EXPE)

InVivo, un acteur engagé dans l'innovation, la performance et la durabilité des pratiques agricoles.

Le groupe InVivo, créé en 2001 est un membre à part entière du réseau DEPHY. Il rassemble 223 coopératives agricoles comptant au total plus de 300 000 agriculteurs membres. Il rassemble désormais près de 8000 collaborateurs dans plus de 28 pays pour un chiffre d'affaire d'environ 5,7 milliards d'euros pour l'exercice 2013-2014. Son activité se segmente principalement en trois domaines de compétence :

- Le Pôle Nutrition et Santé Animale (InVivo NSA)

Acteur mondial de premier plan, InVivo NSA s'implique dans le bien-être et la santé animale par la conception, la fabrication et la distribution d'aliments, d'additifs et de services innovants mis à la disposition des éleveurs.

- Le Pôle Agriculture (InVivo AgroSolutions)

Engagé dans le « *produire plus et mieux* », InVivo AgroSolutions développe et propose des outils, un savoir-faire et des services innovants à l'adresse des agriculteurs afin de leur faciliter l'adoption d'un mode de production performant et durable.

- Le Pôle distribution grand public et agroalimentaire

Bien que la majeure partie de son activité soit tournée vers les professionnels, InVivo s'adresse aussi aux particuliers via des enseignes de proximité spécialisées dans la jardinerie (Gamm Vert et Delbard), dans la distribution de denrées de production locale sous l'enseigne « *Frais d'ici* » et enfin dans la nutrition et le soin des animaux domestiques via l'enseigne « *Néodis* ».

L'action d'InVivo s'intègre au plan Ecophyto 2018 dans le développement de pratiques culturales innovantes afin de limiter l'usage des produits phytopharmaceutiques. InVivo développe des outils pour améliorer l'efficacité des techniques de culture : le programme « *Bigdata* » vise à appliquer dans les exploitations adhérentes des techniques et des outils permettant de générer le plus possible de données sur une vingtaine d'indicateurs économiques et agronomiques (météo, humidité du sol, stade de développement des cultures, attaques des parasites, rendement, types et quantité d'intrants, cours des produits, etc.) et de les centraliser. Via la société « *SMAG* » (pour Smart Agriculture), InVivo analyse ces données et développe des logiciels de gestion de données agronomiques (« *agreo* » et « *atland* »). Ces logiciels sont proposés à plus de 30 000 utilisateurs membres répartis dans une dizaine de pays comme outils d'aide à la décision dans le but de développer une agriculture de précision sur plus de 3,5 millions d'hectares.

Selon les estimations, les produits de biocontrôle devraient atteindre 8,5 % du marché mondial de la protection des plantes en 2020. InVivo a déjà développé son savoir-faire dans ce domaine via sa filiale « *Biotop* » spécialisée dans la protection biologique intégrée à l'aide de macroorganismes auxiliaires des cultures. Le programme « *B-Motived* » (Biocontrôle : Mobilisation du réseau de coopératives pour l'expérimentation et la diffusion des produits de biocontrôle) vise à approfondir cette thématique, en expérimentant de nouvelles techniques apportant des solutions complémentaires à la lutte contre les plantes adventives, les ravageurs et les pathogènes, et en répertoriant les freins à l'utilisation des produits de biocontrôle par les agriculteurs.

Enfin, sur les 2000 exploitations que compte le réseau DEPHY, 290 dépendent de 34 coopératives agricoles membres d'InVivo AgroSolutions. Cela représente près de 35 000 hectares de cultures

intégrés dans le programme de collecte de données à la parcelle et un millier d'essais par an réalisés sur les plantes de grandes cultures. En 2012, un bilan réalisé dans 99 de ces exploitations a pu témoigner des progrès réalisés. Cette démarche d'agriculture de pointe a permis d'obtenir un rendement mesuré à 103 % de la référence nationale, une rentabilité à 112 % de la référence de marge brute, un usage de pesticides limité à 74 % de la référence IFT (indicateur de fréquence de traitement phytosanitaires, fixé par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) et une limitation de l'émission de gaz à effet de serre à 86 % de la référence GES (année précédente ou pénultième à l'année mesurée).

1.2 Le contexte agricole

1.2.1 La culture du colza : approche agronomique et agricole

Le colza, une plante multi-usage à l'histoire mouvementée (d'après Doré & Varoquaux, 2006)

Un hybride (presque) naturel

Le colza (*Brassica napus* subsp. *napus*) est une plante dicotylédone appartenant à la famille des *Brassicaceae* présente dans la littérature depuis le Moyen-Âge mais probablement réellement cultivée en Europe depuis le XV^{ème} siècle. Initialement décrite dans la région des Flandres, elle présente la particularité d'être issue du croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea*), et la navette (*Brassica rapa* subsp. *oleifera*). Ces deux espèces étaient habituellement cultivées côte à côte dans les potagers, le chou pour la consommation humaine et la navette pour l'huile contenue dans ses graines et utilisée essentiellement comme huile d'éclairage. Cet hybride naturel dû à une filiation par croisement a été confirmé notamment par les travaux d'A. Sageret en 1826 puis, plus tard, par d'autres travaux portant sur le séquençage des génomes mitochondriaux et chloroplastiques. L'association du génome diploïde du chou à 18 chromosomes (notés « CC ») à celui de la navette diploïde à 20 chromosomes (notés « AA ») fait du colza une espèce dite amphiploïde portant les deux génomes diploïdes à $2n = 38$ chromosomes (noté AACC) (Figure 1.2).

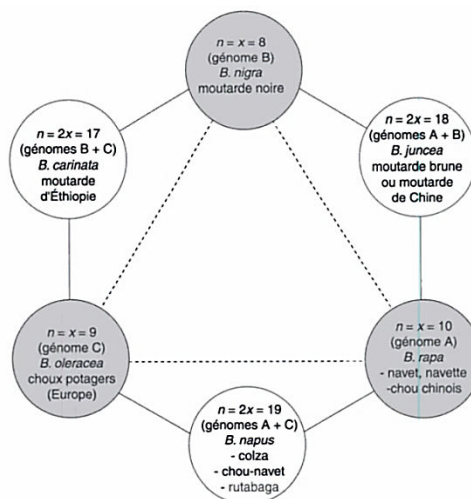


Figure 1.2 : (d'après Doré et Varoquaux, 2006) : Diagramme de « U » (1935) représentant la théorie de Woo Jang-choon (dit « Nagaharu U ») selon laquelle les espèces *B. carinata*, *B. juncea* et *B. napus* sont issues du croisement naturel de *B. nigra*, *B. rapa* et *B. oleracea*.

Le colza, un enjeu stratégique

La culture du colza en France est intimement liée au contexte politique et économique du moment. En 1862, la surface de culture du colza est estimée à environ 200 000 ha puis, suite aux accords commerciaux avec l'Afrique Occidentale Française (notamment le Sénégal) et la Tunisie, l'importation d'huile d'arachide et d'olive ont réduit progressivement sa culture en France (seulement 11 000 ha en 1939). Suite à la pénurie en corps gras liée à la seconde guerre mondiale (Figure 1.3) et à l'indépendance du Sénégal, le développement de la culture des plantes oléagineuses est devenu un enjeu stratégique pour la France dès 1960.



Henry Koerner, 1943



Walter Richards, 1943



Inconnu, 1943

Figure 1.3 : Affiches de propagande diffusées par le gouvernement des Etats-Unis en 1943 visant à collecter les corps gras domestiques pour pallier à la pénurie liée à la Seconde Guerre Mondiale.

Le colza fut alors préféré aux autres plantes oléagineuses en raison de sa bonne adaptation au climat tempéré de la France et de sa productivité élevée et ce, en dépit d'un fond génétique restreint en raison de son histoire agricole récente.

Le colza, une plante à tout faire

L'essor de la culture du colza est principalement lié à son utilisation dans trois grands domaines :

- L'industrie : l'huile extraite de la graine de colza a tout d'abord été utilisée pour l'éclairage. En vertu de sa composition, elle sert désormais de matière première dans la fabrication de lubrifiants, de matières plastiques et de carburants comme le diester. Le diester est un ester méthylique d'huiles végétales généré en parallèle de la glycérine par la réaction du méthanol sur de l'huile végétale. Le diester est alors utilisé comme additif au gazole jusqu'à 30 % (7,7 % dans le gazole public par décision du gouvernement français au 1^{er} janvier 2014) et la glycérine valorisée par les industries agroalimentaires et cosmétiques.
- La nutrition humaine : la pression des graines produit une huile dont la qualité et la composition sont adaptées à la nutrition humaine.
- La nutrition animale : une fois l'huile extraite de la graine, la fraction restante est agglomérée et entre dans l'alimentation animale sous une forme appelée « tourteaux ». Une utilisation marginale du colza sous forme de plante fourragère est également à noter.

En outre, il apparaît que le colza, cultivé dans une rotation, stimule le rendement du blé d'environ 10 %, (succession colza-blé), limite les besoins en désherbage et en produits phytopharmaceutiques des parcelles de blé et, de par la longueur de son cycle de culture, il rompt le cycle de vie des maladies des céréales (GNIS-pédagogie, 2015¹)

Malgré le souhait formulé par la France d'intensifier sa culture et son intérêt économique, deux obstacles majeurs se sont dressés contre la généralisation de son usage. Dès 1955, des publications mettent en évidence la présence d'effets indésirables liés à l'absorption d'huile de colza chez le rat.

¹ <http://www.gnis-pedagogie.org/colza-culture-pratique-culturale.html>

Les auteurs imputent ces effets à l'acide érucique (autrement appelée acide 13-docosénoïque ou acide brassidique) présent de 40 % à 50 % dans l'huile de colza (Thomasson et Boldingh, 1955 et Beare *et al.*, 1959). Par la suite, en 1968, Rocquelin et Cluzan ont poursuivi les recherches et ont démontré que l'acide érucique à forte dose provoque chez le rat des lésions cardiaques, une accumulation anormale de graisse et un retard de croissance. Bien que ces effets n'aient jamais été démontrés sur l'Homme, ces conclusions ont causées un grand trouble en France et au Canada et l'image de l'huile de colza en a été sérieusement entachée (Bonneuil et Thomas, 2009) à tel point qu'en mars 1971, le Conseil supérieur d'hygiène publique (comité d'experts auprès du ministère de la Santé) demande de « limiter autant que possible l'emploi du colza en alimentation [...et] la culture du colza ». En réponse à cette crise, le 20 juillet 1972, une directive du conseil des Communautés Européennes (76/621/CEE) limite à 10 % le taux maximal d'acide érucique pour les huiles et graisses destinées à l'alimentation animale.

En outre, des études menées sur le bétail recevant des tourteaux de colza comme aliment principal ont pu mettre en évidence un effet indésirable des glucosinolates (Josefsson et munck, 1972) sur la thyroïde des animaux monogastriques et une diminution de l'appétence pour les ruminants (Papas *et al.*, 1979). Ces molécules, habituellement présentes à environ 100 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de graine, sont des métabolites secondaires soufrés, caractéristiques des Brassicacées qui, hydrolysées en réponse à une agression, agissent comme des molécules de défenses contre les ravageurs (Ishida *et al.*, 2014). Ainsi deux des usages principaux du colza (huiles et tourteaux) se sont révélés inappropriés, nécessitant la sélection de variétés compatibles avec son utilisation en alimentation humaine et animale.

La sélection au secours du colza pour diminuer sa teneur en acide érucique et en glucosinolates

La sélection du colza débute au XXème siècle. Comme il s'agit d'une espèce créée par l'homme, son histoire est récente et son patrimoine génétique assez restreint. L'objectif initial a donc été de créer des variétés populations. Il s'agit de variétés hétérogènes d'un point de vue génétique mais dont les caractères agronomiques présentent une certaine homogénéité d'apparence. De telles variétés possèdent un potentiel génétique qui lui permettra de s'adapter en continu aux variations pédoclimatiques par sélection naturelle dans un premier temps. Dans un second temps, l'agriculteur, ayant acquis cette variété, pourra sectionner les individus les plus adaptés à son contexte agricole et les multiplier (Mollier, 2014).

Dès les années 1970, des variétés dites « zéro » apportant une solution au problème de l'acide érucique ont pu être mises au point. La variété « Primor » obtenue par l'Inra en 1973 est la première variété française dite « non érucique ». Cependant son faible rendement et sa grande sensibilité à *Phoma lingam* entraînent un échec commercial. *Phoma lingam* (ou *Leptosphaeria maculans*) est la maladie du colza la plus nuisible, elle provoque la nécrose du collet entraînant la verse et les pertes de rendement peuvent dépasser 1,5 tonnes par hectare) En revanche, cette variété s'est rendue indispensable en sélection. Il a fallu attendre 1977 avec l'arrivée de la variété « Jet-Neuf » obtenue par Ringot (France) avec l'aide de l'Inra pour offrir aux agriculteurs un produit viable qui sauvera la filière colza et dominera rapidement le marché européen (80 % en 1985).

En 1984, apparaît la variété « Darmor » (Inra), première variété dite « double zéro » sans acide érucique et à faible taux de glucosinolates. Puis en 1989 apparaît la variété « Samurai » (Inra-SERASEM, France), première variété « double zéro » intégrant la résistance à *Phoma lingam* a être commercialisée. Ce travail de sélection est réalisé en parallèle au Canada où apparaît dès 1974 la

première variété « *Tower* » de Canola (« *Can* » pour Canada + « *ola* » pour huile) qui contient moins de 2% d'acide érucique et moins de 30 $\mu\text{mole.g}^{-1}$ de graine de glucosinolates.

La sélection au secours du colza pour créer des variétés résistantes aux pathogènes

Le colza est sensible à différentes maladies dont la gravité est variable. Si certaines peuvent être contrôlées à l'aide de produits phytopharmaceutiques, le développement de variétés résistantes aux agents pathogènes représente un réel enjeu commercial comme nous avons pu le voir précédemment avec le développement de variétés résistantes à *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). En dehors de ce dernier, le colza est menacé par d'autres agents pathogènes, par ordre d'importance : (Sources Terres Innovia² et Bretagne synagri³).

- *Sclerotinia sclerotiorum* à l'origine de la sclérotiniose du colza, une maladie très nuisible pouvant causer des pertes de rendement pouvant dépasser 1 tonne par hectare. Il n'existe pas, à ce jour, de variété résistante, seul un traitement fongicide prophylactique en limite la sévérité.
- *Plasmodiophora brassicae*, responsable de la hernie des crucifères, une maladie très impactante pouvant causer des pertes de rendement pouvant dépasser les 1,5 tonne par hectare et pour laquelle il n'existe aucun traitement phytopharmaceutique dédié. En revanche, il existe des variétés très tolérantes.
- *Mycosphaerella brassicicola*, agent de la maladie des taches noires, de nuisibilité moyenne entraînant des pertes ne dépassant pas les 0,8 tonne par hectare mais pour laquelle il n'existe aucun traitement phytopharmaceutique dédié et aucune résistance variétale.
- *Cylindrosporium concentricum*, agent de la cylindrosporiose, maladie de nuisibilité moyenne entraînant des pertes ne dépassant pas les 0,6 tonne par hectare pour laquelle il existe des variétés peu sensibles.
- *Pseudocercospora capsellae*, agent de la pseudocercosporiose, maladie de nuisibilité moyenne entraînant des pertes ne dépassant pas les 0,6 tonne par hectare et pour laquelle un traitement anti-sclérotinia permet de limiter les symptômes sur siliques.
- *Erysiphe cruciferarum*, agent de l'oïdium du colza, maladie de nuisibilité moyenne entraînant des pertes ne dépassant pas les 0,5 tonne par hectare. Il existe des traitements chimiques fongicides non spécifiques disponibles.
- *Alternaria brassicae*, agent de la fonte des semis du colza, maladie de nuisibilité moyenne entraînant des pertes ne dépassant pas les 0,5 tonne par hectare. Des traitements chimiques sont disponibles pour limiter les symptômes sur siliques. Il n'existe pas de variété résistante.

² www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/maladies/

³ [www.bretagne.synagri.com/ca1/PJ.nsf/ATWEB0101/4E645F28A03BC500C1257C08003317D3/\\$FILE/Guide-reconnaissance-principales-maladies-des-Cultures-en-Bretagne2012.pdf](http://www.bretagne.synagri.com/ca1/PJ.nsf/ATWEB0101/4E645F28A03BC500C1257C08003317D3/$FILE/Guide-reconnaissance-principales-maladies-des-Cultures-en-Bretagne2012.pdf)

La sélection au secours du colza pour améliorer les caractéristiques agronomiques

Un important travail de sélection a également porté sur le rendement et la modification de la composition de l'huile extraite de la graine pour notamment diminuer l'odeur de « friture » liée à la forte part d'acide α -linoléique (env. 10 %) mais aussi augmenter l'acide érucique pour l'industrie (détergents) ou augmenter la concentration en oléine (hypocholestérolémiant).

Le développement d'outils génétiques pour faciliter la sélection

Un travail de sélection a été réalisé sur le colza afin d'obtenir des lignées pures homozygotes dites « parentales ». Ces lignées, peu intéressantes pour leur rendement agronomique, possèdent un fond génétique très riche regroupant de nombreux caractères d'intérêt. Ces lignées servent de « donneur » en transmettant leur richesse génétique à une descendance dite « hybride ». L'éloignement génétique initial des lignées parentales peut conférer à leur descendance un effet « d'hétérosis » ou « vigueur hybride » dont la valeur agronomique est supérieure à la moyenne ou au plus fort des deux parents. Le premier colza hybride date de 1999. Pour cela il a été nécessaire de conférer au colza le caractère de stérilité mâle cytoplasmique et la capacité de restaurer la fertilité nécessaire à l'obtention de lignées pures. Les semences hybrides sont désormais majoritairement utilisées en raison de leur rendement supérieur (Figure 1.4).

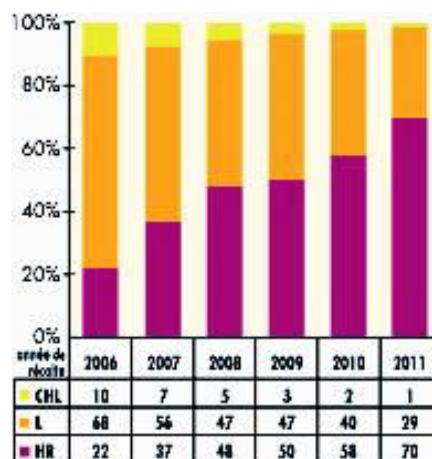


Figure 1.4 : Évolution de la part de semences des associations variétales lignées hybrides (CHL), des lignées pures (L) et des lignées hybrides restaurés (HR) utilisées en France entre 2006 et 2011 (d'après Coudurier *et al*, 2013).

La sélection pour augmenter la productivité

L'acquisition d'un caractère d'intérêt s'accompagne généralement d'une chute du rendement car l'introgession d'un caractère se fait généralement au détriment de la diversité de l'individu de départ (Figure 1.5).

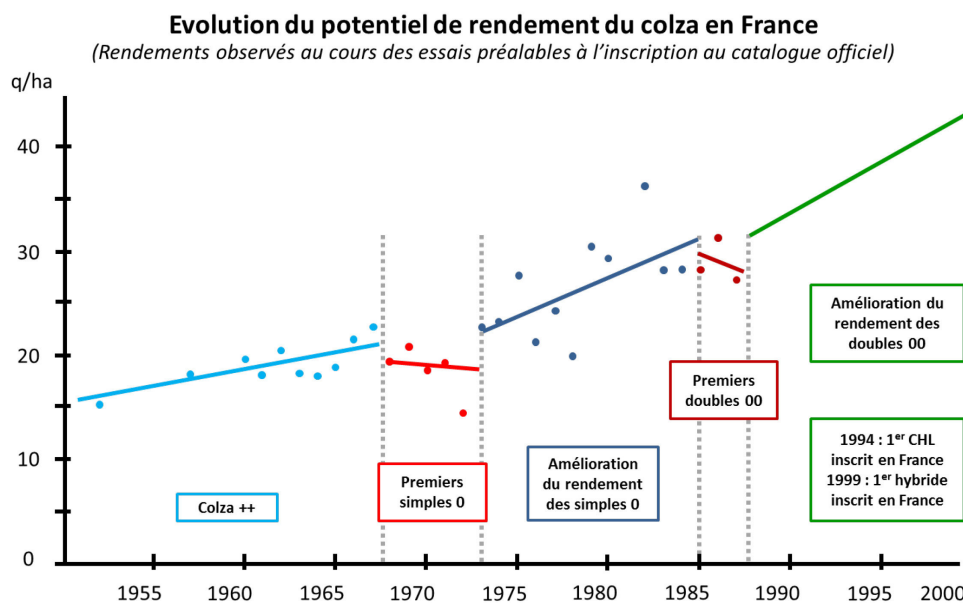


Figure 1.5 : Évolution du potentiel de rendement du colza avant son inscription au catalogue officiel entre 1955 et 2000 (d'après Coudurier *et al*, 2013).

Le travail de sélection repose essentiellement sur l'établissement d'un compromis entre le rendement, la résistance aux agents pathogènes et aux ravageurs, les besoins en intrants, la facilité de culture (les hybrides étant généralement « meilleurs » que les lignées pures) et les caractéristiques du produit fini (ici teneur en huile, composition en huile, richesse en protéine, etc.) De plus, du fait de la durée d'obtention d'une nouvelle variété, la sélection doit intégrer dans son programme les enjeux de demain. Actuellement, développer la tolérance aux herbicides, développer une résistance aux agents pathogènes tels que *Sclerotinia*, diminuer la dépendance vis-à-vis des intrants, modifier la composition de l'huile pour s'adapter à l'alimentation humaine et animale ainsi qu'aux besoins de l'industrie et du secteur des énergies font partie des principaux enjeux stratégiques.

Le colza en France et dans le monde à travers quelques chiffres

(Source FAOSTAT : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture – Division Statistique⁴).

La France est le cinquième pays producteur de colza en termes de volume avec 4,3 millions de tonnes récoltées en 2013 (Figure 1.6), en progression constante avec 5,5 millions de tonnes récoltées en 2014 (Source Agreste, statistique agricole annuelle, juillet 2015⁵).

⁴ faostat3.fao.org/browse/Q/QC/F

⁵ agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/saa2015T2bspca.pdf

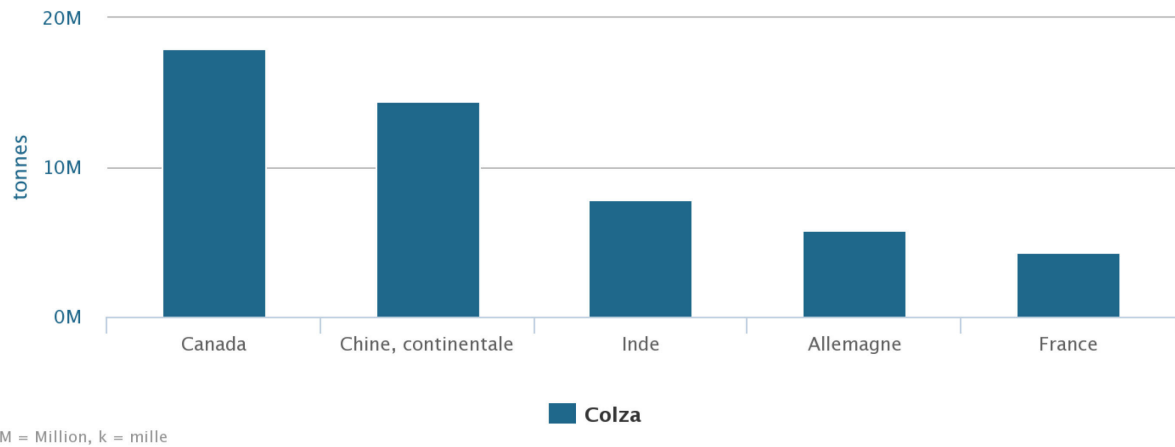


Figure 1.6 : Classement des pays producteurs de colza dans le monde en 2013, France (4,3.10⁶ tonnes).

Le colza représente la septième production agricole française (Figure 1.7) mais la première production oléagineuse devant le tournesol (1,5 million de tonnes).

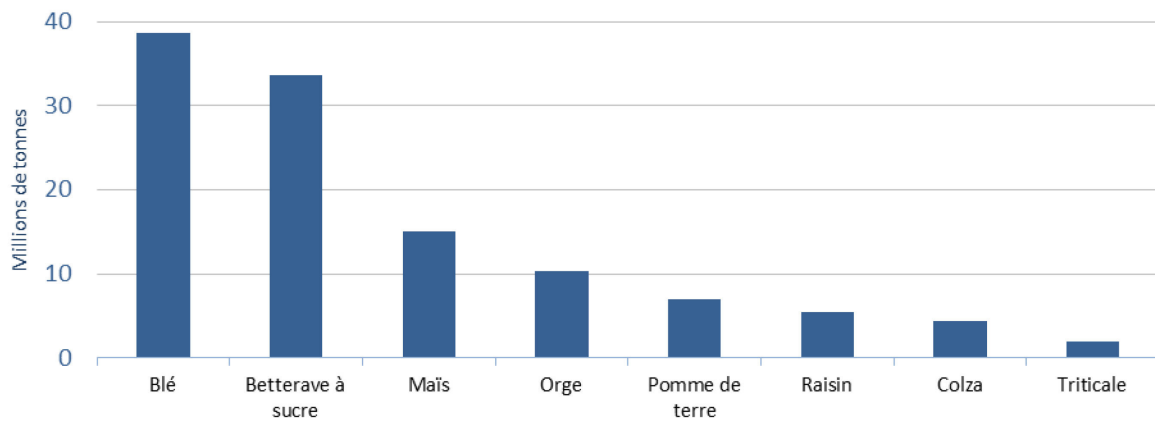


Figure 1.7 : Principales productions agricoles en France en 2013

L'assolement du colza est essentiellement concentré dans la partie Nord de la France (Figure 1.8) et il est estimé à 1,4 million d'hectares en 2013, soit deux fois plus que le tournesol (0,7 million d'hectares) (Pouch, 2014⁶).

⁶ www.chambres-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/Revue/Article/Revue_1032/1032_economie.pdf

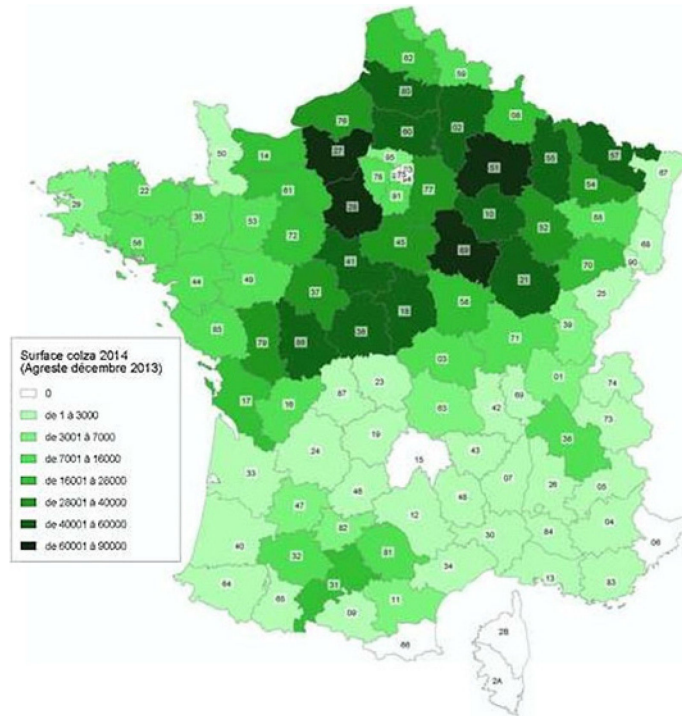


Figure 1.8 : Carte d'assolement des cultures de colza en France en 2013. (D'après Carpentier, M, 2013. à Terre-net Média).

Comme nous avons pu en discuter précédemment, le rendement du colza est rendu fluctuant non seulement en raison des conditions de mise en culture, de la pression des agents pathogènes et des ravageurs mais aussi par le travail de sélection qui améliore en permanence le produit. A l'heure actuelle, les progrès réalisés ont permis de doubler le rendement depuis la décision prise par la France en 1960 de promouvoir la culture du colza (Figure 1.9).

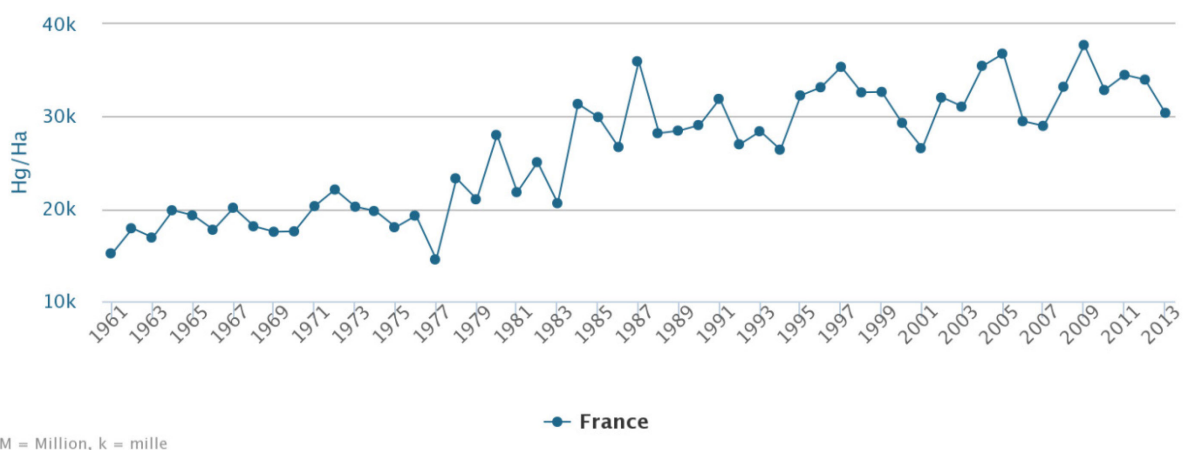


Figure 1.9 : Évolution du rendement de la production de colza en France en hectogrammes par hectare entre 1961 (1,5 t/ha) et 2013 (3 t/ha).

Dans le monde, la culture de colza est en progression constante. A tel point que la production a été multipliée par vingt depuis 1961 (Figure 1.10).

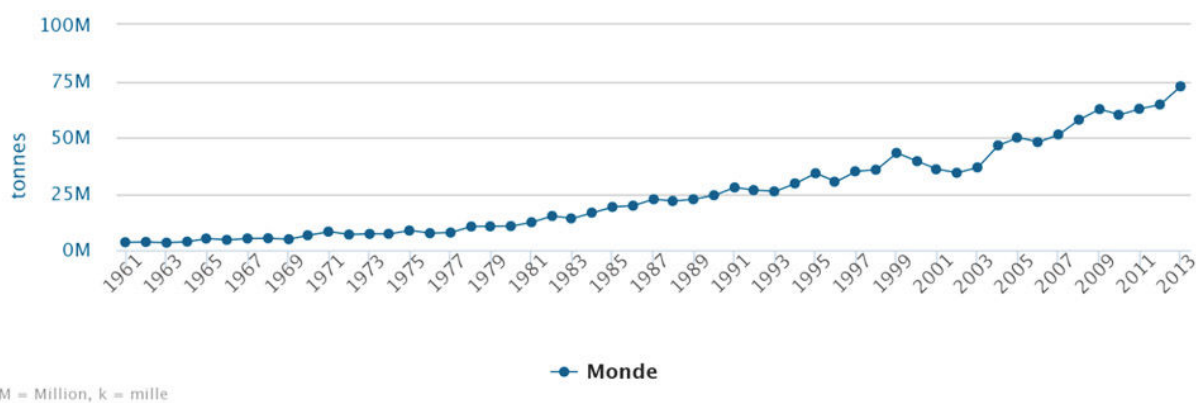


Figure 1.10 : Évolution de la production mondiale de colza en million de tonnes entre 1961 (3,5.10⁶ tonnes) et 2013 (72,6.10⁶ tonnes).

En 2013, le colza occupait la deuxième place derrière le soja en termes de culture oléagineuse (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Principales productions en tonnes dans le monde en 2013 (Sources : FAOSTAT).

Céréales		Oléagineux		Autre cultures d'importance		Huile	
Mais	1000.10 ⁶	Soja	276.10 ⁶	Canne à sucre	1900.10 ⁶	Palme	54.10 ⁶
Riz (paddy)	740.10 ⁶	Colza	72.10 ⁶	Pomme de terre	376.10 ⁶	Soja	42.10 ⁶
Blé	715.10 ⁶	Arachide	45.10 ⁶	Légumes frais	280.10 ⁶	Colza	24.10 ⁶
Orge	143.10 ⁶	Tournesol	44.10 ⁶	Manioc	276.10 ⁶	Tournesol	12.10 ⁶
Sorgho	62.10 ⁶	Coton	24.10 ⁶	Betterave à sucre	246.10 ⁶	Palmiste	6.10 ⁶

Davantage cultivé dans l'hémisphère nord, comme nous l'avons vu précédemment, le Canada est le plus grand pays producteur de colza (Figure 1.6) d'où l'importance de son travail de sélection et de création variétale. Bien que l'Europe domine encore la production mondiale en 2013 (35 %), elle est talonnée de près par l'Asie (32 %) (Figure 1.11).

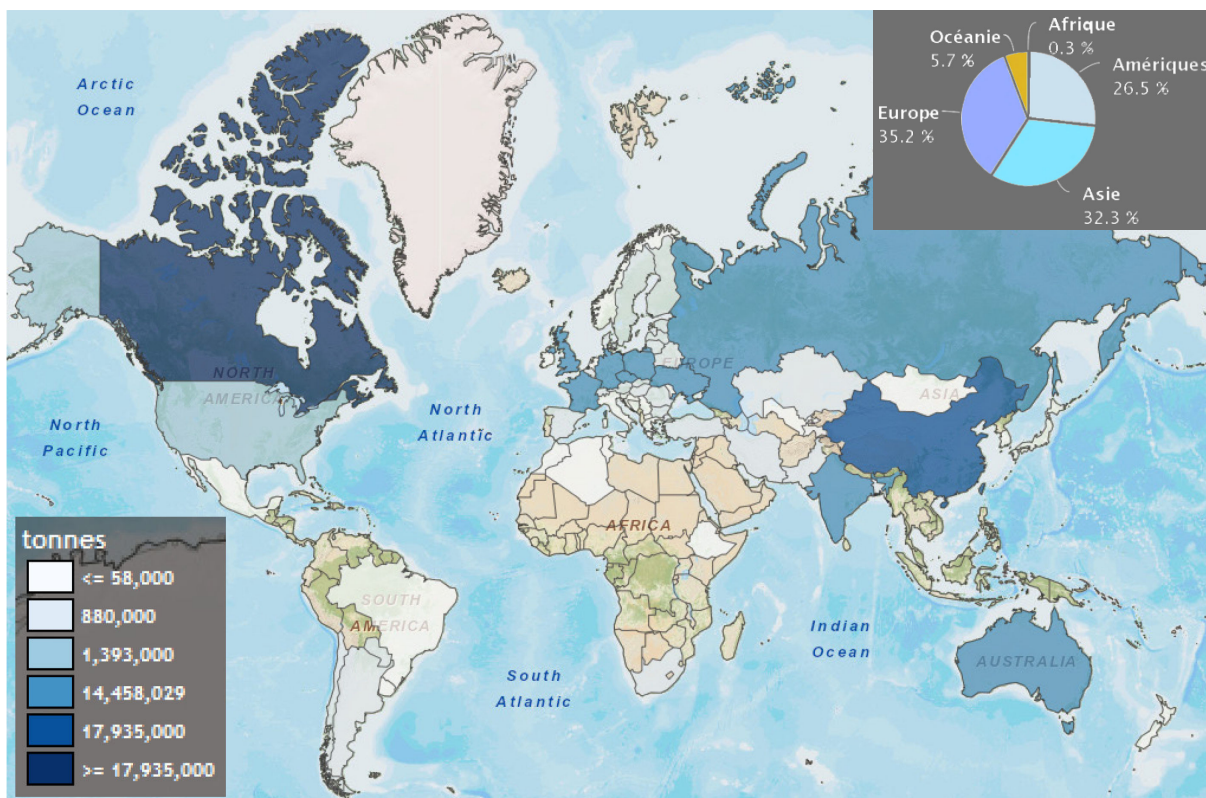


Figure 1.11 : Répartition géographique de la production de colza dans le monde en 2013 (D'après FAOSTAT, 2015).

Témoignage de l'importance du travail de sélection et de l'évolution des pratiques culturales, le rendement moyen dans le monde, légèrement inférieur à celui constaté en France, atteint tout de même les 20 tonnes par hectare en 2013, soit près de quatre fois celui de 1961 (Figure 1.12).

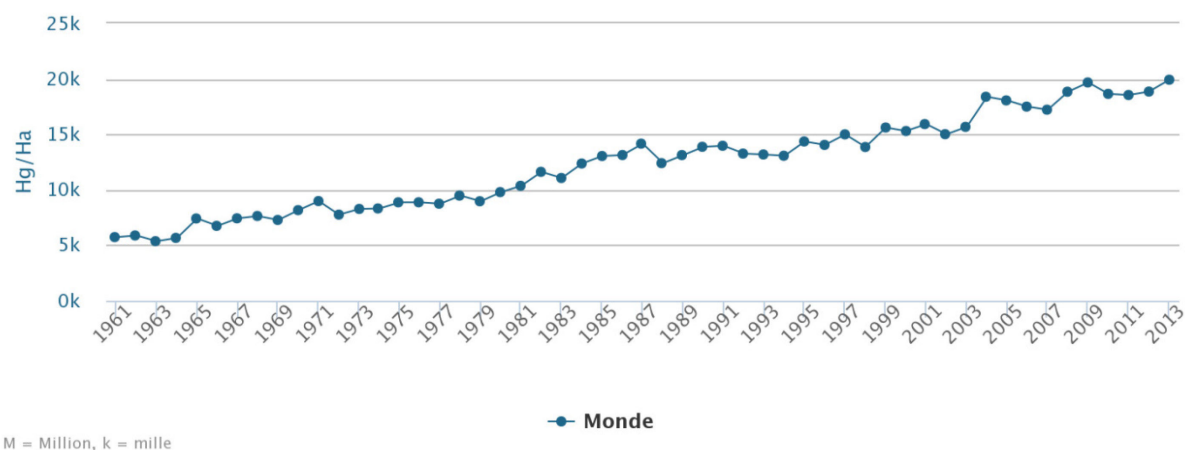


Figure 1.12 : Évolution du rendement de la production de colza dans le monde en hectogrammes par hectare entre 1961 (0,5 t/ha) et 2013 (20 t/ha).

1.2.2 Le colza comme modèle d'étude : approche scientifique

Le colza appartient à la famille des *Brassicaceae* tout comme *Arabidopsis thaliana*, la plante de référence choisie pour les études de génétique végétale. De ce fait, on peut s'attendre à retrouver de nombreux gènes homologues ainsi que d'importantes zones du génome présentant une forte

analogie de structure (on parle alors de colinéarité de génomes). Ces structures conservées, dont le principe illustré en 1989 par J. H. Nadeau entre l'Homme et la souris (Figure 1.13), permettent d'envisager de transférer (avec prudence) des connaissances acquises sur *Arabidopsis thaliana* au colza par extension de la notion de synténie.

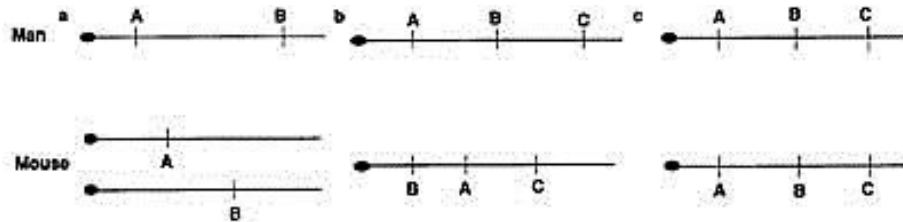


Figure 1.13 : (a) Homology segment : chromosome segment marked by at least one gene that has been mapped in two or more species. (b) synteny conservation : two or more pairs of homologous genes on the same chromosome in two or more species ; the markers need not occur in the same order. (c) linkage conservation : conservation not only of synteny but also of gene order. (D'après Nadeau, 1989)

La synténie, initialement décrite par Renwick en 1971, qualifiait initialement des loci de gènes portés par un même chromosome. Plus récemment et par abus de langage, la définition de ce terme inclut des loci génétiques analogues de structure ou de fonction dérivant d'un même ancêtre, retrouvés chez différents organismes phylogénétiquement proches. Il s'agit là visiblement d'un emploi impropre du terme synténie, le qualificatif approprié pour désigner ces loci étant « paralogue » (Passarge *et al.*, 1999).

Ce degré de colinéarité entre *A. thaliana* et *B. napus* est important à tel point qu'il a pu être démontré que jusqu'à 8 Mb du chromosome 5 d'*A. thaliana* ont pu être retrouvés fortement conservés, répliqués en 6 copies au sein du génome de *B. napus* (Parkin *et al.*, 2002). Un exemple de l'application du principe de synténie entre le colza et *Arabidopsis thaliana* : le contrôle de la déhiscence des siliques du colza. Une maturation prématurée des siliques du colza peut entraîner des pertes importantes estimées en moyenne à 20 % de la récolte (Job, 2002). Des travaux menés par Liljegren *et al.*, (2000) ont permis de faire le lien entre déhiscence des siliques et l'activité des gènes SHP1 et SHP2 (pour Shatterproof1 et 2 Mads-box genes) chez *A. thaliana*. À partir de ces données, Jaradat *et al.* (2014) ont pu retrouver des gènes homologues chez d'autres espèces de *Brassicaceae* comme *Brassica juncea* (moutarde brune) et *B. napus* (colza), ainsi que d'autres gènes liés au phénomène de déhiscence prématuré des siliques. Cet exemple illustre le transfert de connaissances entre l'espèce modèle *A. thaliana* à des plantes d'intérêt agronomique permettant de développer des marqueurs qui seront valorisés par leur intégration aux programmes de sélection et d'amélioration des plantes agronomiques. On parle alors de recherche translationnelle.

1.3 Le contexte scientifique

1.3.1 La rhizosphère : généralités, rôle et siège des dialogues moléculaires

La plante, immobile mais pas démunie

Les plantes, de par leur nature immobile, sont confrontées à des contraintes multiples dont l'équilibre forme un écosystème auquel elles doivent en permanence s'adapter. Ces différentes contraintes génèrent ou pas un stress pour la plante. L'état de stress a été défini sur le rat par H. Selye en 1936 comme étant un effort généralisé de l'organisme pour s'adapter à de nouvelles conditions. Cette définition a été étendue en 1987 au règne végétal par C. B. Osmond en désignant sous le terme « stress » un facteur diminuant la croissance de la plante et sa capacité à se reproduire par rapport au potentiel permis par son génotype.

On peut séparer arbitrairement les causes de cet état de stress en deux composantes principales. Une composante biotique liée à l'activité des êtres vivants dans l'écosystème de la plante (animaux, insectes ravageurs, microorganismes pathogènes, etc.) et une composante abiotique liée à l'application des contraintes environnementales sur son développement (lumière, disponibilité de l'eau et des nutriments, température, salinité etc.). À ces deux principales composantes peut s'ajouter une composante intermédiaire, dite anthropogénique, liée à l'activité directe de l'homme sur la plante ou indirecte de par son action sur son environnement (intrants chimiques, pollution etc.) (Lichtenthaler, 1998).

Pour s'adapter à son environnement, la plante dispose de moyens de réponse basés sur sa capacité à percevoir ces stress. Pour cela, il existe chez la plante tout un arsenal de mécanismes de défense issus d'une immunité dite « innée ». Grâce à cela, les plantes résistent à la plupart des agressions et ne développent que rarement des symptômes sévères de maladies (Jones et Dangl, 2006). Les plantes possèdent deux niveaux de défense : le premier niveau de défense est constitué par les barrières constitutives de nature physique (cires, cuticule et paroi pectocellulosique, etc.) et chimiques (inhibiteurs d'enzymes, composés antimicrobien etc.) (Klarzynski et Fritig, 2001). La seule action de ce premier niveau défensif suffit généralement à contrecarrer la plupart des attaques.

Il arrive cependant que des agents pathogènes prolifèrent au contact de la plante. En ce cas, un deuxième niveau de défense est alors activé par la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante. Il s'agit là d'une étape critique conditionnant l'aptitude de la plante à se défendre efficacement. Cette reconnaissance est basée sur la détection d'éliciteurs généraux ou spécifiques à l'aide de récepteurs membranaires ou cytoplasmiques. Les éliciteurs sont des molécules induisant les défenses des plantes par reconnaissance de motifs spécifiques ou peu spécifiques des agents pathogènes (Klarzynski et Fritig, 2001). Cette interaction active des voies de transduction du signal qui, via des modifications de la balance hormonale (acide salicylique, acide jasmonique, éthylène, etc.), aboutissent à des modifications métaboliques permettant la défense de la plante (localement ou de façon systémique, immédiate ou potentialisée) (Dangl et Jones, 2001, Nimchuk *et al.*, 2003, Vallad et Goodman, 2004, Jones et Dangl, 2006, Pieterse *et al.*, 2009).

En plus de ces mécanismes d'adaptation à son environnement, la plante peut disposer de certains atouts résidants dans sa capacité à stimuler certains organismes auxiliaires dans sa rhizosphère.

La rhizosphère, vers un environnement favorable à la plante

La rhizosphère est un terme donné en 1904 par L. Hiltner et généralisé par T.S. Walker en 2003 pour définir la fraction du sol immédiatement influencée physiquement, chimiquement et biologiquement par les racines vivantes des plantes.

Les végétaux sont à la base de la chaîne alimentaire de par leur capacité à créer des molécules organiques à partir de minéraux et de gaz. Une grande partie de ces molécules organiques (15 à 20 % du carbone organique issu de la photosynthèse) est exsudée par la plante, disponible pour les microorganismes présents dans sa rhizosphère (bactéries, champignons et protozoaires pour l'essentiel). Ces photosynthétats dont la nature évolue selon le stade phénologique de la plante sont mis à la disposition des microorganismes sous forme d'exsudats et ont une très forte influence sur la structure du microbiote du sol rhizosphérique (Bertrand *et al.*, 2011).

Le terme « exsudats » regroupe l'ensemble des composés organiques de faible masse moléculaire libérés par transport passif, alors que les rhizodépôts regroupent les molécules sécrétées via un transport actif hors des cellules racinaires, les lysats les composés cellulaires relargués par la lyse des cellules de l'épiderme, du cortex ou de la coiffe racinaire et enfin le mucigel (mélange de polysaccharides) produit à l'apex des racines. La nature de ces composés libérés dans le sol est très diverse et regroupe majoritairement des acides aminés, des acides organiques, des sucres, des acides gras, des dérivés d'acides nucléiques, de la cellulose, des vitamines, des facteurs de croissance, des phytohormones, des protéines enzymatiques, des toxines, des signaux chimiques, des ions, des gaz, etc. (Bertrand *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces molécules libérées dans le sol autour des racines contribue directement et indirectement (*via* l'activité des microorganismes rhizosphériques) à créer un milieu hydraté, tamponné, à la porosité modifiée, riche en signaux chimiques et nutriments, propice à stimuler ou à réprimer la croissance des microorganismes présents au voisinage des racines, mais aussi exerçant un pouvoir attractif par chimiotactisme. On estime la densité du microbiote bactérien entre 10^8 et 10^9 bactéries par gramme de sol et à plus d'une centaine de centimètres de filaments fongiques par cm^2 de surface racinaire (dont l'étendue est estimée entre 100 et 200 centimètres par cm^3 de sol exploré) (Bertrand *et al.*, 2011).

De façon générale, l'exsudation racinaire se traduit par une prolifération sélective des microorganismes, tendant ainsi à modifier la diversité microbienne rhizosphérique. Les mécanismes de défenses intrinsèques de la plante ainsi que la mise à la disposition des microorganismes rhizosphériques des composés nutritifs et antimicrobiens conférant à sa rhizosphère la capacité de contre-sélectionner directement certaines espèces microbiennes lui permettant ainsi de se protéger contre certains agents pathogènes. De par la structuration de sa rhizosphère la plante agit indirectement sur ses prédateurs (Haichar *et al.*, 2014).

La rhizosphère, partenaire santé à part entière de la plante

Une partie des microorganismes présents dans la rhizosphère de la plante n'ont pas ou peu d'effet sur sa physiologie et se comportent en commensaux. Cependant, certains d'entre eux, minoritaires, se comportent en réels prédateurs (phytopathogènes). Pour s'en protéger, il existe chez les plantes des mécanismes de coopération avec des microorganismes favorisant leur développement. On parle

alors de symbiose au sens large. Cette notion introduite en 1879 par Anton de Bary se réfère à la capacité de différents organismes à vivre ensemble (Paracer & Ahmadjian, 2000).

Ce terme a évolué et regroupe habituellement deux notions différant entre elles par la nature de la relation qui unit les différents partenaires. La première, le commensalisme, désigne une relation entre deux partenaires où l'un des partenaires se nourrit des « reliefs des repas » de l'autre. Il n'y a pas de bénéfice réciproque. La deuxième notion, le mutualisme, désigne une association entre espèces offrant aux différents partenaires un bénéfice réciproque. Ce type d'association concerne tous types d'organismes, que ce soit animal ou végétal (Bronstein, 2001), et justifie de la coévolution des espèces permettant leur adaptation à l'évolution des contraintes environnementales.

Il est fréquent de voir l'établissement d'une association réciproquement bénéfique entre les insectes et des plantes, comme par exemple le couplage reproductif entre angiospermes et insectes pollinisateurs ou encore le couplage défensif entre l'acacia et la fourmi (S. Gomez-Acevedo, 2010). De telles associations sont aussi fréquentes au sein de la rhizosphère. La forme la plus aboutie du mutualisme est probablement l'établissement d'une relation symbiotique telle qu'on peut l'observer entre les bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique et les légumineuses ou encore l'association entre un champignon mycorhizien et son hôte végétal (Richardson, 2000). Il existe d'autres formes d'associations mutualistes n'impliquant pas forcément la mise en place d'organites symbiotiques (Kloepper *et al.*, 1989). Ces bactéries bénéfiques pour la plante sont désignées par l'acronyme PGPR (pour Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria) ou rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.

1.3.2 L'effet PGPR : généralités, effet directs et indirects

Les PGPR à l'aide de leur partenaire végétal

Ces bactéries naturellement présentes dans la rhizosphère des plantes sont capables d'adhérer aux racines de façon spontanée, par la formation de biofilms ou par la mise en place d'organites symbiotiques. Leur action peut être directe ou indirecte selon que le bénéfice s'opère en présence ou en l'absence de pathogène. Appartenant principalement aux phylums des Firmicutes, des Protéobactéries et des Actinobactéries, on les retrouve classiquement dans les genres *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia* (Ahmad *et al.*, 2008), *Acetobacter*, *Flavobacterium* et *Erwinia* (Rodriguez et Fraga, 1999).

Parmi les bactéries à action bénéfique directe, on peut distinguer les bactéries dites biofertilisatrices qui ont la capacité d'apporter ou de rendre disponibles différentes ressources aux plantes. Parmi celles-ci, on retrouve les PGPR du genre *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* qui, via la formation de nodosités, ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et le rendre disponible pour la plante (Lugtenberg & Kamilova, 2009). On observe aussi des bactéries dites « fixatrices libres de l'azote atmosphérique » qui enrichissent la rhizosphère en azote dans certains agrosystèmes (*e.g.* rizières) sans passer par la formation d'organes symbiotiques (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). D'autres bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* qui ont la capacité de solubiliser le phosphate minéral et participent à l'enrichissement des sols en phosphore (Rodriguez & Fraga, 1999).

Les bactéries dites phytostimulatrices ont la capacité de produire des phytohormones régulatrices de la croissance de la plante telles que l'acide indolacétique (Barazani & Friedman, 1999) ou autres composés indoliques actifs (Lebuhn *et al.*, 1997), l'acide gibbérellique (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000), les cytokinines (Arshad & Frankenberger, 1991) ou de contrôler le phénomène de stress en dégradant par désamination l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate), précurseur de l'éthylène (Ahmad *et al.*, 2011), l'éthylène étant considéré comme stimulateur de la croissance à faible niveau et inhibiteur par induction de la sénescence à des niveaux plus élevés (Pierik *et al.*, 2006). Dans le cadre d'un contact moins étroit avec la plante, certaines bactéries ont acquis la capacité d'agir à distance sur la balance hormonale de la plante *via* des composés organiques volatiles (ou VOCs) (Zhang *et al.*, 2007).

Certaines rhizobactéries utilisées pour la biorémédiation ont la capacité, via leur métabolisme secondaire, de dégrader certains polluants du sol, ce qui favorise ainsi la croissance et la reproduction de leurs hôtes ainsi protégés des polluants au niveau de leur rhizosphère. C'est le cas notamment de *Pseudomonas putida* qui s'établit au niveau de la rhizosphère des plantes en métabolisant des exsudats racinaires et en permettant le co-métabolisme du naphthalène favorisant ainsi la croissance de son hôte et la germination de ses graines dans les sols à dépolluer (Kuiper *et al.*, 2001).

En plus de l'action directe des PGPR sur la croissance des plantes, d'autres stratégies dites indirectes, peuvent être mises en place par certaines bactéries de la rhizosphère. C'est ce qui est observé dans les sols suppressifs ayant la capacité de contrôler l'occurrence de maladies causées par certaines bactéries ou champignons pathogènes (Bais *et al.*, 2010). Un sol suppressif se caractérise par un antagonisme entre des bactéries PGPR ayant été stimulées dans ce sol et un microorganisme pathogène, permettant de limiter les symptômes d'une maladie malgré la présence du pathogène (Bertrand *et al.*, 2011). L'occurrence d'un tel phénomène est favorisée par les monocultures qui recrutent et stimulent des populations rhizosphériques actives se traduisant, au fil des années, par une baisse de l'impact des populations pathogènes (Bertrand *et al.*, 2011).

Ce contrôle sur les microorganismes pathogènes du sol implique différents mécanismes. Un microorganisme ayant un développement rapide peut en supplanter un autre par compétition pour les nutriments (C, N, P, etc.) et l'exclure de la niche écologique. C'est le cas notamment pour des organismes comme *P. putida* qui a la capacité de produire une grande quantité de sidérophore (pseudobactine) ce qui entraîne une carence relative du rhizoplan en fer, et défavorise l'établissement de populations pathogènes dans la rhizosphère de la plante (Kloepper *et al.*, 1980). D'autres microorganismes ont la capacité de stimuler les défenses des plantes en agissant sur les voies de signalisation des plantes (voie de l'acide salicylique SA, acide jasmonique JA et de l'éthylène) mais aussi en produisant des sidérophores (Aznar *et Dellagi*, 2015), aboutissant à une induction de résistance systémique (ISR). Certains microorganismes ont la capacité de synthétiser des métabolites secondaires limitant la croissance des compétiteurs (bactéries, champignons, nématodes etc.) tels que les phénazines, les pyrrolnitrines, les pyolutéorines, les viscosinamides, les tensines, le 2,4-diacétylphloroglucinol (ou DAPG) ou encore les cyanures d'hydrogène (ou HCN) (Ramette *et al.*, 2003) ou encore des enzymes lysogéniques. On parle alors d'un phénomène d'antagonisme ou amensalisme (Bertrand *et al.*, 2011). Enfin certains microorganismes ont la capacité de protéger les racines vis-à-vis des pathogènes *via* la formation de biofilms pouvant contenir des molécules antimicrobiennes comme la surfactine.

PGPR et agriculture durable : un enjeu stratégique

Dans un contexte agricole fortement stimulé par les thématiques environnementales et les échéances réglementaires de restriction de l'usage des produits phytopharmaceutiques imposées par le programme Ecophyto2018, la recherche de méthodes alternatives de lutte, compatibles avec un développement durable, dépasse désormais l'obligation réglementaire pour devenir un réel enjeu stratégique pour les firmes agroalimentaires. Dans ce milieu en perpétuelle évolution, la concurrence dépasse largement les frontières des pays pour s'étendre à l'échelle mondiale. L'institut de recherche en marketing « *Markets and Markets* » a publié un rapport en 2014 dans lequel il estime à plus de 390 millions de dollars (environ 355 millions d'euros) le marché des inoculants agricoles en 2019 (232 millions de dollars en 2013) avec un taux de croissance annuel moyen estimé à plus de 9 %.

L'hétérogénéité réglementaire à l'échelle mondiale nécessite des acteurs de ce domaine une veille réglementaire permanente afin de pouvoir proposer des solutions qui puissent satisfaire au cadre législatif de chaque pays. L'usage intensif de produits phytopharmaceutiques est désormais sévèrement remis en question et l'usage étendu de variétés génétiquement modifiées est également questionné par de nombreux pays. Le développement de l'usage des PGPR dans l'agriculture se présente donc comme l'une des solutions les plus crédibles qui permettront l'évolution des pratiques agricoles.

De nombreux groupes ont pu valoriser leur activité de recherche et d'innovation par la mise sur le marché des formulations du type PGPR dans les domaines de la biofertilisation (microorganismes utilisés pour augmenter le rendement), de la phytostimulation (microorganismes utilisés pour stimuler la croissance des plantes) et de la bioprotection (microorganismes utilisés pour inhiber la croissance d'autres microorganismes pathogènes) (Lugtenberg *et al.*, 20002). La revue publiée par G. Berg (2009) résume de façon détaillée les problématiques associées à l'usage des PGPR dans l'agriculture et présente la liste d'un certain nombre d'inoculums commercialisés dans le monde et leurs applications (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Liste de quelques inoculants utilisant des microorganismes PGPR, commercialisés dans le monde (Berg, 2009).

Table 1 Representatives of microbial inoculants

Microorganisms	Name of the product	Plants, pathogens, or pathosystems	Company
<i>Ampelomyces quisqualis</i> M-10	AQ10 Biofungicide	Powdery mildew on apples, cucurbits, grapes, ornamentals, strawberries, and tomatoes	Ecogen
<i>Azospirillum</i> spp.	Biopromoter	Paddy, millets, oilseeds, fruits, vegetables, sugarcane, banana	Manidharma Biotech
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	FZB24 li, TB, WG	Potatoes, vegetables, ornamentals, strawberries, bulbs, turf, and woods	AbiTep
<i>Bacillus subtilis</i> strain GB03	Kodiak	Growth promotion; <i>Rhizoctonia</i> and <i>Fusarium</i> spp.	(Gustafson); Bayer CropScience
<i>Bacillus pumilus</i> GB34	YieldShield	Soil-borne fungal pathogens	(Gustafson); Bayer CropScience
<i>Bacillus subtilis</i> QST716	Serenade	Tobacco, tomato, lettuce, spinach	AgraQuest
<i>Bacillus subtilis</i> GB03, other <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , and <i>B. megaterium</i>	Companion	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , and <i>Phytophthora</i>	Growth Products
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soil implant+	Soy bean	Nitragin
<i>Coniothyrium minitans</i>	Contans WG, Intercept WG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>S. minor</i>	Prophyta Biologischer Pflanzenschutz
<i>Delftia acidovorans</i>	BioBoost	Canola	Brett-Young Seeds Limited
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Bioact WG	Nematodes	Prophyta Biologischer Pflanzenschutz
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Rotex	<i>Heterobasidium annosum</i>	E-nema Biologischer Pflanzenschutz
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Cedomon	Leaf stripe, net blotch, <i>Fusarium</i> sp., sot blotch, leaf spot, etc. on barley and oats	BioAgri AB
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	BlightBan A506	Frost damage, <i>Erwinia amylovora</i> , and russet-inducing bacteria on almond, apple, peach, pear, etc.	NuFarm
<i>Pseudomonas trivialis</i> 3Re-27	Salavida	Lettuce	Sourcon Padena
<i>Pseudomonas</i> spp.	Proradix	<i>Rhizoctonia solani</i>	Sourcon Padena
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	RhizoStar	Strawberries, oilseed rape	Prophyta Biologischer Pflanzenschutz
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	Mycostop	<i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	Kemira Agro Oy
<i>Trichoderma harzianum</i> T22	RootShield, PlantShield T22, Planter box	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Bioworks

Des limites à l'usage de PGPR

Deux difficultés majeures se dressent actuellement concernant la possibilité d'utiliser des PGPR en agriculture. Tout d'abord, au niveau de la formulation de l'inoculum : l'usage de bactéries non sporulantes nécessite la mise en place de toute une logistique en circuit court afin de pouvoir apporter un inoculum vivant et métaboliquement actif sur le lieu d'inoculation, afin de garantir de bonnes conditions de stockage et d'application.

Le deuxième point réside dans la difficulté réelle que représente la constitution d'un dossier permettant de mener des expérimentations en conditions de plein champ. Il s'agit d'une procédure longue, difficile et coûteuse (Jérôme Thibierge, InVivo group, communication personnelle) qui peut décourager le développement de nouveaux produits. En outre, avant de pouvoir obtenir une Autorisation de Distribution pour Expérimentation (ADE), le déposant doit fournir la preuve de l'innocuité du microorganisme pour la santé humaine. Or, de nombreuses souches microbiennes ayant un rôle bénéfique au sein de la rhizosphère peuvent présenter des risques pour des patients immunodéprimés et jouer un rôle dit d'opportuniste dans l'apparition de pathologies secondaires (Berg *et al.*, 2005). Il apparaît en effet que certains mécanismes permettant l'interaction entre la bactérie et son hôte végétal sont similaires à ceux mis en place dans le cadre d'une interaction pathogène avec l'homme notamment pour certaines souches appartenant aux genres *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, etc. (Rahme *et al.* 1995

d'après Berg *et al.*, 2005). Heureusement, les nombreux travaux de taxonomie entrepris ces dernières années ont pu, grâce à l'évolution des techniques de génomique, donner une meilleure appréciation des distances génétiques qui existent au sein d'un même genre, entre espèces pathogènes et phyto-bénéfiques. Nous verrons plus tard avec *Burkholderia* que la distance est parfois telle qu'il semble indispensable de devoir reconsidérer les « périmètres » de certains genres.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2 Matériels et méthodes détaillés

2.1 M&M 1 : Marquage fluorescent des souches bactériennes

Production de cellules chimio-compétentes : méthode au CaCl₂

Les cellules sauvages ont été régénérées à partir d'un stock glycérolé conservé à -80 °C sur milieu TSA/10^{ème} pendant une nuit. Une colonie isolée a été sélectionnée et multipliée en préculture dans 10 mL de TSB/10^{ème} pendant une nuit. Cette préculture a été utilisée pour inoculer un erlenmeyer de 50 mL de TSB/10^{ème} de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale d'environ 0,05. La culture a été arrêtée à une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,5 puis centrifugée à 4 °C pendant 7 min à 5000 g. Le culot a été repris à froid dans 25 mL de CaCl₂ à 0,1 M et incubé une nuit à 4 °C. L'échantillon a été centrifugé à 4 °C pendant 7 min à 5000 g, puis repris à froid dans 3,33 mL d'une solution de CaCl₂ à 0,1 M contenant 20 % de glycérol. Le mélange a été réparti en aliquotes de 100 µL, immédiatement congelées dans l'azote liquide puis conservé à -80 °C.

Production de cellules électro-compétentes

Les cellules sauvages ont été régénérées à partir d'un stock glycérolé conservé à -80 °C sur milieu TSA/10^{ème} pendant une nuit. Un prélèvement a été réalisé stérilement, puis utilisé pour inoculer une préculture de 10 mL de milieu TSB/10^{ème} et cultivé sous agitation une nuit à 28 °C. Cette préculture a été utilisée pour inoculer dans un erlenmeyer 50 mL de TSB/10^{ème} de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale d'environ 0,05. La culture a été arrêtée à une DO_{600nm} de 0,5. L'échantillon a alors été centrifugé à 4 °C pendant 5 min à 2600 g puis le culot a été repris à 4 °C dans 50 mL d'eau milliQ stérile. Ces deux dernières opérations ont été répétées 3 fois supplémentaires. La dernière reprise du culot a été réalisée à 4 °C dans 2 mL d'eau milliQ stérile contenant 10 % de glycérol. Des aliquotes de 100 µL ont alors été réalisées, immédiatement congelées dans l'azote liquide, puis conservés à -80 °C.

Production du plasmide support des constructions

Le plasmide à large spectre d'hôte utilisé pour les constructions est le pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995) intégrant une construction couplant le promoteur constitutif *pnpt2* et la GFP issue du plasmide p519ngfp (Matthysse *et al.*, 1996) insérée entre les sites de restriction *HindIII* et *EcoRI*. Ce plasmide transfecté dans *E. coli* pBgf est multipliable en milieu sélectif LB (Luria-Bertani broth) contenant 50 µg.mL⁻¹ de kanamycine.

Construction du plasmide fluorescent rouge : amplification du gène codant pour la mKate2

La séquence nucléotidique codant pour la protéine fluorescente mKate2 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide commercial pmKate2-N vector FP182 (Evrogen, Russia). Un couple d'amorces plaçant un site de restriction *NdeI* en amont et *EcoRI* en aval de la séquence de la protéine a été conçu. L'amplification a été réalisée au moyen d'une réaction de PCR avec l'amorce sens « CATACATATGATGGTGAGCGAGCTGATTAAGG » intégrant le site de restriction cohésif *NdeI* et avec l'amorce anti-sens « CATAGAATTCTCATCTGTGCCCCAGTTTGCTA » intégrant le site de restriction cohésif *EcoRI*. Cette réaction conduit à la formation d'un produit d'amplification de 739 paires de bases. Le point de fusion de ces amorces a été estimé *in silico* à 54,4 °C pour ce couple à l'aide de

l'outil en ligne Oligo Calc (Kibbe, 2007). La PCR a été réalisée avec le kit Platinum® Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, USA) selon le protocole suivant : dénaturation 2 min à 94 °C, 35 cycles comprenant une phase de dénaturation de 15 s à 94 °C, une phase d'hybridation de 30 s à 54,4 °C et une phase d'extension d'une minute à 68 °C puis une phase finale de terminaison à 4 °C. L'efficacité de la PCR a été contrôlée par une électrophorèse sur gel à 10 g.L⁻¹ d'agarose polymérisée dans un tampon de TAE (Tris-Acétate 40 mM, EDTA 1 mM). L'amplicon a été extrait et purifié à partir du gel grâce au kit QIAquick® Gel Extraction 2008 (Qiagen, Netherlands) selon le protocole préconisé par le fabricant.

Construction du plasmide fluorescent rouge : clonage et amplification du gène codant pour la mKate2

L'amplicon PCR à bords francs précédemment purifié a été cloné dans le plasmide pCR™II-Blunt-TOPO® à l'aide du kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning kit (Invitrogen, Life Technologies, USA) selon le protocole préconisé par le fabricant, puis transfecté dans *E. coli* TOP10 selon le protocole One Shot® (Invitrogen, Life Technologies, USA) afin d'y être amplifié. Les cellules transformées chimiquement ont été étalées sur milieu LA contenant 25 µg.mL⁻¹ de kanamycine. La présence de l'insert a été contrôlée par PCR avec les amorces précédemment citées et confirmée avec les amorces T3 et T7 fournies dans le kit TOPO®. L'amplification a été réalisée selon le programme PCR précédemment décrit à l'aide du kit GoTaq® DNA polymérase (Promega, USA) utilisé selon les préconisations du fabricant.

Construction du plasmide fluorescent rouge : amplification, purification et digestion asymétrique des plasmides pCR™II::mKate2 et pBBR1MCS-2::GFP.

Les cellules d'*E. coli* TOP10 transformées intégrant le plasmide pCR™II::mKate2 ainsi que les cellules *E. coli* pB_{gfp} intégrant le plasmide pBBR1MCS-2::GFP ont été cultivées séparément dans 10 mL de milieu LB contenant 50 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Les minipreps d'ADN plasmidique ont été réalisées à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep 2006 (Qiagen, Netherlands) selon le protocole préconisé par le fabricant. La double digestion des plasmides a été réalisée successivement par les enzymes de restriction Cut Smarter *NdeI* et *EcoRI* (New England BioLabs® inc., UK) dans un tampon *EcoRI* sans BSA (New England BioLabs® inc., UK). Le protocole a été adapté à partir du protocole fourni par le fabricant : première digestion de 2 h avec 1 µL de *NdeI* puis 2 h supplémentaires après avoir ajouté 1 µL de *EcoRI*, 40 µL finaux de volume réactionnel pour pBBR1MCS-2::GFP et 20 µL finaux pour pCR™II::mKate2.

Construction du plasmide fluorescent rouge : déphosphorylation du vecteur, ligation avec l'insert et transformation des cellules chimio-compétentes TOP10.

Les produits de digestion ont été purifiés sur gel grâce au kit QIAquick® Gel Extraction 2008 (Qiagen, Netherlands) selon le protocole préconisé par le fabricant et de manière à récupérer d'un côté le vecteur vide pBBR1MCS-2 linéarisé et de l'autre l'insert mKate2 digéré.

Le vecteur vide pBBR1MCS-2 linéarisé a été déphosphorylé par l'action de l'Antarctic Phosphatase (New England BioLabs® inc., UK) pour éviter sa recircularisation lors de l'étape de ligation. Le protocole utilisé a été adapté à partir des préconisations du fabricant en réduisant l'étape d'inactivation à 5 min à 65 °C.

L'étape de ligation entre le vecteur vide déphosphorylé pBBR1MCS-2 et l'insert mKate2 ou GFP a été réalisée avec le kit T4 DNA ligase (New England BioLabs® inc., UK) selon un protocole adapté à partir des préconisations du fabricant en incubant 30 min à température ambiante puis une nuit à 4 °C.

Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* TOP10 selon le protocole One Shot® (Invitrogen, Life Technologies, USA). Les cellules ont alors été cultivées sur milieu LA contenant 50 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Des colonies rouges ou vertes ont alors été sélectionnées séparément, puis multipliées en milieu LB. Des minipreps d'ADN plasmidique pBBR1MCS-2::mKate2 et pBBR1MCS-2::GFP ont été réalisées à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep 2006 (Qiagen, Netherlands) selon le protocole préconisé par le fabricant.

Transformation des cellules chimio-compétentes

Un aliquote de 100 µL de cellules compétentes a été mise en présence de 2 µg d'ADN plasmidique pBBR1MCS-2::GFP pendant 25 min à 4°C. Un choc thermique a été réalisé par immersion du mélange pendant 2 min dans un bain-marie à 42°C, puis immédiatement placé dans la glace. 500 µL de TSB/10^{ème} ont été ajoutés au mélange, puis incubé sous agitation pendant 2 h à 28°C. 100 µL de culture ont été étalés sur milieu TSA/10^{ème} contenant 10 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Le reste de la culture a été centrifugé pendant 2 min à 16100 g. Le surnageant a été éliminé et le culot repris dans le volume restant. Un deuxième étalement a été réalisé avec la totalité du culot sur milieu TSA/10^{ème} contenant 10 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Les milieux ont été incubés entre 12 et 24 h à l'obscurité à 28°C.

Transformation des cellules électro-compétentes

Dans les cas où les transformations à l'aide de cellules chimio-compétentes ont échoué, une électrotransformation a été entreprise. Un aliquote de 100 µL de cellules compétentes a été mise en présence de 2 µg d'ADN plasmidique pBBR1MCS-2::mKate2 ou pBBR1MCS-2::GFP selon le besoin, dans une cuve d'électroporation (Eurogentec, Belgique) pendant 30 min à 4 °C. L'électroporation a été réalisée sur un Multiporator (Eppendorf, Deutschland) pendant 5 ms sous une tension de 2500 V. Un volume d'1 mL de TSB/10^{ème} a été ajouté. La cuve a alors été incubée sous agitation 1 h à 28 °C. 100 µL de culture ont été étalés sur milieu TSA/10^{ème} contenant 25 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Les milieux ont été incubés entre 12 et 24 h à l'obscurité à 28 °C.

Préparation des pré-inoculums

Chaque souche candidate transformée par la GFP a été régénérée par une culture de 12 à 48 h à l'obscurité et à 28 °C sur TSA/10^{ème} à partir des souches mères conservées à -80 °C dans du glycérol. Un prélèvement a été réalisé stérilement et utilisé pour inoculer une préculture de 10 mL de TSB/10^{ème}. La culture a eu lieu sous agitation une nuit à 28 °C.

2.2 M&M 2 : Inoculation des plantes cultivées in vitro ou dans le sol

Préparation du sol

Le sol récolté a été débarrassé des pailles, insectes, pierres et racines, puis tamisé à 4 mm et enfin étalé pour le sécher naturellement. Le sol a été stocké dans des bacs conservés à température ambiante. L'humidité mesurée dans le bac avant usage était comprise entre 5 et 7 %.

Stérilisation des graines d'arabette

Les graines d'arabette ont été stérilisées à l'aide d'une solution javellisée : pour 10 mL finaux, ajouter 1 mL de solution de Javel (3,75 % de chlore actif), 3 gouttes de Tween 80 et de l'éthanol absolu qsp. 10 mL. Les graines ont été transférées dans un tube de 2 mL, qsp. 2 mL de solution de stérilisation ont été ajoutés, le tube a été agité vigoureusement puis laissé au repos 6 min sous hotte stérile à flux laminaire. La solution javellisée a été éliminée manuellement en prenant garde de conserver les graines sédimentées. Trois rinçages ont alors été réalisés avec 2 mL d'éthanol absolu puis les graines ont été transférées, étalées dans une boîte de Petri stérile jusqu'à séchage complet de l'éthanol, puis collectées et conservées hermétiquement à 6 °C.

Stérilisation des graines de colza

Les graines de colza ont été stérilisées sous un flux d'air stérile par lot d'un millier de graines environ dans 60 mL de Javel à 2,5 % de chlore actif contenant 60 µL de Tween 20 pendant 15 min sous agitation. Les graines ont été rincées dans 60 mL d'eau MilliQ stérile en quatre lavages successifs de 15 min sous agitation. Au cours de chaque étape, les graines flottantes ont été éliminées. Après le dernier lavage, le culot de graines a été repris dans 60 mL d'éthanol absolu, étalé et laissé à température ambiante jusqu'à évaporation complète de l'éthanol. Les graines ainsi stérilisées sont conservées hermétiquement à 6 °C.

Lavage et calibration des pré-inocula

Un volume de 250 mL de culture a été centrifugé à 8000 rpm pendant 20 min à 4 °C (centrifugeuse GR4-22, Jouan, France). Les culots ont été lavés deux fois en les resuspendant dans 250 mL d'eau MilliQ stérile, puis les flacons ont été centrifugés à 8000 rpm pendant 20 min à 4 °C puis conservés à 4 °C. Un volume de 200 mL d'eau Ultrapure stérile a été ajouté aux 250 mL d'inoculum.

Suspensions-dilution des échantillons de sol

100 mg de sol ont été dilués dans 1 mL de KCl concentré à 8,5 g.L⁻¹, puis 4 dilutions successives de 100 µL dans 900 µL de KCl ont été réalisées. 5 µL de chaque dilution ont été étalés sur milieu solide TSA/10^{ème} contenant 15 µg.mL⁻¹ de kanamycine (modalités marquées à la mKate2 et Ds-Red) ou non (modalités marquées à la GFP). Les boîtes ont été incubées 48 h à l'obscurité à 28 °C.

Broyage des échantillons racinaires et suspensions-dilutions

Les racines ont été broyées dans 1 mL d'eau Ultrapure stérile. Le broyat a été repris dans 10 mL d'eau Ultrapure stérile, puis homogénéisé au vortex. 100 µL de broyat ont été prélevés puis dilués 4 fois en cascade dans 900 µL d'une solution de KCl concentré à 8,5 g.L⁻¹. Un volume de 5 µL de chaque

dilution a été étalé sur milieu solide TSA/10^{ème} contenant ou non 15 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Les boîtes ont été incubées 48 h à l'obscurité à 28 °C.

2.3 M&M 3 : Solubilisation bactérienne du phosphate

Préparation du dispositif expérimental

Les boîtes de Petri carrées utilisées pour cette expérimentation ont été remplies par 45 mL de milieu PVK (milieu Pikovskaya : Annexe 2) gélifié par de l'agar à 15 g.L⁻¹. Le Ca₃(PO₄)₂ étant insoluble, il est important de bien agiter la suspension pendant son incorporation, afin que sa répartition soit le plus homogène possible dans du milieu de culture.

Inoculation des boîtes

Cinq spots de 15 µL de préculture diluée à 10³ cfu.mL⁻¹ ont été utilisés pour inoculer les boîtes contenant le milieu PVK. Les boîtes de Petri ont été fermées hermétiquement à l'aide de Parafilm M® (Bemis, USA) puis placées 7 jours à l'étuve à 28 °C.

Fin de l'essai et mesure des données

À l'issue des 7 jours de culture, les boîtes de Petri ont été ouvertes et scannées à 400 ppp (points par pouce), pour une première série de photographies permettant de mesurer la taille des colonies bactériennes. Les boîtes de Petri ont ensuite été débarrassées des colonies en le décollant de la gélose à l'aide d'un râteau de culture et d'eau milliQ stérile. Une deuxième série de clichés a été ensuite réalisée de la même façon afin de visualiser les halos de solubilisation. Ces clichés ont été détournés informatiquement, puis un tracé autour des colonies et des halos a été réalisé. Les figures ainsi obtenues ont été enregistrées à 100 ppp puis traitées avec le logiciel ImageJ (Rasband. W., NIH, USA).

Le diamètre des tracés a été mesuré avec ce logiciel : dans le cas de tracés quasi-circulaires, un seul diamètre a été retenu, dans le cas de tracés elliptiques, une moyenne entre le grand axe et le petit axe de l'ellipse a été retenu. L'indice de solubilisation a été calculé selon la formule : (d'après Premono *et al.*, 1996).

$$SI = \frac{\text{diamètre de la colonie} + \text{diamètre du halo}}{\text{diamètre de la colonie}}$$

Bien que la quasi-totalité des souches bactériennes présentent un halo de solubilisation, seuls les halos ayant atteint le fond de la boîte de Petri ont été retenus pour l'analyse (Figure 2.1).

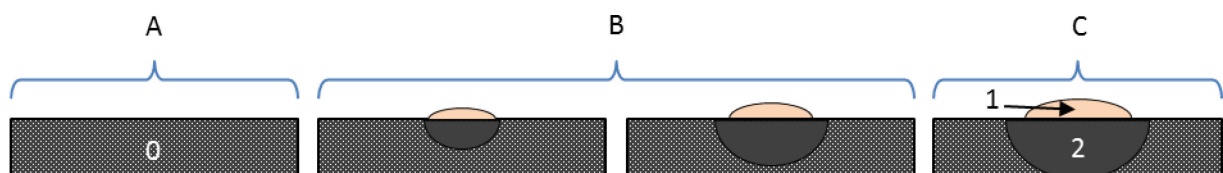


Figure 2.1 : Coupe transversale schématique du dispositif expérimental : (0) milieu Pikovskaya-agar, (1) colonie bactérienne, (2) halo de solubilisation, (A) milieu témoin sans bactérie,

(B) milieu avec colonie dont le halo n'a pas été mesuré, (C) milieu avec colonie dont le halo ayant atteint le fond de la boîte a été mesuré.

2.4 M&M 4 : Compétition entre souches bactériennes

Calibration de l'inoculum

Une série de dilutions a été réalisée à partir de la solution mère pour permettre le comptage des cellules au microscope BX60 fluoview confocal (Olympus, Japan) et en estimer la concentration : dans nos conditions, à l'objectif à immersion d'huile x100, une cellule dans le champ d'observation équivaut à une concentration de 2.10^6 cellules dans la solution mesurée. Le comptage de 10 champs a été réalisé, puis une concentration moyenne de la solution mère a été estimée.

2.5 M&M 5 : Effet des souches sur la croissance et la nutrition minérale du colza

Préparation des semis

Le sol a été réhydraté à l'eau MilliQ non stérile de façon à obtenir une humidité massique d'environ 15 %. Le sol ainsi humidifié a été ensuite homogénéisé manuellement puis réparti dans les pots de type « MW » (Annexe 3) à raison de 750 g de sol par pot. Le sol a été tassé uniformément de façon à abaisser sa surface d'un centimètre sous le bord du pot. 5 graines stérilisées ont alors été semées de façon à maximiser l'espace libre entre elles à environ un demi-centimètre de profondeur puis recouvertes de sol.

Echantillonnage de l'essai

Les plantules ont été dépotées et les racines précautionneusement collectées afin de préserver au maximum l'intégrité de leur système racinaire. Une coupelle de sol a été prélevée, pesée et mise à sécher pour en mesurer l'humidité. Les plantules dont les racines sont recouvertes de sol adhérent ont été placées dans des tubes de 50 mL spécialement adaptés (Annexe 4) et placées sur un agitateur (Stuart Scientific Flask Shaker SF1). Seule la partie racinaire portant le sol adhérent est enfermée dans le tube, la partie aérienne est laissée libre depuis le collet grâce à l'ouverture prévue à cet effet. L'ensemble a été agité pendant 1 min à vitesse minimale afin de décrocher le sol non adhérent aux racines.

Les parties aériennes ont alors été collectées en sectionnant stérilement les plantules au collet, disposées dans des coupelles de pesée, tarées et mises à déshydrater à l'étuve à 80° C pendant 7 j. Le sol non-adhérent aux racines a été éliminé et les systèmes racinaires, portant le sol adhérent, collectés dans des tubes de 50 mL stériles stockés une nuit à 4° C. Le lendemain, le contenu des tubes (racines portant leur sol adhérent) a été transféré dans des tubes de 50 mL contenant 20 mL d'eau MilliQ stérile. Les échantillons ont alors été vortexés pendant 10 s pour laver le sol adhérent aux racines puis centrifugés 2 min à 8000 rpm. Le sol adhérent est ainsi culoté avec les racines clarifiées à l'interface sol/eau. Les racines ont alors été prélevées stérilement et transférées dans un tube stérile de 15 mL contenant 5 mL d'eau MilliQ. Les échantillons ont été vortexés 10 s puis centrifugés 2 min à 8000 rpm afin de culoter le reste de sol attaché aux racines. Les racines clarifiées sont alors

transférées dans un tube de 15 mL stérile et le culot du tube de lavage resuspendu et collecté dans le tube de 50 mL contenant le sol adhérent.

Broyage des échantillons racinaires

Les racines ont été broyées dans 2,5 mL d'eau MilliQ stérile au pilon dans un mortier préalablement stérilisé. Le broyat a été transféré dans un tube de 15 mL stérile puis le mortier rincé par 2,5 mL d'eau MilliQ stérile qui ont été collectés dans ce même tube.

Dilution et étalement des broyats racinaires

Les dilutions ont été réalisées au dixième en plaque 96 puits à partir de 200 μ L de broyats racinaires jusqu'à une dilution de facteur 10^{-5} . Les dilutions d'un facteur 10^{-1} à 10^{-5} ont été étalées sur milieu TSA dilué au $1/10^{\text{ème}}$ additionné ou pas de kanamycine à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou de tétracycline à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ selon la sélectivité fixée.

Mesure du sol adhérent

Le contenu des tubes de 50 mL a été transféré dans des coupelles de pesée en aluminium tarées après élimination d'éventuels corps flottants (débris de bois, balle de grain, etc.). Les coupelles ont été placées à l'étuve pendant 7 j à 80°C .

Comptage par observations macroscopiques et microscopiques

Les boîtes de Petri inoculées à partir des broyats racinaires ont été observées au microscope Zeiss Axio Zoom V16 afin de dénombrer les colonies fluorescentes marquées à la dsRed, mKate2 et GFP. Pour la détection spécifique de *R. alamii* YAS34 marquée à la GFP, les colonies ont été observées au microscope BX60 fluoview confocal (Olympus, Japan)

2.6 M&M 6 : Mesure des paramètres agronomiques d'intérêt sur les plantules de colza

Mesure de la puissance de l'essai

La détermination de l'effectif minimum pour pouvoir comparer des traitements a été effectuée au moyen d'un abaque (figure 2.2) où le nombre de répétitions est donné en fonction du rapport de la différence « souhaitée » « Δ » sur le coefficient de variation « CV » de l'essai. Ce coefficient « CV » est le rapport entre l'écart-type « s » d'une distribution et sa moyenne « \bar{x} ».

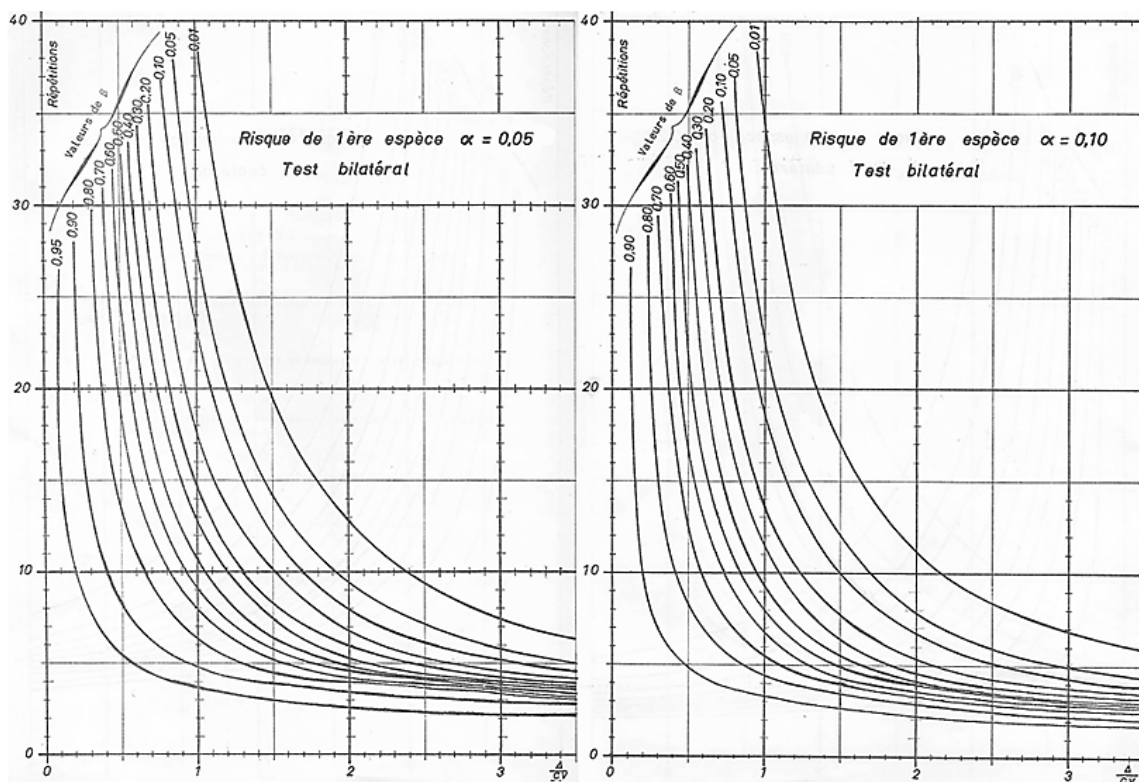


Figure 2.2 : Abaque prédictif estimant le nombre de répétitions en fonction de la différence vraie souhaitée et du coefficient de variation des données mesurées.

Pour ce faire, les moyennes, écart-types et coefficients de variations ont été calculés et résumés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Résumé des statistiques descriptives des données des trois séries d'expérimentation en sol. « \bar{x} » : moyenne, « s » : écart type, « CV% » : coefficient de variation, « PA » : partie aérienne, « PR » : partie racinaire, « SA » : sol adhérent aux racines.

	Paramètre mesuré	\bar{x}	s	CV %
Série 1	Masse PA (mg)	156,34	47,42	30,33
	Masse PR (mg)	52,75	18,02	34,16
	Masse PR/Masse PA	0,34	0,08	24,06
	Masse SA/Masse PR	45,53	30,69	67,41
	Humidité (%)	10,89	3,12	28,63
Série 2	Masse PA (mg)	83,62	32,77	39,19
	Masse PR (mg)	23,41	14,63	62,49
	Masse PR/Masse PA	0,29	0,18	62,93
	Masse SA/Masse PR	26,11	13,81	52,90
	Humidité (%)	8,40	0,86	10,25
Série 3	Masse PA (mg)	101,42	22,33	22,02
	Masse PR (mg)	23,86	7,78	32,61
	Masse PR/Masse PA	0,24	0,06	23,91
	Masse SA/Masse PR	37,45	14,21	37,95
	Humidité (%)	7,47	0,78	10,41

2.7 M&M 7 : Dosage des éléments minéraux par ICP-AES

Dissolution des échantillons

Les broyats racinaires et les parties aériennes des échantillons des séries 2 et 3 utilisés pour la mesure du poids de matière sèche ont été collectés puis placés dans des tubes de PTFE (polytétrafluoroéthylène). Sous hotte, 5 mL d'acide nitrique fumant (69 à 70 %) ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont été agités de façon à ce que les échantillons sédimentent bien au fond du tube. Les tubes ont alors été placés à l'étuve (+/- 100 °C) pendant une nuit. Les tubes ont été refroidis 15 min sous hotte à température ambiante puis le contenu a été filtré (filtre papier) afin d'éliminer d'éventuels résidus et transféré dans des tubes en polypropylène.

Les échantillons ainsi dissous ont alors été pris en charge par Pierre Richaud (LB3M, BIAM, CEA Cadarache).

Mesure de la teneur par ICP-AES

Les résultats obtenus exprimés en ppm (parties par million) ont ensuite été exprimés en teneur en minéraux suivant la formule suivante : concentration en élément X = [X]

$$[X] = \frac{\text{Concentration mesurée (ppm)} - 0.001 \times \text{Seuil de détection (ppm)}}{\text{Facteur de dilution}}$$

La teneur finale, exprimée en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ est obtenue en divisant [X] par la masse sèche de l'échantillon (mg) mesurée dans l'expérience précédente.

L'analyse par ICP-AES des échantillons permet de doser les éléments suivants : argent (Ag), aluminium (Al), arsenic (As), bore (B), calcium (Ca), cadmium (Cd), cobalt (Co), chrome (Cr), cuivre (Cu), fer (Fe), mercure (Hg), potassium (K), magnésium (Mg), manganèse (Mn), molybdène (Mo), sodium (Na), nickel (Ni), phosphore (P), plomb (Pb), soufre (S), sélénium (Se), tellure (Te), vanadium (V), zinc (Zn).

Mesure de la puissance de l'essai

Nous avons choisi de ne prendre en compte que les données concernant le phosphore et le soufre. Chacune des modalités est répétée 8 fois à raison d'une fois par bloc. Le calcul du coefficient de variation et son interprétation à l'aide des abaques précédemment présentés nous ont permis d'estimer l'effectif minimal permettant de mettre en évidence une différence significative (Δ) si elle existe. Compte tenu du coefficient de variation, l'essai est suffisamment puissant pour conclure sur les données mesurées pour les parties aériennes des séries 2 et 3 mais insuffisant pour conclure sur les parties racinaires (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Estimation de la puissance des séries 2 et 3 de l'essai en sol. PA désigne parties aériennes, PR désigne parties racinaires.

		β fixé à 10 %			$\Delta\%$ $\Delta\%/CV\%$ Rép. min			$\Delta\%$ $\Delta\%/CV\%$ Rép. min			
Série 2	$\alpha = 5\%$	Phosphore PA	10	0,99	24	20	1,99	8	30	2,98	6
		Soufre PA	10	0,96	25	20	1,92	9	30	2,89	6
		Phosphore PR	10	0,11	-	20	0,22	-	30	0,34	-
		Soufre PR	10	0,14	-	20	0,29	-	30	0,43	-
	$\alpha = 10\%$	Phosphore PA	10	0,99	19	20	1,99	7	30	2,98	5
		Soufre PA	10	0,96	21	20	1,92	7	30	2,89	8
		Phosphore PR	10	0,11	-	20	0,22	-	30	0,34	-
		Soufre PR	10	0,14	-	20	0,29	-	30	0,43	-
Série 3	$\alpha = 5\%$	Phosphore PA	10	1,14	19	20	2,27	7	30	3,41	5
		Soufre PA	10	0,89	29	20	1,77	10	30	2,66	6
		Phosphore PR	10	0,15	-	20	0,29	-	30	0,44	-
		Soufre PR	10	0,41	-	20	0,82	33	30	1,23	17
	$\alpha = 10\%$	Phosphore PA	10	1,14	15	20	2,27	6	30	3,41	4
		Soufre PA	10	0,89	24	20	1,77	8	30	2,66	5
		Phosphore PR	10	0,15	-	20	0,29	-	30	0,44	-
		Soufre PR	10	0,41	-	20	0,82	27	30	1,23	14

3. RESULTATS

3 Résultats

Le travail présenté s'articule en différentes étapes : du choix de souches bactériennes d'intérêt agronomique, de leur sélection en fonction de leur aptitude à croître en présence du colza pour arriver à la validation de leurs effets sur le colza dans le cadre d'essai en sol non stérilisé.

3.1 Formulation de l'inoculum mixte : choix des souches bactériennes

Nous présentons ici les souches bactériennes qui ont été sélectionnées d'après le bénéfice potentiel qu'elles seraient en mesure d'apporter au colza si elles passaient avec succès les différentes étapes de sélection que nous avons réalisée.

3.1.1 Description des souches bactériennes

Le but de ce travail est, à terme, de pouvoir proposer aux agriculteurs un produit dont l'efficacité permettrait de diminuer l'utilisation des produits phytopharmaceutiques et des intrants fertilisants à l'aide des souches bactériennes phytobénéfiques. Le LEMIRE dispose d'une très importante collection de souches bactériennes assemblée au fil des années et dans laquelle quelques souches ont été sélectionnées pour cette étude, sur la base de leur complémentarité de propriétés phytobénéfiques et de leur compatibilité avec l'hôte et les conditions de culture.

Les souches retenues sont les suivantes :

Pseudomonas brassicacearum NFM421 et NFM11702

Pseudomonas brassicacearum est une gammaprotéobactérie majoritaire dans la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana*, isolée de façon fréquente et décrite par Achouak *et al.* (2000). Elle présente la particularité de générer une diversité intraclonale (Figure 3.1), par un mécanisme de variation phénotypique, en formant des sous-populations à la fois *in vitro* et en conditions naturelles dans la rhizosphère d'*A. thaliana* et d'autres plantes comme le colza (Achouak *et al.*, 2004).

La variation phénotypique semble correspondre à une stratégie de colonisation permettant à la bactérie de mieux explorer et exploiter les ressources du système racinaire et pourrait expliquer l'abondance de cette population dans la rhizosphère de ces deux *Brassicaceae*. Une analyse du transcriptome de NFM421 en interaction avec *A. thaliana* a permis de montrer que la plante agit sur la modulation de certains gènes de la bactérie.

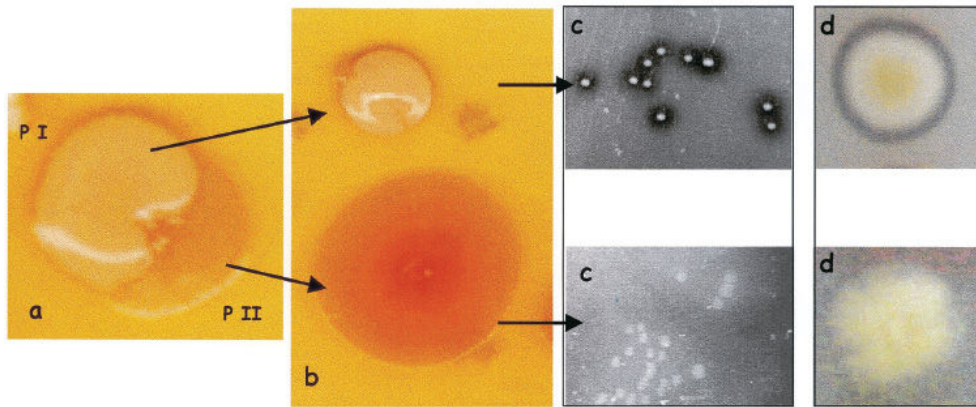


Figure 3.1 : Variation phénotypique de la souche *P. brassicacearum* NFM421. (a) colonies âgées de 7 jours cultivées sur le milieu PAF (Difco Laboratories, USA) mettant en évidence une zone (P II) correspondant aux cellules variantes. (b) morphologie des deux types de colonies. (c et d) Une activité protéase extracellulaire et lipase présente chez les colonies non variantes (P I) et absente sur les cellules variantes a pu être révélée au moyen de cultures sur boîte de Petri réalisées en milieu gélosé « Tryptic Soy Broth » (Difco Laboratories, USA) dilué dix fois contenant 1% de lait écrémé (c) ou 1 % de tributyrine et 0,8% de gomme arabique (d). La souche a été cultivée à 30 °C (d'après Chabeaud *et al.*, 2001).

En outre, il a été montré que cette souche bactérienne modifie l'architecture racinaire (Figure 3.2) en produisant des phytohormones ainsi qu'une ACC-désaminase qui modifie le niveau d'éthylène en dégradant son précurseur l'aminocyclopropane (ACC) (Achouak *et al.*, 2003). Elle produit également des protéases et des lipases (Chabeaud *et al.*, 2001), des métabolites antifongiques comme les cyanures d'hydrogène (HCN) et le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) qui protège la plante des champignons phytopathogènes (Ross *et al.*, 2000, Lalaouna *et al.*, 2012).

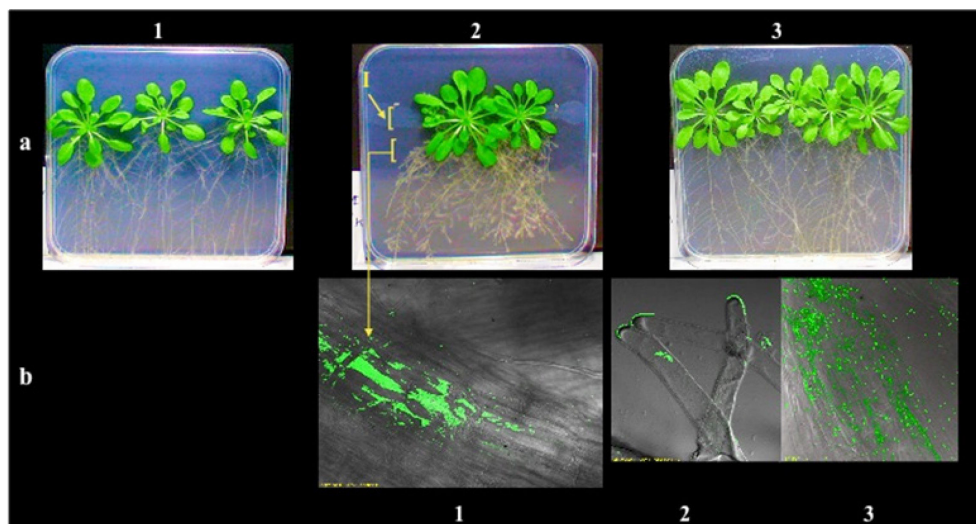


Figure 3.2 : Effet du changement de phase de NFM421 sur l'architecture des racines (a) et colonisation racinaire (b) de plantules d'*A. thaliana* Col-0 âgées de trois semaines. (a-1) : contrôle; (a-2) plantules colonisées par les cellules non variante; (a-3) plantules colonisées par les cellules variantes. Observation réalisées en microscopie confocale (CSLM) sur des cellules marquées à la GFP

non variantes (**b-1**) ou variantes (**b-2** et **b-3**) colonisant les racines d'*A. thaliana* (d'après Achouak *et al.*, 2003).

Enterobacter radicincitans NO9

L'espèce *E. radicincitans*, décrite par Kämpfer *et al.* (2005), regroupe actuellement des souches autrefois classées dans le genre *Pantoea agglomerans* (Schreiner *et al.*, 2009) ou encore *Enterobacter cloacae* (Omar, 1987). Elle appartient à la classe des gammaprotéobactéries. Particulièrement adaptée à la vie en association avec la plante, elle présente une forte capacité à la coloniser (Ruppel *et al.*, 2006). Elle est connue pour ses caractères phytobénéfiques, en particulier la stimulation de la croissance des racines et des tiges sur une large gamme d'hôtes allant des céréales comme le blé, l'orge ou encore le maïs, aux légumineuses telles que le pois en passant par des représentants de la famille des *Brassicaceae* tel que le chou (*Brassica oleracea*) (Schreiner *et al.*, 2009) et *Arabidopsis thaliana* (Brock *et al.*, 2013).

Elle a la capacité de produire des phytohormones (analogues d'auxines et de cytokinines), de fixer l'azote atmosphérique (Ruppel *et al.*, 1992) et de solubiliser des phosphates minéraux présents dans le sol (Brock *et al.*, 2013). La particularité de cette espèce est sa versatilité de fonctionnement. Très adaptée aux plantes, elle peut être retrouvée au sein de la phyllosphère de son hôte sous un mode endophytique sans générer de réponse immunitaire (Brock *et al.*, 2013), au niveau de la rhizosphère sous forme endophytique, ou encore à la surface des racines (Ruppel *et al.*, 1992).

Une étude récente basée sur une analyse du type MLSA (Multilocus Sequence Analysis) des gènes *gyrB*, *rpoB*, *infB* et *atpD* propose de modifier la classification d'*Enterobacter radicincitans* en *Kosakonia radicincitans* (Brady *et al.*, 2013). La souche utilisée dans cette étude (NO9) a été isolée du sol rhizosphérique d'une parcelle de riz cultivée sur le plateau de Gizeh en Egypte par Omar *et al.* (1987).

Rhizobium alamii YAS34

La souche de *Rhizobium alamii* YAS34 est une alphaprotéobactérie isolée de la rhizosphère du tournesol cultivé dans un sol limono-argileux de Saint-Florent-sur-Cher par Alami *et al.*, (2000). L'espèce a été décrite quelques années après par Berge *et al.* (2009).

Cette souche présente la particularité de produire en condition naturelle un exopolysaccharide de qualité industrielle (Figure 3.3) dont l'usage a été breveté (Alami *et al.*, 1998), avec plusieurs applications commerciales en cosmétologie (Soligel, ARD puis Solliance/Givaudan), et, avec des applications potentielles en agriculture (Brésin *et al.*, 2008).

Pantoea agglomerans NO30

La souche NO30 de *Pantoea agglomerans*, dénommée initialement *Enterobacter agglomerans* ou *Erwinia herbicola* (Quecine *et al.*, 2012), est une gammaprotéobactérie isolée de la rhizosphère du riz cultivé sur le plateau de Gizeh en Egypte (Omar *et al.* 1989).

Cette souche, initialement sélectionnée pour sa capacité à fixer l'azote libre (Omar *et al.*, 1989), est capable de coloniser plusieurs hôtes autres que sa plante hôte de référence (riz) tels que le blé (Achouak *et al.*, 1994), le maïs et la canne à sucre (Quecine *et al.*, 2012), la patate douce (Asis et Adachi, 2003) ou encore le citronnier (Araújo *et al.*, 2001). Comme *E. radicincitans*, cette espèce a été isolée sous forme endophytique ou associée aux racines. Dans le cas de la colonisation endophytique des feuilles de citronnier, l'action d'un partenaire fongique symbiotique (*Guignardia citricarpa*) semble facilitante (Araújo *et al.*, 2001). Elle présente en outre une particularité qui lui est propre lorsqu'elle colonise le rhizoplan du riz. En phase exponentielle de croissance, des cellules se retrouvent étroitement agrégées au sein d'un même ensemble « pluricellulaire » au sein d'une matrice polysaccharidique formant ainsi des symplasmata solidement ancrés à la surface des racines (Figure 3.4). Ces structures permettent probablement aux cellules d'optimiser la concentration en oxygène pour un meilleur fonctionnement des activités enzymatiques telles que la nitrogénase (Achouak *et al.*, 1994). Une étude plus récente par marquage GFP de certaines cellules a mis en évidence que ces agrégats ne proviennent pas d'un seul clone mais de l'agrégation de différentes cellules libres (Duan *et al.*, 2007). Outre son intérêt pour la fixation de l'azote atmosphérique, le symplasmata semble conférer aux cellules qu'il contient une protection contre les changements environnementaux tels que la dessiccation, les variations de pH et les chocs osmotiques etc. (Duan *et al.*, 2007).

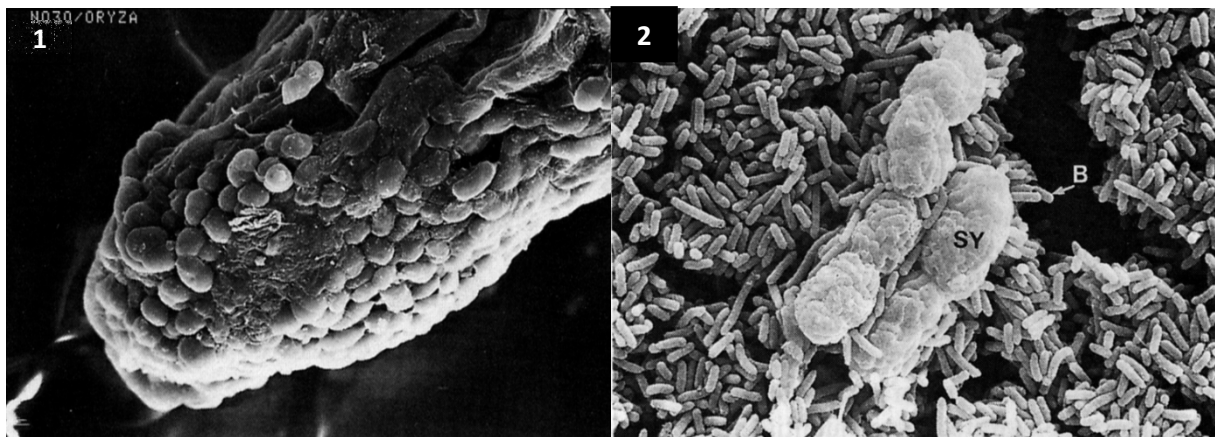


Figure 3.4 : Micrographies réalisées en microscopie électronique à balayage d'*E. agglomerans* NO30 incubées 24 h sur des racines de riz (1) et 8 h sur milieu LB illustrant la formation de symplasmata (SY), B = bactérie. (D'après Achouak *et al.*, 1994).

Cette bactérie présente des activités phyto-bénéfiques en particulier une capacité à stimuler la croissance des plantes. Sur le blé notamment, elle augmente la longueur des racines et le rendement, à la fois en conditions stériles et en conditions naturelles (Scholtz-Seidel & Ruppel, 1992). Elle est aussi efficace sur d'autres plantes hôtes comme la canne à sucre : sa capacité à produire de l'acide indolacétique stimule la croissance de la partie aérienne de cette plante (Quecine *et al.*, 2012). D'autres part, des études ont montré son efficacité *in vitro* dans la bioprotection de la

banane contre *Botryodiplodia theobromae* (Gunasinghe *et al.*, 2004), de certains drupes récoltés contre *Monilinia laxa* et de *Rhizopus stolonifer* (Bonaterra *et al.*, 2003), et des semences de pois contre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hsieh *et al.*, 2005). Enfin, sa capacité à solubiliser les phosphates minéraux lui confère des propriétés de biofertilisant (Quecine *et al.*, 2012).

***Paraburkholderia caribensis* P71**

La souche *Paraburkholderia caribensis* (MWA)P71 (anciennement nommée *Burkholderia caribensis*) a été isolée d'un sol sous prairie. Cette espèce, présente dans un sol sous prairie, n'a pas été retrouvée dans un sol, à proximité du précédent mais sous marâchage, et pourrait donc servir d'indicateur biologique de la stabilité des vertisols de Martinique car seul le sol sous prairie est stable (Cabidoche *et al.*, 2000). Cette espèce a été décrite par Achouak *et al.* (1999) et n'appartient pas aux complexe d'espèces « *Burkholderia cepacia* » dans le lequel on retrouve les espèces opportunistes chez l'homme. Une étude récente a permis d'établir la phylogénie du genre *Burkholderia* qui souligne l'importante distance phylogénique qui existe entre le clade 1 regroupant *Burkholderia cepacia* et les autres souches potentiellement pathogènes, et les souches non pathogènes du clade 2 auquel *Burkholderia caribensis* appartient (Figure 3.5). Cette distance est telle que les auteurs estimaient peu pertinent de regrouper cette diversité au sein d'un même genre et ont proposé d'attribuer ce clade 2 à un nouveau genre *Paraburkholderia*. (Sawana *et al.*, 2014).

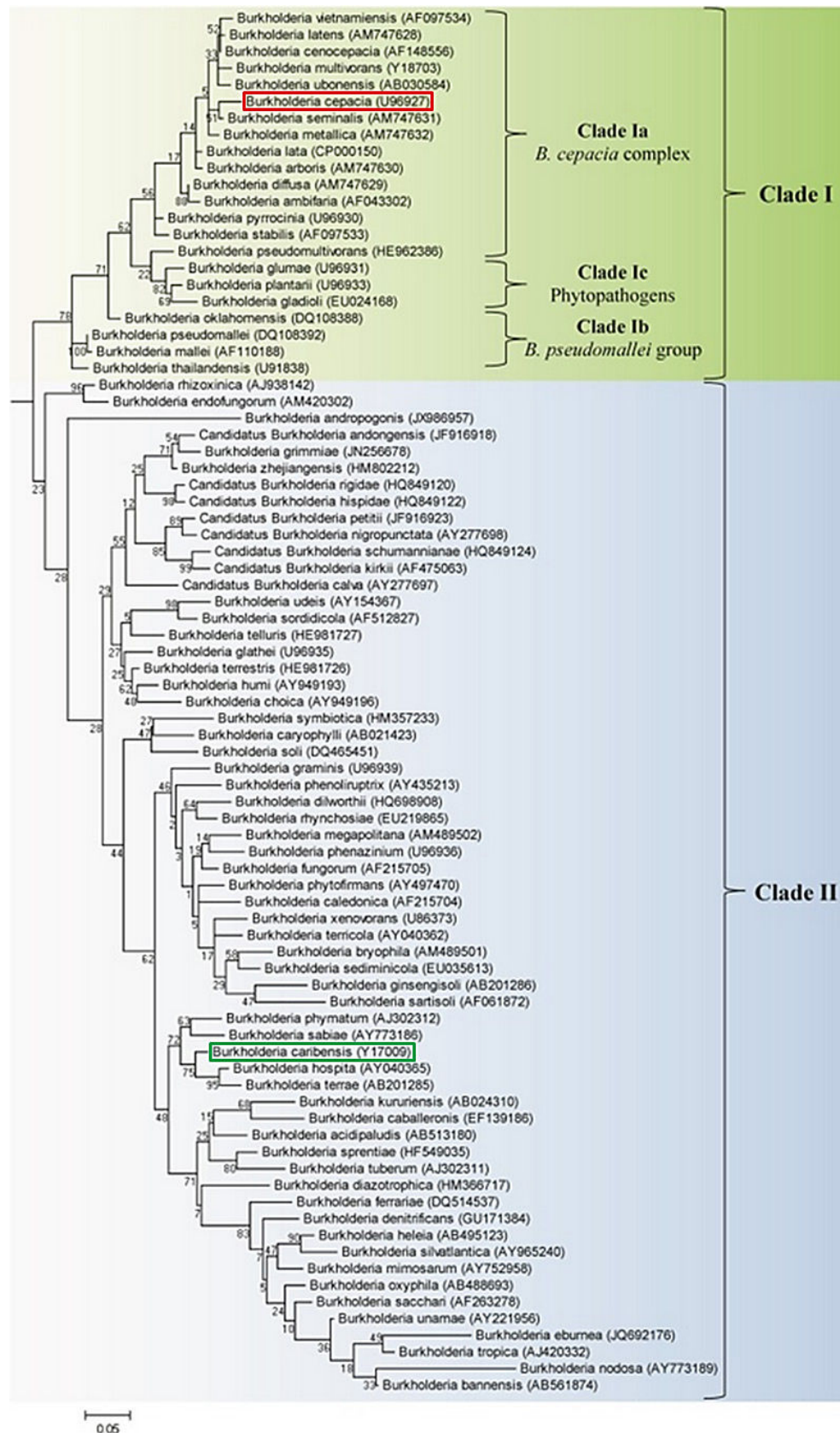


Figure 3.5 : Arbre phylogénique du genre *Burkholderia* basé sur l'ARN ribosomique 16S de 97 membres du genre. Le numéro d'accèsion de la séquence de l'ARN 16S a été indiqué entre parenthèses. D'après Sawana *et al.*, 2014. Encadré en rouge *B. cepacia*, en vert *B. caribensis*.

Cette nouvelle classification a récemment été acceptée officiellement par les instances *ad hoc* officialisant ainsi la nouvelle dénomination : *P. caribensis* (Oren et Garrity, 2015).

Cette espèce bactérienne produit un exopolysaccharide dans la structure a été résolue par Heyraud et coll. (Vanhaverbeke *et al.*, 2001, figure 3.6) et a fait l'objet d'une prise de brevet (n° 12/52871) le 29 mars 2012 avec une application en cosmétique (Hydreïs, Soliance/Givaudan).

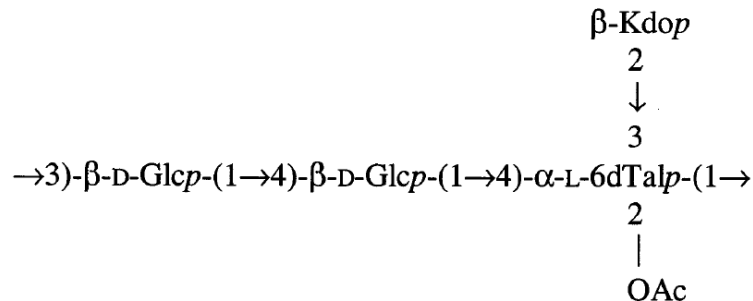


Figure 3.6 : Structure de l'exopolysaccharide produit par *P. caribensis* P71. Il s'agit d'un enchainement de molécules de D-glucose (D-Glc), 6-déoxy-L-talose (L-6dTal), acide 3-déoxy-D-manno-octa-2-ulonique (Kdo) et un groupe O-acétyle pour un ratio molaire de 2:1:1:1. (D'après Vanhaverbeke *et al.*, 2001).

En outre, il a été démontré que cette espèce avait la capacité de stimuler la croissance de l'amarante en stimulant l'absorption racinaire de l'azote (Parra-Cota *et al.*, 2014) et de solubiliser le phosphate contenu dans le minerai de fer (Delvasto *et al.*, 2009).

Ramlibacter tataouinensis TTB310

En 1931, la chute d'une météorite a été observée près de la ville de Tataouine en Tunisie (Lacroix 1931). Les plus gros fragments ont été collectés le lendemain de la chute, puis envoyés au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. La zone d'impact a été de nouveau prospectée en 1994 et de nombreux fragments de météorite altérés ont été échantillonnés. Ces fragments ont résidés dans le sable pendant 63 ans. Des observations en microscopie électronique à balayage de ces fragments ont révélé des zones d'altération à la surface des cristaux de météorite (pyroxène et chromite), et la présence de cristaux secondaires de calcite provenant de l'érosion terrestre, ce qui témoigne de la présence possible de formes bactériennes de petite taille (\varnothing 0,06 μm) (Barrat *et al.*, 1998)⁷ ; aucune altération n'étant visible sur les échantillons témoins de météorite conservés au MNHN de Paris. Dans l'objectif de rechercher une bactérie potentiellement responsable de cette altération, une souche bactérienne pléomorphe (TTB310) (Figures 3.7 et 3.8) a été isolée de ces fragments de météorite imbriqués dans le sol sableux (Gillet *et al.*, 2000). Il a été démontré que cette bactérie était capable de coloniser et d'altérer le pyroxène (Benzerara *et al.*, 2004a) et d'induire des biominéralisations en conditions contrôlées (Benzerara *et al.*, 2004b). Cette souche est la souche-type d'une nouvelle espèce, elle-même espèce-type d'un nouveau genre de bêtaprotéobactérie, *RamLibacter tataouinensis* (Heulin *et al.*, 2003).

⁷ Il a été montré par la suite que ces structures "nanobacteria-like" étaient de la calcite cristallisée (monocristal) entourée d'une fine couche de carbonate amorphe lui procurant cet aspect arrondi aux extrémités (Benzerara *et al.* 2003).

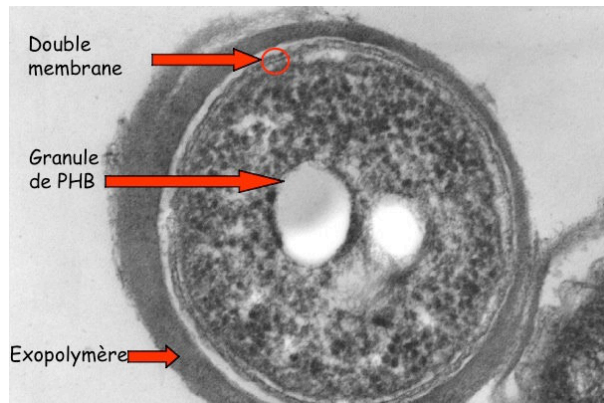


Figure 3.7 : Coupe d'un kyste de *Ramlibacter tataouinensis* observée en MET. Diamètre de la cellule : 0,8 μm .

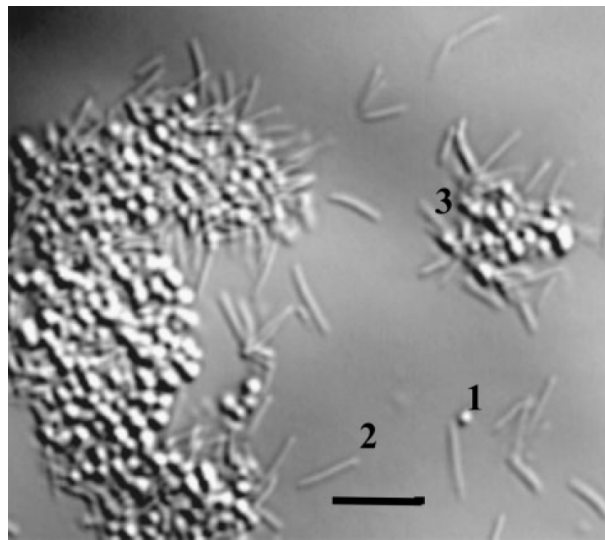


Figure 3.8 : Micrographie réalisée en microscopie à contraste de phase de *RamLibacter tataouinensis* TTB310 poussant en milieu liquide TSB/10^{ème} culture de 3 jours à 30°C. Ce cliché illustre la présence d'individus (1) sous forme sphérique (kyste), (2) de bâtonnets et (3) d'agrégats de kystes. La micrographie a été prise avec un microscope confocal à balayage laser Olympus Fluoview. Echelle : 4 μm . D'après Heulin *et al.*, 2003.

3.1.2 Sélection des souches bactériennes : essais préliminaires

3.1.2.1 Inoculation de plantes cultivées *in vitro*

Afin de tester la capacité des souches bactériennes listées ci-dessous et dont nous avons résumé les principaux effets PGPR connus, à croître sur le rhizoplan du colza, nous avons réalisé une première série d'essais en simple inoculation au moyen d'un dispositif expérimental qui sera conservé au fil de ce travail pour les expérimentations *in vitro*.

Récapitulatif des effets PGPR connus chez les souches testées.

	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	<i>P. brassicacearum</i> NFM11702	<i>E. radicinans</i> NO9	<i>R. alarii</i> YAS34	<i>P. agglomerans</i> NO30	<i>P. caribensis</i> P71	<i>R. tataouinensis</i> TTB310
Stimulation de la croissance	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Production de phytohormones	✓	✓	✓		✓		
Capacité de biocontrôle	✓	✓					
Production de métabolites antifongiques	✓	✓					
Structuration du sol				✓		✓	
Solubilisation d'éléments minéraux			✓		✓	✓	✓
Fixation libre de l'azote atmosphérique			✓		✓		

Matériels et méthodes

Souches étudiées

- *Paraburkholderia caribensis* (MWA)P71,
- *Enterobacter radicinans* NO9,
- *Pantoea agglomerans* NO30,
- *Pseudomonas brassicacearum* NFM421 et 11702,
- *RamLibacter tataouinensis* TTB310,
- *Rhizobium alarii* YAS34.

Matériel biologique

Les essais ont été réalisés dans un premier temps avec des graines d'arabette (*A. thaliana*) de génotype Col-0 fraîchement récoltées et conservées hermétiquement en chambre froide. Dans un deuxième temps, les essais ont été réalisés avec des semences de colza d'hiver (*B. napus*), variété Sensation lot K11455 commercialisées par Semences de France (60 rue L. Beauchamp, 59930 La Chapelle d'Armentières), et conservées hermétiquement en chambre climatisée à 9 °C. Les graines ont été stérilisées à l'eau de Javel puis conservées à 6 °C (Cf. M&M 1).

Souches bactériennes

Pour permettre leur suivi par microscopie confocale, les souches NO30, P71, YAS34 et TTB310 ont été marquées à la GFP (Green Fluorescent Protein) à l'aide d'une construction plasmidique. De même, la souche NFM421 a été marquée sur le chromosome avec une GFP et une Ds-Red (marquage orangé). Ce travail de marquage avait été réalisé antérieurement à ce travail de thèse.

Dans le but de disposer d'un maximum de combinaisons de couleurs, il a été nécessaire de procéder à de nouveaux marquages pour les autres souches utilisées. Les souches 11702 et NO9 ont été marquées à la GFP et à la mKate2 (marquage rouge vif), la souche NO30 à la mKate2 et la souche P71 à la mKate2.

Marquage fluorescent des souches bactériennes

Des cellules compétentes de ces souches bactériennes ont été produites en vue de transformations au CaCl₂ ou par électroporation selon le cas. Le plasmide à large spectre d'hôte utilisé pour la

transformation de ces cellules est un dérivé du pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995) intégrant une séquence codant pour une protéine fluorescente verte (GFP) ou rouge (mKate2) selon le besoin. Le détail des ces étapes est donné en M&M 1.

Préparation du dispositif expérimental

Les plantules de colza ont été cultivées en boîtes de Petri « carrées » stériles contenant 45 mL de milieu Hoagland dont la concentration a été diminuée de moitié (cf. Annexe 2, Hoagland 0,5X) et dont le gélifiant a été remplacé par du Phytigel™ (Sigma-Aldrich, USA) à 4 g.L⁻¹. Une solution de milieu Hoagland 0,5X peu gélifié avec de l'agar à 3,5 g.L⁻¹ a été préparée puis laissée à refroidir à environ 40 °C. L'inoculum a été ajouté en quantité suffisante pour atteindre une concentration finale de 1.10³ cfu.mL⁻¹. Une bande d'un mL de cet inoculum a été coulée sur le premier quart de la boîte, puis 5 graines stérilisées ont été semées de façon à être uniformément espacées. Les boîtes de Petri ont été scellées avec de la bande de sparadrap Micropore™ (3M™, USA) perméable à l'air (Figure 3.9).

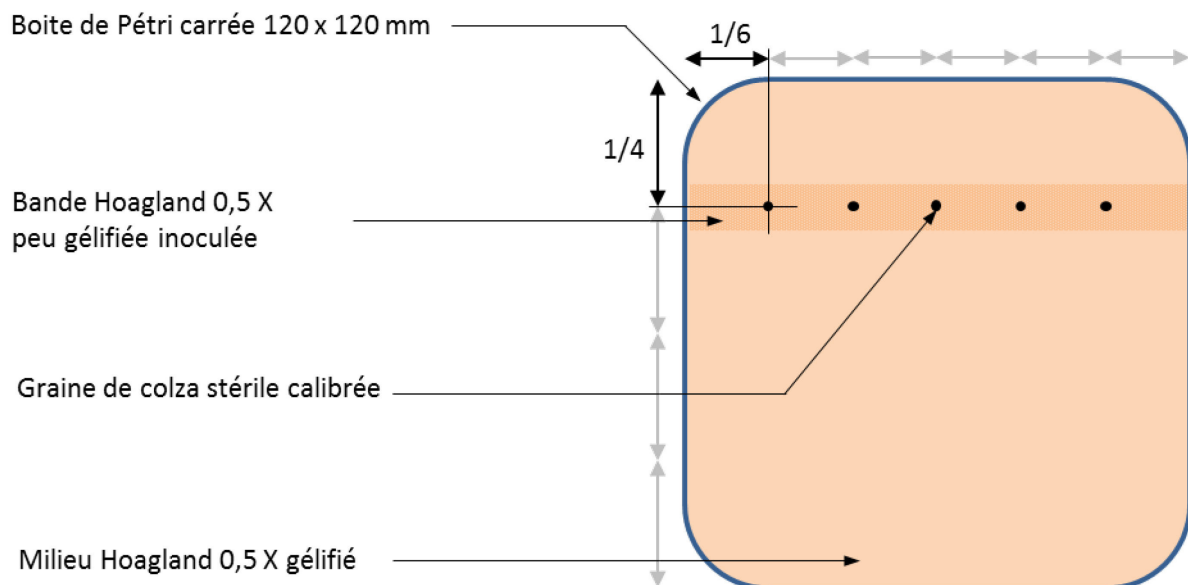


Figure 3.9 : Représentation schématique du dispositif expérimental standardisé de culture des plantules de colza en présence des souches bactériennes candidates sur boîte de Petri.

Préparation du dispositif de culture :

Une fois les boîtes de Petri scellées, elles ont été transférées en phytotron à jours longs et placées verticalement pour une culture de 5 jours. Consignes du phytotron : jour : 16 h à 25 °C, nuit : 8 h à 19 °C, éclairage moyen : 130 μmol de photons.m⁻².s⁻¹.

Résultats

Cet essai nous a tout d'abord permis de valider le dispositif expérimental sur colza pour la détection de colonies bactériennes secondaires (Figure 3.10) et de définir une fenêtre maximale d'observation de 5 jours pour des boîtes carrées de 120 mm de côté (au-delà, l'apex racinaire atteint le fond de la boîte rendant toute observation de celui-ci impossible).

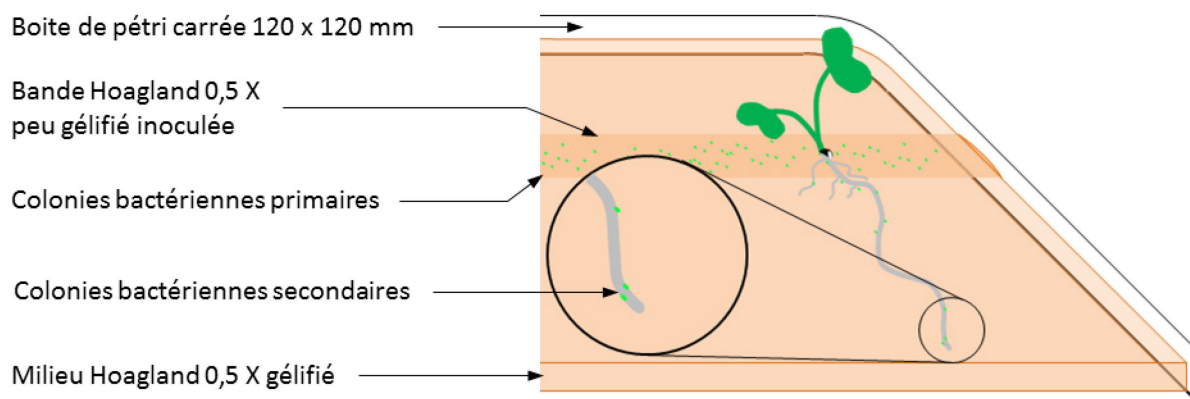


Figure 3.10 : Représentation schématique du dispositif expérimental standardisé de culture des plantules de colza en vue de la détection de colonies secondaires des souches candidates sur la racine par microscopie optique à épifluorescence.

Cet essai préliminaire nous a permis de confirmer par microscopie optique à épifluorescence que les souches *P. brassicacearum* NFM421 et 11702, *E. radicincitans* NO9, *P. agglomerans* NO30, *P. caribensis* P71, *R. alarii* YAS34 ont la capacité de se maintenir, de croître et de coloniser le milieu en condition monoxénique en présence d'*A. thaliana* ou de *B. napus*.

À l'inverse, il nous a été impossible d'observer la présence de *R. tataouinensis* TTB310 sur les racines *A. thaliana* ou de *B. napus* en dehors de la bande d'inoculation (Figure 3.11). Il semble que la souche TTB310 survive dans la bande d'inoculation (présence de fluorescence issue de la transcription de la GFP) mais ne prolifère pas. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ce résultat : il se peut que les exsudats racinaires des plantules ne renferment pas les substances essentielles à la croissance de TTB310 ou, qu'à l'inverse, elles contiennent des substances inhibitrices de sa croissance. Ce manque d'adaptation de *R. tataouinensis* à la rhizosphère peut effectivement s'expliquer par le fait que cette espèce ne métabolise pas les glucides classiquement exsudés par la plante (glucose, fructose...) préférant comme source de carbone et d'énergie l'acétate ou le lactate. En outre, il est possible que le dispositif expérimental ne convienne pas à sa croissance : les boîtes sont cultivées en pleine lumière alors que les données actuelles disponibles sur la souche TTB310 mettent en évidence le rôle crucial de la lumière dans l'inhibition de sa croissance sous forme de kystes (G. De Luca, communication personnelle).

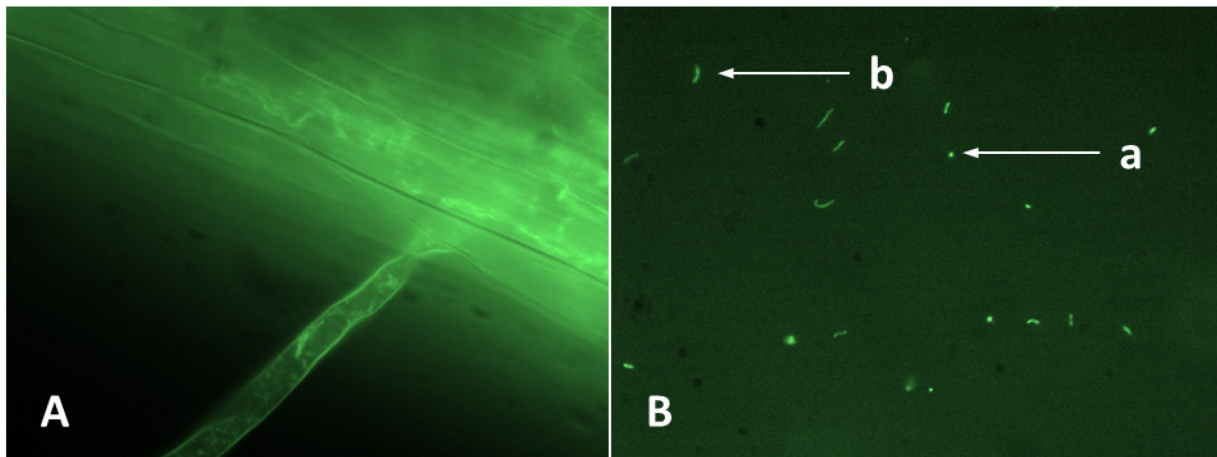


Figure 3.11 : (A) Observation réalisée par microscopie optique à épifluorescence (couleurs artificielles) sur une portion de racine portant un poil absorbant d'une plantule d'*A. thaliana* illustrant l'absence de cellules fluorescentes de *R. tataouinensis* TTB310, la couleur verte diffuse observée étant l'autofluorescence de la racine causée par une observation prolongée. (B) Présence de cellules à l'état libre détachées de la bande d'inoculation lors du prélèvement d'un échantillon racinaire. On peut observer les deux formes de la souche TTB310 : kyste (a) et bâtonnet (b).

D'autre part, par l'observation des inoculations avec *P. agglomerans* NO30, nous avons pu mettre en évidence un phénomène intéressant, décrit sur le riz et le blé (Achouak *et al.*, 1994), mais qui ne semble pas avoir été décrit sur le colza. En effet, il nous a été possible de visualiser la présence de symplasmata sur la racine de plantules d'arabette (*A. thaliana*) et de colza (*B. napus*) (Figure 3.12).

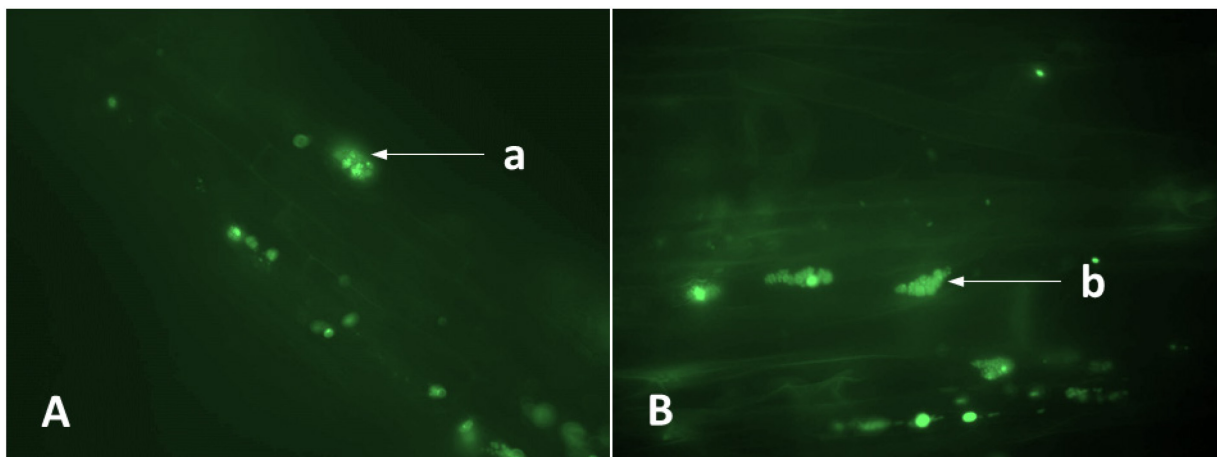


Figure 3.12 : (A) Observation réalisée par microscopie optique à épifluorescence (couleurs artificielles) sur une portion de racine d'une plantule d'*A. thaliana* illustrant la présence de symplasmata de *P. agglomerans* NO30 (a). (B) Observation réalisée dans les mêmes conditions sur une portion de racine d'une plantule de *B. napus* illustrant la présence de symplasmata (b).

A ce stade de l'étude, **nous avons choisi d'écarter *R. tataouinensis* TTB310 de l'étude** en raison de ce résultat préalable négatif et de l'investissement en temps nécessaire pour modifier le dispositif expérimental pour vérifier les hypothèses précédemment émises (effet de la mumièrè).

3.1.2.2 Inoculation des plantes cultivées dans un sol

Nous étant assurés de la capacité de ces souches candidates à croître en interaction avec les plantules de colza cultivées en conditions monoxéniques, nous avons fait évoluer le dispositif expérimental pour nous rapprocher de conditions de cultures réelles en utilisant un sol agricole non stérilisé tout en gardant un mode d'inoculation expérimental.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Nous avons choisi, pour sa proximité et son historique connu, un sol de surface provenant d'une parcelle située en à proximité d'Aix-en-Provence (43°33'45.58" N ; 05°28'38.78" E), sur laquelle est produit du blé en monoculture depuis plusieurs années. Ce sol a été analysé et qualifié d'argilo-limoneux calcaire à pH 8,19 (analyse pédologique en Annexe 5).

Les essais ont été réalisés avec des semences de colza d'hiver (*Brassica napus*) de variété Sensation lot K11455 commercialisées par Semences de France (60 rue L. Beauchamp, 59930 La Chapelle d'Armentières) conservées hermétiquement en chambre climatisée à 9 °C. Les graines ont été stérilisées à l'eau de Javel en suivant un protocole moins agressif, adapté de celui précédemment utilisé (Cf. M&M 2)

Préparation des inoculums

Les souches suivantes ont été utilisées pour cette étude :

E. radicincitans NO9 marquée à la mKate2 (Résistance à la Kanamycine : Kan^R)

P. caribensis P71 marquée à la mKate2 (Kan^R)

P. agglomerans NO30 marquée à la mKate2 (Kan^R)

P. brassicacearum NFM421 marquées à la dsRed (Kan^R)

P. brassicacearum 11702 marquée à la mKate2 (Kan^R)

R. alamii YAS34 marquées à la GFP (Résistance à la tétracycline : Tet^R)

Chaque souche a été cultivée en suivant la méthode précédemment décrite dans le M&M 1, en utilisant ici un volume de 5 mL de préculture pour inoculer 250 mL de milieu TSB/10^{ème}. Le milieu de culture a ensuite été éliminé et remplacé par de l'eau (Cf. M&M 2). Concentration finale estimée : 1.10⁷ à 1.10⁸ CFU/mL⁻¹.

Inoculation du sol

Pour chaque modalité, le sol a été réhydraté à l'aide de l'inoculum précédemment produit. Pour un pot (300 g finaux), 45 mL d'inoculum et 255 g de sol ont été utilisés. Le mélange a été réalisé à l'aide de sachets dans lesquels ont été ajoutés le sol et l'inoculum. Les sachets ont été fermés hermétiquement, puis agités et pétris vigoureusement jusqu'à obtenir l'homogénéité désirée. Une masse de 300 g de sol a été ajoutée dans chaque pot et tassée à 1 cm du bord, puis placée dans des bacs contenant 2 cm d'eau osmosée.

Quantification de l'inoculum a posteriori

Les suspensions mères utilisées pour l'inoculation du sol ont été diluées en série et étalées sur un milieu solide TSA/10^{ème} puis cultivés 12 à 24 h à l'obscurité et à 28 °C.

Tableau 3.2 : Estimation *a posteriori* de la concentration bactérienne du sol inoculé.

	Souches				
	NFM421	11702	NO9	NO30	P71
Concentration CFU.g ⁻¹ de sol	2,1.10 ⁸	1,9.10 ⁶	4,0.10 ⁷	3,0.10 ⁷	2,8.10 ⁷

Semis des graines de colza

Cinq graines stérilisées ont été semées par pot à environ 5 mm de profondeur. Un arrosage a été réalisé par le haut et une mince couche de sable de rivière a été déposée en surface pour limiter l'évaporation de l'eau et le développement de microalgues dû à l'éclairage. Les semis ont ensuite été placés en phytotron (jour : 12 h à 25 °C, nuit 12 h à 19 °C, éclairage : 250 µmoles photons.m⁻².s⁻¹).

Suivi et éclaircissement des cultures

Dès le début de l'essai, des éclaircissements quotidiens des semis ont été réalisés en supprimant les plantules de colza surnuméraires pour garantir une homogénéité du nombre de plantules par pot (une par pot) et en déracinant toutes les repousses de plantules étrangères au semis.

Randomisation de l'essai

Afin de réaliser une randomisation, l'arrosage a été réalisé par le haut en quantité suffisante pour permettre aux plantules de pousser et pour permettre aux bacs de rétention de sécher. Pour cela, les pots ont été pesés quotidiennement, puis arrosés par la quantité d'eau évaporée pendant 24 h. Une fois les bacs secs (au dixième jour de culture), les modalités ont été réorganisées de manière à former 10 blocs homogènes.



Bloc 1			Bloc 3			Bloc 5			Bloc 7			Bloc 9		
11702		YAS34	NFM421		bordure	Eau		11702	Eau		P71	Eau		NO30
	NO9			NO9			NFM421			NFM421			P71	
bordure		NO30	P71		Eau	NO30		YAS34	NO9		11702	YAS34		11702
	Eau			NO30			P71			NO30			NO9	
P71		NFM421	YAS34		11702	NO9		bordure	bordure		YAS34	NFM421		bordure
Bloc 2			Bloc 4			Bloc 6			Bloc 8			Bloc 10		
P71		NFM421	NFM421		NO9	NO30		NFM421	NO30		P71	NFM421		bordure
	bordure			NO30			11702			11702			NO30	
NO30		NO9	Eau		11702	bordure		NO9	NO9		Eau	YAS34		NO9
	YAS34			P71			YAS34			YAS34			11702	
Eau		11702	YAS34		bordure	Eau		P71	NFM421		bordure	P71		Eau

Figure 3.13 : Disposition de l'essai au sein dans le phytotron. Chaque modalité est représentée une fois par bloc. Une modalité « bordure » a été ajoutée pour combler la place libre au sein de chaque bloc. Eau : témoin négatif, *P. brassicacearum* NFM421, *P. brassicacearum* 11702, *E. radicincitans* NO9, *P. agglomerans* NO30, *P. caribensis* P71, *R. alamii* YAS34.

Arrêt de l'essai

Selon l'expérimentation menée en aval, 1 à 3 blocs ont été prélevés. Pour cela l'arrosage a été interrompu 4 j avant le prélèvement.

Echantillonnage de l'essai

Chaque modalité a été prélevée séparément en prenant soin de traiter toutes les modalités d'un bloc avant de passer au suivant. Les plantules ont été dépotées et les mottes de sol doucement écrasées, afin de libérer les racines de leur sol adhérent. Un échantillon de 100 mg de sol a été mis de côté et conservé à 4 °C pour les mesures de fluorescence. Les racines ont été récupérées, puis débarrassées manuellement de leur sol adhérent. Les racines ont été sectionnées au niveau du collet puis broyées stérilement. Les parties aériennes (tiges et feuilles) des plantules inoculées par *E. radicincitans* NO9 et par *P. agglomerans* NO30 ont été prélevées et conservées stérilement à 4 °C.

Mise en culture des échantillons de sol et de racines

Pour visualiser la présence de souches bactériennes marquées, les échantillons ont été dilués et mis en culture sur milieu sélectif Cf. (M&M 2).

Mise en culture des échantillons des parties aériennes

Pour les plantules inoculées avec les souches NO9 et NO30, des fragments de tiges ont été prélevés stérilement. Ils ont ensuite été lavés par agitation dans 10 mL d'eau Ultrapure stérilisée, puis sectionnés stérilement dans le sens de la longueur. L'ensemble de ces échantillons a été mis en culture sur milieu solide TSA/10^{ème} contenant ou non 15 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Les boîtes ont été incubées 48 h à l'obscurité à 28 °C.

Observation et comptage des colonies fluorescentes

La recherche de colonies fluorescentes a été réalisée directement sur boîte de Petri à l'aide d'un microscope binoculaire à fluorescence Leica MZ FLIII Stereo-Fluorescence Microscope (Leica, Deutschland).

Résultats

Effet sur la structuration du sol

Lors de la préparation de l'essai, nous avons observé un phénomène spectaculaire en présence de l'inoculum de *P. caribensis* P71 : la production de son exopolysaccharide a fortement structuré le sol comme en témoigne la figure 3.14.



Figure 3.14 : Différence de structuration du sol entre le témoin négatif (A) ou en présence de l'inoculum de *P. caribensis* P71 (B). Le sol prend une texture argileuse collante et très compacte, très difficile à désagréger.

En outre, au fil de l'expérimentation, les modalités inoculées par la souche P71 présentent un aspect beaucoup plus compact que les autres modalités et nettement moins hydraté. Cette observation s'est confirmée par la suite lors du dépouillement de l'essai. A titre indicatif, bien que les plantules aient pour la plupart réussi à croître, elles ont présenté un retard de croissance vis-à-vis des autres modalités : en moyenne 140 mg de masse de matière sèche aérienne en présence de la souche P71 contre 260 mg pour le témoin non inoculé ont été mesurés lors de la première expérience ainsi qu'une compacité supérieure et un état hydrique clairement déficitaire.

Suivi des souches candidates sur le rhizoplan de plantules de colza cultivées en sol non stérilisé

Suite à une erreur expérimentale, les données concernant les modalités *R. alamii* YAS34 n'ont pu être récoltées.

Le dépouillement de l'essai a été réalisé selon trois échéances, chacune venant apporter des informations complémentaires aux précédentes. La première échéance a porté sur le dépouillement de trois blocs pour localiser les souches inoculées sur les racines de colza. Les échantillons ont été préparés de façon à révéler les souches inoculées par fluorescence des souches bactériennes candidates (marquées à l'aide d'une protéine fluorescente) après croissance sur milieu nutritif. L'observation des étalements réalisés sur milieu sélectif ou non a permis de mettre en évidence la présence des souches inoculées pour les modalités *P. brassicacearum* NFM421, *P. brassicacearum* 11702 et *E. radicincitans* NO9 sur le rhizoplan des plantules de colza. Cette localisation semble représenter la niche écologique de ces souches car, la souche NFM421 mise à part, l'analyse des échantillons de sol prélevés n'a pas pu mettre en évidence la présence des souches candidates à

distance de la racine (Tableau 3.3). Ce résultat est surprenant en raison du mode opératoire utilisé qui consistait en une inoculation complète du sol contenu dans le pot. En outre, du fait de la particularité des souches NO9 et NO30, qui ont la capacité à s'associer au végétal sous forme endophytique, une détection a été réalisée sur les tiges des plantules. Nous avons pu visualiser sur l'empreinte des fragments de tiges imprimées sur la gélose la présence de colonies bactériennes marquées nous laissant supposer que ces souches candidates ont su se maintenir sur la partie aérienne des plantes sans pouvoir préjuger précisément du mode d'association (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Résumé des observations réalisées sur les 3 premiers blocs : « Signal fluo. » désigne les modalités pour lesquelles la présence des souches candidates (marquées à l'aide d'une protéine fluorescente) a pu être détectée, « - » désigne une observation négative, « nd » désigne l'absence de donnée.

		Prélèvement 1 - 31 jours - 3 blocs		
		Ech. racinaires	Ech. sol	Ech. tiges
Modalités	Eau	-	-	nd
	NFM421	Signal fluo.	Signal fluo.	nd
	11702	Signal fluo.	-	nd
	NO9	Signal fluo.	-	Signal fluo.
	NO30	-	-	Signal fluo.
	P71	-	-	nd

Afin de confirmer cette observation, une deuxième série de prélèvements a été réalisée trois semaines plus tard en recentrant les recherches sur les modalités *E. radicincitans* NO9 et *P. agglomerans* NO30. De la même façon, des échantillons de racines et de tiges ont été mis en culture et ont permis de confirmer la présence de la souche NO9 uniquement sur les racines. (Tableau 3.4). La souche NO30 n'a pas pu être détectée ni sur les racines ni sur les tiges (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Résumé des observations réalisées sur les 3 blocs suivants : « Signal fluo. » désigne les modalités pour lesquelles la présence des souches candidates (marquées à l'aide d'une protéine fluorescente) a pu être détectée, « - » désigne une observation négative, « nd » désigne l'absence de donnée.

		Prélèvement 2 - 52 jours - 3 blocs		
		Ech. racinaires	Ech. sol	Ech. tiges
Modalités	Eau	nd	nd	nd
	NFM421	nd	nd	nd
	11702	nd	nd	nd
	NO9	Signal fluo.	nd	-
	NO30	-	nd	-
	P71	nd	nd	nd

Un dernier prélèvement a eu lieu 5 semaines plus tard uniquement sur les parties racinaires en raison de la perte de signal sur les compartiments « sol » et « tiges ». Cette dernière observation

confirme la présence de des souches NFM421, 11702 et NO9 sur le rhizoplan des plantules de colza et confirme la disparition de la souche NO30 et de la souche P71 (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Résumé des observations réalisées sur les 3 blocs suivants : « Signal fluo. » désigne les modalités pour lesquelles la présence des souches candidates (marquées à l'aide d'une protéine fluorescente) a pu être détectée, « - » désigne une observation négative, « nd » désigne l'absence de donnée.

		Prélèvement 3 - 89 jours - 3 blocs		
		Ech. racinaires	Ech. sol	Ech. tiges
Modalités	Eau	-	nd	nd
	NFM421	Signal fluo.	nd	nd
	11702	Signal fluo.	nd	nd
	NO9	Signal fluo.	nd	nd
	NO30	-	nd	nd
	P71	-	nd	nd

L'hypothèse de la présence des souches NO9 et NO30 sous forme endophytique n'a pas pu être établie, car seule l'observation par microscopie confocale des tissus prélevés aurait pu nous permettre de l'affirmer. En outre, si ces souches qui sont adaptées à ce mode de vie s'étaient installées au niveau des tissus, il paraît peu probable qu'elles n'aient pas été retrouvées par la suite. Aussi, la fluorescence observée lors de la première échéance pourrait être due à la présence de bactéries inoculées en surface des tissus foliaires, liée aux manutentions lors du dépouillement.

En conclusion, à ce stade de l'étude, les souches NFM421, 11702 et NO9 semblent les plus aptes à se maintenir dans le sol utilisé (non stérilisé) dans le cas d'une très forte inoculation (entre 1.10^6 et 1.10^8 CFU.g⁻¹ de sol). En revanche, il paraît prématuré d'écarter la souche P71 de l'étude. En effet, la très forte inoculation du sol utilisé dans cette expérience est incompatible avec une utilisation expérimentale en conditions réelles car l'inoculation se fera par aspersion au niveau des semis et non pas en apportant en surface une fraction de sol fortement inoculée comme cela a été fait dans l'expérience précédente. Lors des prochaines expérimentations, le mode d'inoculation sera modifié pour éviter que l'inoculation ne se traduise par des effets négatifs sur la croissance des plantes en présence de la souche P71. Nous avons donc choisi de conserver cette souche candidate pour les premiers essais de co-inoculation.

3.1.2.3 Solubilisation bactérienne du phosphate

Introduction : les PGPR et la solubilisation du phosphate

Parmi les traits phytobénéfiques les plus couramment recherchés, le développement de méthodes d'enrichissement des sols en utilisant des bactéries présentant une bonne capacité à solubiliser les éléments minéraux et plus particulièrement le phosphate dans le sol, constitue un enjeu important pour l'agriculture de demain. En effet, le phosphore, derrière l'azote, est un des éléments minéraux majeurs nécessaires à la croissance optimale des plantes.

L'implication du phosphore dans le métabolisme de la plante est visible à de nombreux niveaux tels que le développement des racines et des tiges, la floraison, la formation et la maturation du grain, la qualité du grain, les mécanismes de fixation de l'azote par les légumineuses ainsi que les mécanismes de résistance des plantes aux maladies (Khan *et al.*, 2009).

La disponibilité du phosphate dans le sol est variable et s'étale sur une fourchette de 400 à 1200 mg.kg⁻¹ de sol (Rodriguez & Fraga, 1999). Il s'agit d'une ressource terrestre dont le cycle de vie dans le sol se traduit par des cycles d'oxydation et de réduction fortement dépendants de l'activité des microorganismes du sol et de la rhizosphère. Il peut être directement absorbé par les cellules végétales essentiellement sous les formes dites solubles : HPO₄²⁻ et H₂PO₄⁻. La majeure partie des stocks de phosphore dans le monde est sous forme de dépôts géologiques minéralisés insolubles (apatite, hydroxyapatite et oxyapatite) ne pouvant pas être directement absorbés par la plante. En effet, dans le sol, le phosphore est complexé à des oxydes de fer, d'aluminium et de manganèse, ce qui le rend peu soluble et donc peu assimilable par les plantes. Sa biodisponibilité sous forme soluble dans le sol est donc très faible, voisine de 1,0 mg.kg⁻¹ de sol (Goldstein, 1994 d'après Yadav & Verma, 2012). En conclusion, la majorité des sols agricoles contiennent de grandes quantités de phosphore potentiellement utilisables comme biofertilisant, mais sous une forme insoluble les rendant inaccessibles aux végétaux (Rodriguez & Fraga, 1999).

Du fait de la faible proportion de phosphate disponible pour la plante, un amendement important de cet élément est nécessaire pour garantir un bon rendement des cultures. En 1993, le coût en phosphate nécessaire pour une production de phosphate suffisante pour couvrir les besoins de fertilisation mondiaux a été estimé à 4 milliards de dollars par an. Pour donner un ordre de grandeur, la quantité consommée en 1989 a été estimée à 54,9.10⁶ tonnes (Goldstein *et al.*, 1993). Selon un rapport récent de l'Organisation des Nations Unies (Mayo *et al.*, 2015), la consommation de fertilisants phosphatés (minéral sous forme P₂O₅ et organique sous forme H₃PO₄) est estimée à 42,7.10⁶ tonnes en 2014 et prévue à 46,7.10⁶ tonnes en 2018. Cette consommation est répartie entre l'Asie (58 %), l'Amérique (29 %), l'Europe (9 %), l'Afrique (4 %) et l'Océanie (0,5 %). Actuellement la production mondiale est un peu supérieure aux besoins (54,3.10⁶ tonnes) et, entre 2014 et 2018, elle est supposée progresser de 2,7 % face à une demande qui devrait augmenter de 2,3 %.

Selon certaines études, malgré les hausses de production et si rien ne change, ce système est condamné car la ressource mondiale en matière première phosphatée s'amenuiserait et pourrait même faire défaut dès la fin de ce siècle (Herring & Fantel, 1993). En outre, les importantes quantités de phosphate apportées pour la nutrition des cultures sont rapidement complexées aux oxydes précédemment cités en fonction du pH des sols et deviennent donc insolubles et non disponibles pour les plantes cultivées. En effet on estime que 75 à 90 % de la part de la fertilisation phosphatée

est complexée et précipitée en raison de la forte réactivité aux cations tels que Al^{3+} et Fe^{3+} dans les sols acides et Ca^{2+} dans les sols calcaires (Stevenson & Cole, 1986 ; Vig & Dev, 1984 d'après Gyaneshwar *et al.*, 2002). En plus des pertes causées par la complexation du phosphate avec ces cations, une partie importante des complexes formés (52 %) est perdue par érosion (Ringeval *et al.*, 2015), participant ainsi au phénomène d'eutrophisation des écosystèmes aquatiques environnants (Sharma *et al.*, 2013).

La solubilisation du phosphate par les bactéries du sol

La capacité de certaines espèces bactériennes à solubiliser le phosphate au sein de la rhizosphère est connue depuis 1903 (Khan *et al.*, 2007). Appartenant principalement aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter Flavobacterium* et *Erwinia* (Rodriguez & Fraga, 1999 ; Khan & al, 2009), les espèces sont connues pour pouvoir solubiliser le phosphate minéral présent dans le sol sous forme de phosphate di et tricalcique, d'hydroxyapatite et de phosphorite. Le criblage de cette activité bactérienne se fait généralement *in vitro* en utilisant un milieu dit de Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) permettant de mettre en évidence l'action des phosphatases bactériennes par l'apparition d'un halo de solubilisation autour des colonies bactériennes. Des tests quantitatifs menés en milieu liquide par des méthodes colorimétriques permettent de confirmer ces observations.

Les bactéries solubilisant le phosphate comme PGPR

De nombreuses études ont porté sur la capacité de ces bactéries à stimuler la croissance des plantes et il apparaît que, bien que de telles souches soient nombreuses, elles colonisent insuffisamment la rhizosphère pour être compétitives (Rodriguez & Fraga, 1999). D'où l'intérêt de pouvoir inoculer de telles bactéries solubilisatrices de phosphate insoluble pour déplacer les équilibres pour le rendre disponible pour la plante. D'autres études, basées sur des inoculations simples et des co-inoculations de bactéries solubilisant le phosphate ont pu mettre en évidence un effet de stimulation de celles-ci sur plusieurs plantes. Cependant l'effet de ces inoculum est fortement influencé par de multiples facteurs tels que le cultivar utilisé ou le type de sol sur lequel il est cultivé.

Les mécanismes de solubilisation des phosphates

- *Phosphates minéraux*

Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates minéraux passe par la production d'acides organiques par la plante acidifiant ainsi le milieu environnant. Cela a pour conséquence la libération d'un Pi remplacé au sein du minéral par un ion Ca^{2+} (Goldstein *et al.*, 1994). En ce qui concerne les bactéries, la production de ces acides organiques est bien connue et il semble que le principal acide produit soit l'acide gluconique (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Burkholderia*). Chez *Rhizobium* et *Bacillus*, l'acide le plus couramment décrit est l'acide 2-cétoglutarique. Chez d'autres *Bacillus*, les acides lactiques, maloniques et succiniques ont pu être décrits. Des essais chimiques de neutralisation par NaOH et biologiques en traitant des souches de protéobactéries par la pepsine démontrent que leur capacité à solubiliser le P minéral est d'ordre essentiellement chimique par oxydation directe du glucose en acide gluconique ou en acide 2-cétogluconique, et non pas enzymatique (Goldstein *et al.*, 1995). D'autres mécanismes, moins représentatifs, présents chez certaines souches bactériennes ou fongiques ont été proposés : acidification du milieu par H^+ , liée à la respiration cellulaire ou à

l'assimilation des ions NH_4^+ , (Illmer and Schinner, 1995) et des acides inorganiques comme les acides nitrique, carbonique, et sulphidrique. Leur contribution paraît moins importante.

- *Minéralisation du phosphate organique*

La solubilisation du phosphate organique est appelée minéralisation. Elle est réalisée par les microorganismes du sol à partir des restes des végétaux et des animaux lors du processus de décomposition. Essentiellement réalisée par des espèces saprophytes, elle consiste en la formation du radical orthophosphate PO_4^{3-} à partir de molécules carbonées : les acides nucléiques, phospholipides et sucres phosphates étant facilement minéralisables, les acides phytiques, polyphosphates et phosphonates étant plus longs à minéraliser. Cette activité est, elle aussi, fortement influencée par les conditions environnementales notamment le pH : un pH alcalin stimule le processus de minéralisation. Cette minéralisation est essentiellement réalisée par des phosphatases (ou phosphohydrolases aussi appelées phosphomonoestérases) qui hydrolysent les liaisons phosphoester et phosphoanhydre. Il s'agit d'enzymes dites « non-spécifiques » et sont classées en deux groupes : phosphatases acides (dont l'action est prédominante dans les sols acides) et alcalines (dont l'action est prédominante dans les sols alcalins et neutres, Sharma *et al.*, 2013). Certaines de ces enzymes ont une action à distance car sécrétées, d'autres membranaires ayant une action au contact avec la membrane externe. Dans un sol, le phosphate organique est principalement retrouvé sous forme de phytate (ou myoinositolhexakisphosphate) (Gerke, 2015). Le phytate est le composant essentiel des graines et du pollen des plantes. Sa présence dans le sol est essentiellement liée au débris végétaux qu'il contient et à la présence de fumure (Gerka, 2015). La capacité des plantes à minéraliser le phosphate organique est très limitée mais certains microorganismes de la rhizosphère possèdent des phosphatases spécifiques telles que les phosphonotases ou encore les phytases qui dégradent spécifiquement le phytate (Sharma *et al.*, 2013). En plus de l'activité de solubilisation des phosphates minéraux, un grand nombre de bactéries rhizosphériques appartenant aux genres *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Klebsiella* ont démontré leur capacité à dégrader les molécules organiques libérant ainsi du phosphate soluble et disponible (Rodriguez & Fraga, 1999).

Ces mécanismes de solubilisation sont résumés dans la figure 3.15 suivante

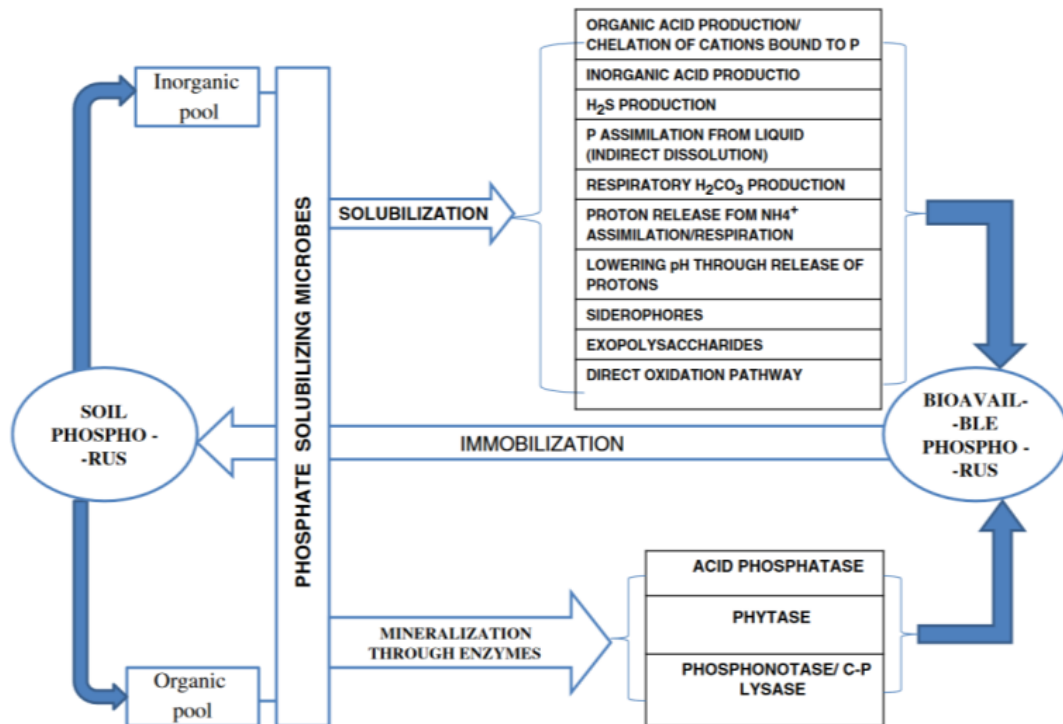


Figure 3.15 : Représentation schématique des mécanismes de solubilisation du P dans le sol par les microorganismes solubilisateur des phosphates (Sharma *et al.*, 2013).

Criblage des souches candidates de cette étude sur leur capacité à solubiliser le phosphore minéral

Plusieurs méthodes sont utilisables dans le but de déterminer la quantité de phosphore présente dans le sol. Selon le type de réactif utilisé, le devenir du phosphore recherché et les caractéristiques de l'échantillon de sol utilisé, certaines de ces méthodes semblent plus appropriées. Fardeau *et al.* (1988) ont entrepris un travail de comparaison de ces méthodes qui a abouti à la conclusion selon laquelle la méthode dite d'Olsen semble la plus appropriée à l'étude du phosphore échangeable dans les sols calcaires.

Des analyses de sol réalisées par un laboratoire partenaire d'InVivo Agrosolutions avec la méthode d'Olsen ont qualifié de très faible la quantité de phosphore échangeable disponible dans le sol que nous avons utilisé pour toutes nos expérimentations (cf. Annexe 5). Le phosphore disponible dans ce sol est donc un élément potentiellement limitant pour la croissance du colza. Un criblage de nos bactéries candidates sur leur capacité à solubiliser le phosphore minéralisé dans le sol paraît donc pertinent.

Matériel et méthodes

Préparation des inoculums

Chaque souche candidate a été cultivée de la façon décrite précédemment (Cf. M&M 1).

Mise en place du dispositif expérimental

Une méthode *in vitro* couramment utilisée pour cribler facilement des souches bactériennes consiste en l'utilisation d'un milieu adapté à partir de celui mis au point par Pikovskaya en 1948. Ce milieu

contient du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ insoluble dans l'eau conférant une coloration blanchâtre à la gélose. Les bactéries possédant une l'activité solubilisatrice de phosphate forment d'un halo translucide autour des colonies (Cf. M&M 3).

Résultats

Les résultats obtenus à l'issue de cette expérimentation ont été synthétisés dans la figure 3.16.

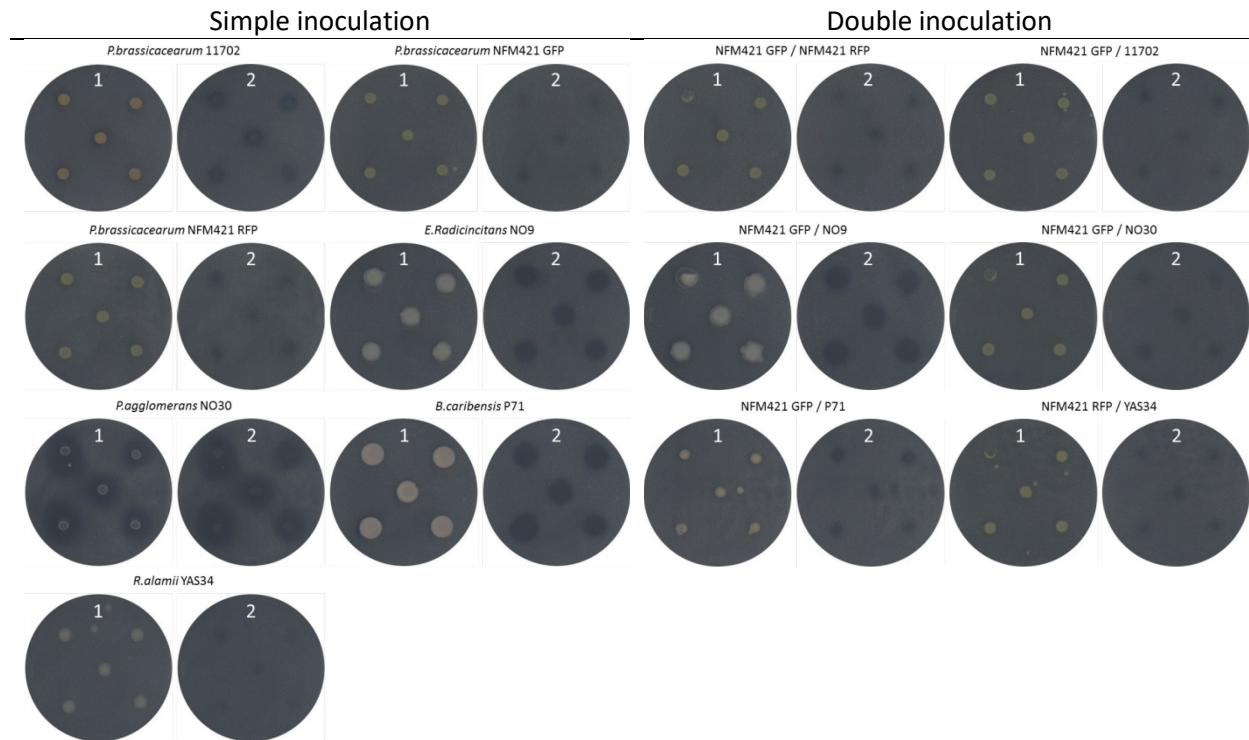


Figure 3.16 : Scans des boîtes de Petri contenant le milieu Pikovskaya agar (PVK) avant (1) ou après lavage des colonies (2).

À partir de ces photographies, les diamètres des colonies et des halos de solubilisation ont été mesurés et synthétisés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Liste des index de solubilisation calculés à partir de la moyenne des 5 spots selon la formule précédemment présentée. « nd » désigne l'absence de donnée, le halo n'ayant pas atteint le fond de la boîte de Petri.

Modalité	Index de solubilisation moyen	Ecart type
NO30	4,42	0,82
P71	2,10	0,10
11702	2,00	0,18
NO9	1,96	0,03
YAS34	nd	nd
NFM421 RFP	nd	nd
NFM421 GFP	nd	nd
NFM421 GFP - NO9	1,99	0,13
NFM421 GFP - P71	1,80	0,25
NFM421 GFP - NO30	1,57	0,16
NFM421 GFP - 11702	1,48	0,22
NFM421 GFP - NFM421 RFP	1,48	0,21
NFM421 RFP - YAS34	nd	nd

De façon générale, les photos montrent que nos souches candidates semblent générer un halo dans le milieu PVK, à l'exception de *R. alarii* YAS34 dont l'effet est négligeable. Les données numériques recueillies dans les conditions d'acquisition que nous nous sommes fixées confirment cette observation, mais excluent aussi *P. brassicacearum* NFM421 puisque les halos obtenus pour les souches NFM421 GFP et dsRed n'atteignent pas le fond de la boîte. Étonnamment, la souche *P. brassicacearum* 11702 présente une activité solubilisatrice significative dans ce dispositif expérimental à la différence de la souche NFM421. En outre, les souches *E. radicincitans* NO9, *P. caribensis* P71, et *P. agglomerans* NO30 présentent un effet très net et notamment la souche NO30 par rapport à la quantité de biomasse produite.

Compte tenu du fait que la souche NFM421 est naturellement présente dans la rhizosphère du colza, nous avons choisi de procéder à la co-inoculation des autres candidats en association avec cette souche. Il apparaît que, de façon globale, l'effet solubilisateur des souches NO9, P71 et de 11702 est peu ou pas modifié en présence de la souche NFM421. En revanche, en présence de la souche NFM421, l'index de solubilisation de *P. agglomerans* NO30 est réduit d'un facteur 3. Nous verrons par la suite que cette observation s'explique par le fait que la croissance de cette dernière a été inhibée par la souche NFM421.

Il est important de préciser cependant que la méthode choisie pour mener cette expérience ne permet d'interpréter ces données que de façon qualitative et non quantitative. En effet, l'étendue du halo dépend d'un grand nombre de paramètres non maîtrisés :

- Tout d'abord, concernant le milieu, il est très compliqué de garantir son homogénéité. La solution de phosphate de calcium a été préparée et stérilisée à part, puis ajoutée au milieu au dernier moment. Cette solution étant évidemment insoluble en solution aqueuse, il est nécessaire d'en maintenir l'agitation tout au long du processus afin de tenter d'en préserver la concentration lors des transferts. En outre, une fois le milieu coulé, nous avons pu

constater une légère sédimentation de celui-ci, causant une hétérogénéité de concentration sur l'épaisseur de la gélose.

- Concernant le matériel biologique, bien que toutes les souches bactériennes utilisées aient été utilisées en phase exponentielle de croissance et la concentration de l'inoculum de départ identique, les spécificités biologiques des toutes ces souches ainsi que leur adaptation au milieu PVK font qu'à l'issue des 7 jours de culture, nous n'avons aucune idée du nombre de cellules présentes sur la gélose.

Compte tenu de ces remarques, il paraît peu pertinent de tenir compte des valeurs de l'index de solubilisation d'un point de vue quantitatif. Nous retiendrons que notre dispositif expérimental a permis de montrer que les souches NO30, P71, 11702 et NO9 possèdent un pouvoir solubilisateur du phosphore minéral significatif.

Nous ne reviendrons pas sur ce trait phytobénéfique en réalisant, comme c'est souvent le cas, un dosage colorimétrique précis du phosphore solubilisé par cellule et par unité de temps car cette information ne présente, en définitive, que peu d'intérêt pour la suite. En effet, si l'une de nos souches candidates possède la capacité de libérer du phosphate en solubilisant le phosphore inaccessible à la plante, le réel intérêt est que ce phosphore libéré soit assimilé par la plante. Aussi nous reviendrons plus tard ce sur point lorsque nous mesurerons, par ICP-AES, la quantité globale de phosphore présente dans les plantes de colza, dans le cadre d'un essai d'inoculation des plantes poussant sur un sol agricole.

3.1.2.4 Compétition entre souches bactériennes

Bilan partiel à l'issue des tests préliminaires

Liste des souches bactériennes testées *in vitro* :

P. brassicacearum NFM421 et 11702, *E. radincitans* NO9, *P. agglomerans* NO30, *P. caribensis* P71, *R. alamii* YAS34 et *R. tataouinensis* TTB310

Les tests *in vitro* menés en simple inoculation en présence d'*A. thaliana* et de *B. napus* nous ont permis de valider la croissance des souches candidates en présence du colza et d'exclure *R. tataouinensis* TTB310 des candidats potentiels à cette étude.

Les tests menés en simple inoculation en sol agricole non stérilisé en présence de *B. napus* ont validé l'aptitude des souches NFM421, 11702 et NO9 à se maintenir sur le rhizoplan et dans le sol pour la souche NFM421. Même si nous n'avons pas visualisé les souches NO30 et P71 dans la rhizosphère du colza, nous avons choisi de les utiliser dans la suite de ce travail. De la même façon, nous avons choisi de maintenir la souche YAS34 dans la liste des souches à tester, même si cette souche n'avait pas pu être testée dans l'essai préliminaire.

Liste des souches bactériennes prise en compte dans la suite du travail : NFM421, 11702, NO9, NO30, P71 et YAS34.

P. brassicacearum est l'espèce la plus importante car elle est naturellement présente dans la rhizosphère et dans le rhizoplan du colza et nous avons confirmé qu'elle colonisait efficacement la rhizosphère et le rhizoplan du colza cultivé en sol agricole non stérilisé. La finalité de la formulation de l'inoculum bactérien étant de combiner les effets potentiellement phytobénéfiques complémentaires de plusieurs souches bactériennes candidates, nous avons choisi d'associer les autres souches candidates à la souche NFM421 dans le cadre de doubles inoculations.

Un premier test portant sur le suivi de la croissance des souches bactériennes en phase liquide a été réalisé. Pour ce test, nous avons utilisé du TSA 1/10^{ème}. Ce milieu dilué permettant aux cellules bactériennes de croître en phase exponentielle deviendra avec le temps un facteur limitant causant ainsi une compétition entre les souches, en particulier pour le carbone.

Matériel et méthodes

Souches bactériennes

Les souches suivantes ont été utilisées pour cette étude :

- *P. brassicacearum* NFM421 marquée à la dsRed,
- *E. radincitans* NO9 marquée à la mKate2,
- *P. agglomerans* NO30 marquée à la mKate2,
- *P. caribensis* P71 marquée à la mKate2,
- *R. alamii* YAS34 marquée à la GFP.

Chaque souche a été cultivée selon le protocole précédemment utilisé (Cf. M&M 1). L'inoculum a ensuite été calibré par comptage au microscope selon le protocole décrit en M&M 4.

Inoculation des tubes

10 mL de TSB/10^{ème} ont été inoculés à partir des solutions mères pour obtenir une concentration finale de $1,0 \cdot 10^3$ CFU.mL⁻¹ pour chaque souche. Les tubes ainsi inoculés ont été cultivés à l'obscurité à 28 °C sous agitation.

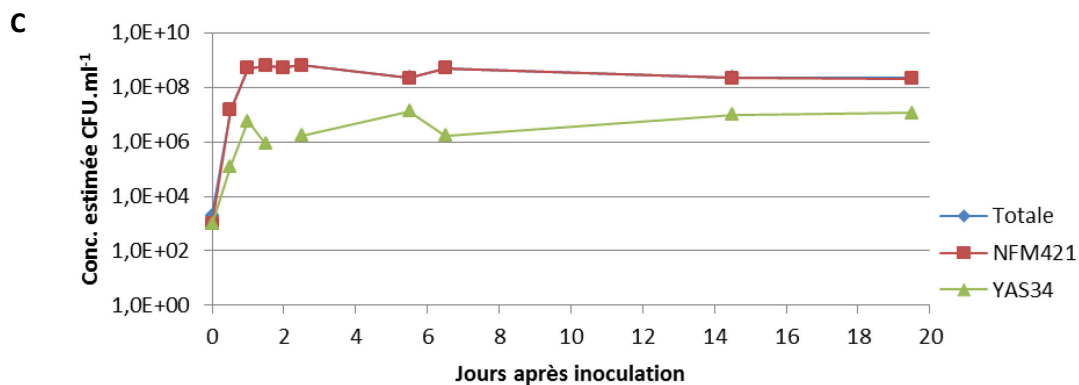
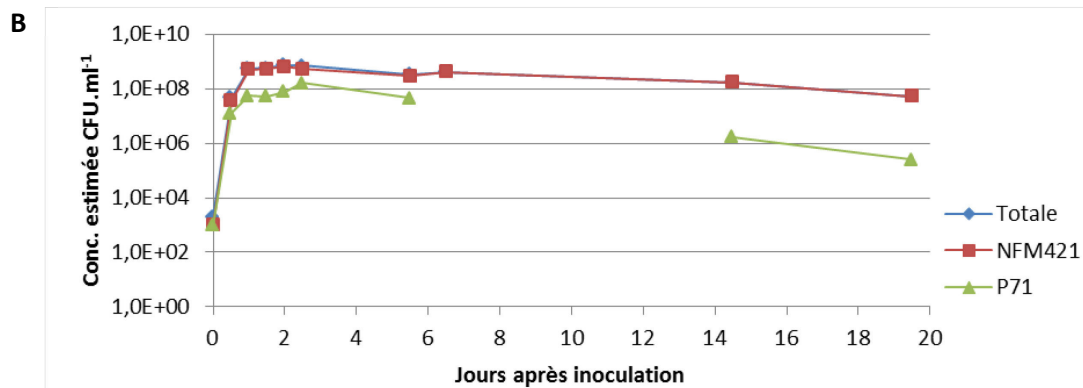
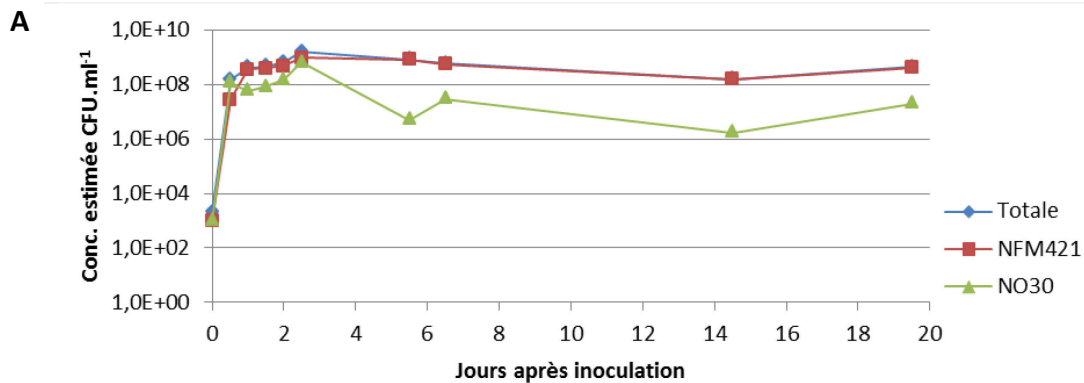
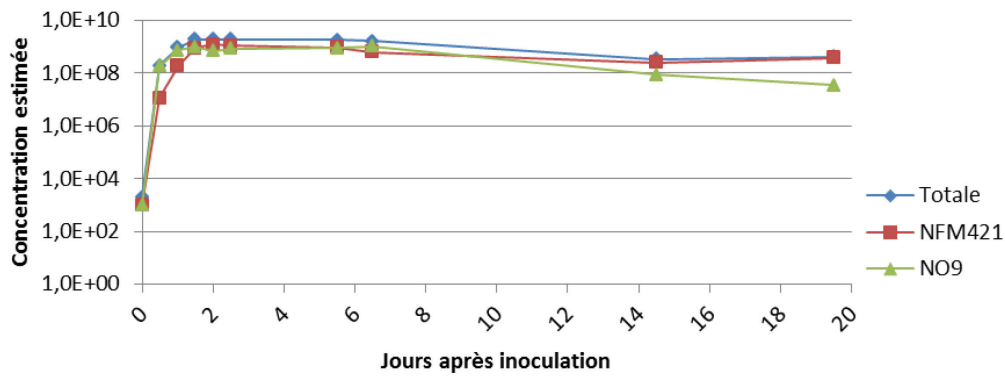
Échantillonnage de l'essai

Neuf prélèvements ont été réalisés entre 0,5 et 19,5 jours après inoculation. Les tubes ont été vortexés pendant 30 s, puis 10 µL de solution mère ont été prélevés. Une série de dilution au 1/10^{ème} a été réalisée, puis 10 µL des dilutions 3 à 7 ont été étalés en 4 répétitions sur des boîtes de Petri contenant 45 mL de milieu TSA/10^{ème} solide. Les boîtes ont été incubées une nuit à 28 °C, puis de quelques jours à plus d'une semaine selon les souches à 9° C pour ralentir leur croissance, afin d'homogénéiser la croissance des différentes souches et d'en faciliter l'observation. La fluorescence des différentes souches a été recherchée à l'aide d'un microscope binoculaire à fluorescence Leica MZ FLIII Stereo-Fluorescence Microscope (Leica, Deutschland).

Résultats

Estimation de la concentration de la solution mère

Les dilutions 3 à 7 ont été déposées en 4 répétitions sur boîte de Petri. Une moyenne a été calculée pour chaque dilution, puis la moyenne de toutes ces dilutions a été calculée et présentée dans la figure 3.17.



D **Figure 3.17** : Suivi de la croissance des souches bactériennes en co-inoculation avec NFM421 par estimation de la concentration en CFU.ml⁻¹ en fonction du temps. **(A)** souche *P. brassicacearum* NFM421 et *E. radincitans* NO9, **(B)** NFM421 et *P. agglomerans* NO30, **(C)** souche NFM421 et *B. caribensis* P71 et **(D)** souche NFM421 et *R. alarii* YAS34.

Cette expérience nous a permis de constater, dans tous les cas, que la souche NFM421 est dominante de par son abondance et son maintien au sein du dispositif de culture. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus pour l'essai en sol qui ont permis de mettre en évidence une forte croissance de cette souche dans la rhizosphère et sur le rhizoplan du colza. En outre, on constate que toutes les souches atteignent leur phase stationnaire de croissance en 24 h, comme c'est le cas en conditions monoxéniques. Un léger retard est visible avec *P. brassicacearum* NFM421 en co-inoculation avec *E. radicincitans* NO9 qui semble prendre le dessus dans les deux premiers jours de culture. Cette observation confirme celle que nous avons précédemment faite avec la mesure des activités de solubilisation du phosphate : maintien du pouvoir solubilisateur de *E. radicincitans* NO9 en présence de *P. brassicacearum* NFM421.

Dans le cas de l'association entre les souches NFM421 et NO30 ou P71, nous observons un maximum de croissance pour le challenger situé entre le deuxième et le quatrième jour après inoculation, puis une décroissance d'environ une à deux unités logarithmiques en fin d'expérience. Pour le cas de la co-inoculation des souches NFM421 et YAS34, on observe pour le challenger un maximum de croissance situé à environ 1.10^7 CFU.mL⁻¹ qui est globalement maintenu jusqu'au terme de l'expérimentation.

À ce stade des expérimentations, dans le cadre d'une culture réalisée dans un milieu peu carencé, il ne semble pas y avoir de réel antagonisme de croissance entre les souches candidates. Il est cependant notable que la population de la souche YAS34 est plus faible d'une à deux unités logarithmique par rapport à la souche NFM421, mais reste stable tout au long de l'essai, et que la population de la souche NO9 diminue au final d'un facteur proche de 10, et celle des souches P71 et NO30 d'un facteur 100.

Par la suite, nous avons conservé quelques temps les tubes ayant servi aux dénombrements et nous avons constaté une coloration différentielle des milieux de culture selon la souche (Figure 3.18).

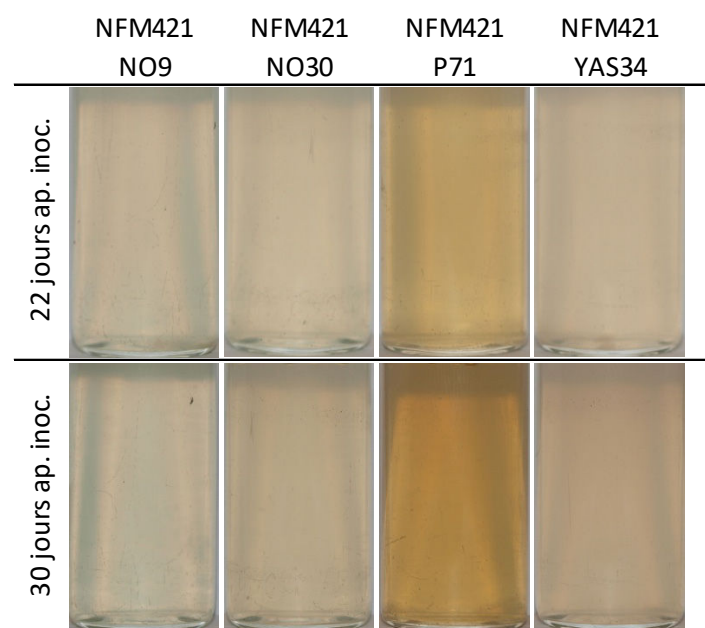


Figure 3.18 : Photographie des milieux de cultures utilisés mettant en évidence une variation de leur coloration en fonction du partenaire bactérien employé.

Ce phénomène de coloration du milieu est bien connu chez *P. brassicacearum* qui, comme *P. fluorescens*, est connu pour produire en culture liquide du 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), un métabolite secondaire toxique impliqué dans les phénomènes de biocontrôle contre un certain nombre de microorganismes bactériens, fongiques, ou encore les virus et les nématodes (Meyer *et al.*, 2009). Cette coloration du milieu n'a été observée qu'en interaction avec *P. caribensis* P71, ce qui suggère qu'en fonction de la souche co-inoculée, la production de DAPG par *P. brassicacearum* NFM421 pourrait être modulée, voire inhibée. Il ne s'agit ici que d'une observation fortuite. D'autres tests plus approfondis de la modulation de la production de DAPG par la souche NFM421 en co-inoculation ont été réalisés et seront présentés par la suite (paragraphe 3.3).

Pour en revenir à la notion de compétition de croissance entre souches bactériennes, il nous est apparu que les conditions de l'essai précédent étaient probablement trop peu sélectives pour mettre clairement en évidence cet effet. Nous avons donc procédé à un nouvel essai sur milieu solide basé sur le principe de la mise en évidence de l'effet de compétition sur boîte de Petri.

Matériel et méthodes

Souches bactériennes

P. caribensis P71 marquée à la mKate2,
E. radincitans NO9 marquée à la mKate2,
P. agglomerans NO30 marquée à la mKate2,
P. brassicacearum 11702 marquée à la mKate2,
P. brassicacearum NFM421 marquée à la GFP.

Chaque souche candidate a été cultivée selon le protocole décrit en M&M 1 et calibré comme décrit en M&M 4.

Inoculation des boîtes

100 μL d'une suspension calibrée à 1.10^8 CFU.mL⁻¹ ont été étalés à l'aide d'un râteau stérile sur une gélose de milieu TSA/10^{ème}, puis la boîte de Petri a été laissée 15 min sous hotte jusqu'à séchage complet de l'inoculum. Quatre spots de 10 μL calibrés à 1.10^8 CFU.mL⁻¹ ont alors été déposés au centre de la boîte. Celle-ci a été séchée 15 min sous hotte, puis hermétiquement scellée au Parafilm m® (Bemis, USA) et placée une semaine à l'obscurité à 28 °C.

Observation des colonies bactériennes

Trois zones d'observation ont été arbitrairement désignées. Les observations ont été réalisées directement sur boîte de Petri à l'aide d'un microscope à épifluorescence (BX60 fluoview confocal, Olympus, Japan) au grossissement minimal (x10) (Cf. figure 3.19).

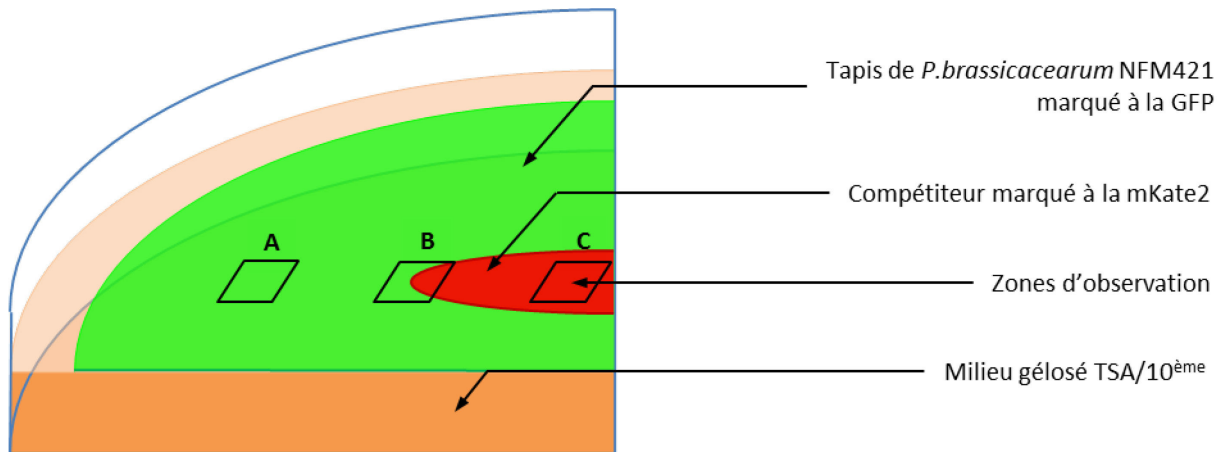


Figure 3.19 : Localisation des zones échantillonnées sur boîte dePetri.

Résultats

En raison de sa capacité à produire de grandes quantités d'exopolysaccharide sur milieu TSA/10^{ème} solide interférant avec l'observation, la souche *R. alarii* YAS34 a été laissée de côté pour cette étude. Les résultats ont été synthétisés dans la figure 3.20.

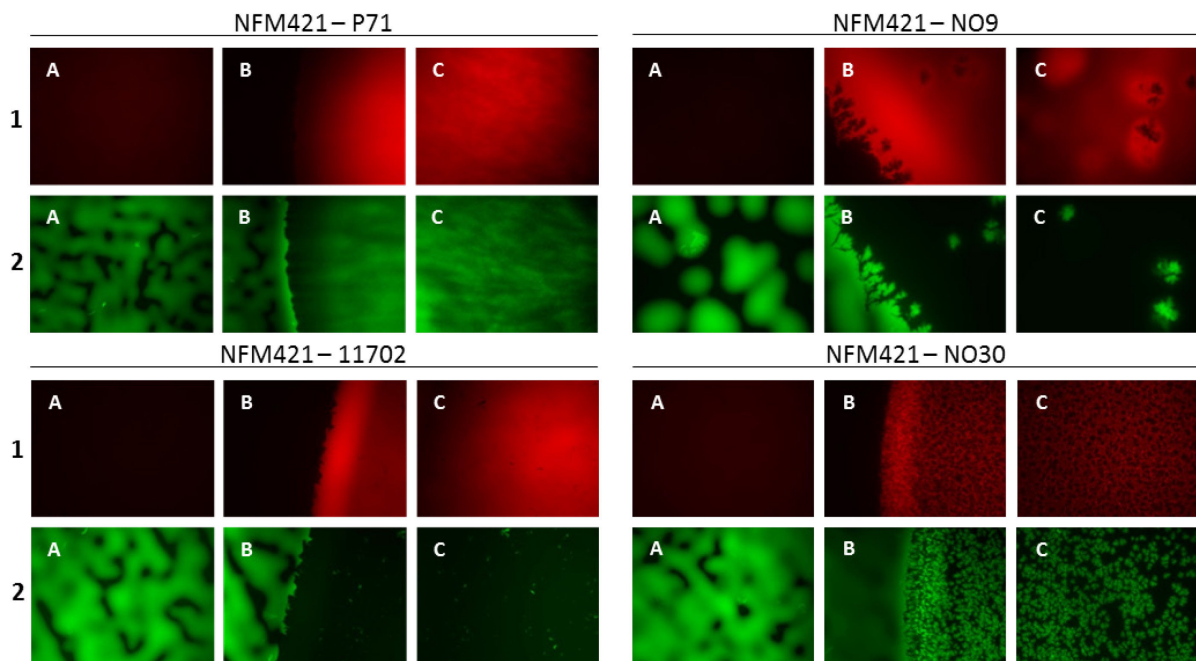


Figure 3.20 : Observation au microscope optique à épifluorescence colorisées artificiellement des zones **A**, **B** et **C** après excitation de la mKate2 du compétiteur (1) ou de la GFP de la souche NFM421 (2).

Dans tous les cas, il apparaît que la souche compétitrice s'est développée sur le tapis de *P. brassicacearum*. Seule l'association des souches NFM421/*P. caribensis* P71 semble permettre une croissance indépendante des deux souches bactériennes. En effet, les zones B et C (zones de recouvrement des deux souches) fluorescent à la fois en rouge et en vert (Figure 3.20).

Dans le cas des couples NFM421/11702 et NFM421/NO9, on observe un antagonisme de développement important. Au niveau de la zone B, une ligne de démarcation est clairement établie et au sein de la zone C, le compétiteur a pris apparemment le dessus, ne laissant que quelques zones de couleur verte clairement définies dans lesquelles aucune fluorescence rouge n'est observable. Il semble dans ce cas-là que le tapis de la souche NFM421 n'ait pas pu se maintenir et croître en présence du compétiteur. Il semble que la souche NO9 soit en mesure d'exercer de façon directe (antagonisme actif par production de métabolite antimicrobiens) ou indirecte (souche très compétitive dans l'accès aux ressources) un fort antagonisme envers la souche NFM421.

Dans le cas de la confrontation entre les souches NFM421 et NO30, nous confirmons la première observation faisant état de la croissance du candidat compétiteur (NO30), mais, on observe ici de très nombreuses colonies de NFM421 qui ont pu se développer dans la zone de croissance de la souche NO30. La structure de la zone colonisée par NO30 met en évidence de nombreuses lacunes dans lesquelles aucune fluorescence rouge n'est observée. La superposition des deux images prises au même endroit (Figure 3.21) permet d'observer que ces lacunes ne sont apparemment pas causées par la croissance de la souche NFM421, car les colonies de cette dernière ne comblent pas systématiquement ces lacunes.

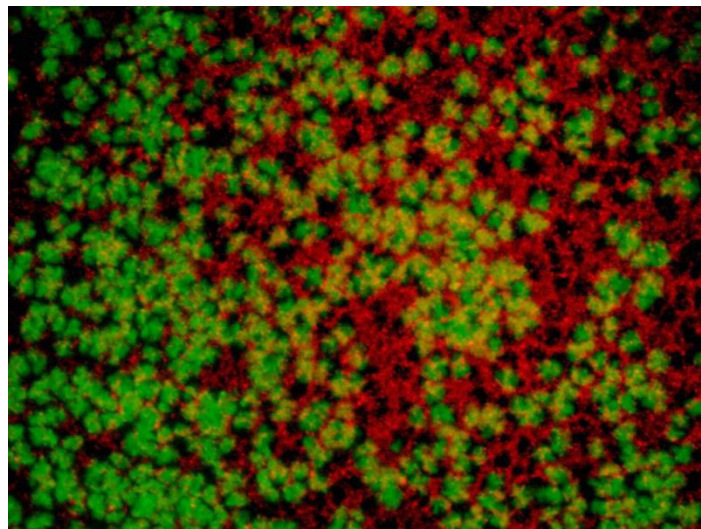


Figure 3.21 : Superposition artificielle des clichés réalisés au niveau de la zone C pour le couple *P. brassicacearum* NFM421 (GFP) / *P. agglomerans* NO30 (mKate2).

Dans cet essai, nous avons souhaité mettre en compétition nos souches sur une zone géographiquement définie et nous avons pu observer qu'apparemment la croissance d'*E. radicans* NO9 et de la souche 11702 inhibaient localement la croissance de la souche NFM421. La souche *P. caribensis* P71 semble indifférente à la présence de la souche NFM421. Cette observation va à l'encontre des observations réalisées précédemment (Tableau 3.6). Pour finir, la souche NO30 présente un comportement qui ne nous permet pas de trancher. En effet, seule l'observation d'un témoin cultivé en l'absence de la souche NFM421 nous aurait permis de contrôler si les lacunes de fluorescence observées au sein des colonies de la souche NO30 sont imputables à la présence de la souche NFM421 ou pas.

Dans le premier essai, nous avons misé sur l'épuisement du milieu de culture liquide, mais nous n'avons pas atteint la phase de décroissance nette provoquée par l'appauvrissement du milieu et par

les mécanismes de compétition entre les souches. Nous avons donc décidé d'utiliser un milieu solide en comptant sur une compétition plus localisée. Les résultats obtenus sur milieu gélosé montrent que la croissance des souches confrontées à la souche NFM421 n'est pas inhibée par cette dernière. En revanche, les souches 11702 et NO9 sont capables d'inhiber localement la sienne.

Nous avons décidé de confirmer ces observations en nous plaçant dans des conditions de compétition entre souches, en entreprenant une expérience complémentaire de double inoculation réalisée *in vitro* en présence d'une plantule de colza comme seule source de carbone et d'énergie.

Compétition en présence de colza

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Les essais ont été réalisés avec des semences de colza d'hiver (*Brassica napus*) de variété Sensation lot K11455 commercialisées par Semences de France (60 rue L. Beauchamp, 59930 La Chapelle d'Armentières) conservées hermétiquement en chambre climatisée à 9°C.

Souches bactériennes

Les souches suivantes ont été utilisées pour cette étude :

P. caribensis P71 marquée à la mKate2,
E. radicincitans NO9 marquée à la mKate2,
P. agglomerans NO30 marquée à la mKate2,
P. brassicacearum 11702 marquée à la mKate2,
P. brassicacearum NFM421 marquée à la GFP et à la dsRed,
R. alamii YAS34 marquée à la GFP.

Chaque souche candidate a été cultivée selon le protocole décrit en M&M 1 et calibré comme décrit en M&M 4.

Sélection et stérilisation des graines

Afin d'obtenir davantage d'homogénéité dans la levée des semis, les graines de colza ont été calibrées entre deux tamis afin de sélectionner celles dont le diamètre est compris entre 1,6 et 2 mm. Elles ont été stérilisées selon le protocole précédemment décrit en M&M 2.

Préparation du dispositif expérimental

Du sable de rivière a été utilisé comme support de culture. L'équivalent de 1,5 L de sable a été placé dans un bécher de 5 L en présence de 3 L d'eau puis brassé. Quatre à cinq lavages successifs ont été réalisés jusqu'à clarification complète de l'eau de lavage. Trois rinçages successifs ont été réalisés dans les mêmes conditions à l'eau distillée. Le sable a été placé dans un cristalliseur, puis recouvert d'eau distillée dont le niveau a été ajusté à 1 cm au-dessus de la surface du sable. Le cristalliseur a été recouvert d'une feuille d'aluminium puis autoclavé.

Le sable a été égoutté et séché une nuit à l'étuve à 80 °C. Des tubes en verre de 15 cm x 2,5 cm ont été remplis au 2/3 de sable, bouchés perméablement puis autoclavés. 14 mL de milieu liquide Hoagland à 0,5X ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été bouchés perméablement puis autoclavés. En sortie de l'autoclave, le niveau du milieu a été ajusté à l'aide de milieu liquide Hoagland à 0,5X, légèrement en dessous de la surface du sable. Les tubes ont été bouchés hermétiquement et placés à 6 °C pendant 4 h.

Inoculation du dispositif expérimental

Un volume de 15 mL de milieu Hoagland 0,5X peu gélifié a été préparé (cf. Annexe 2, Hoagland 0,5X, agar mou), puis maintenu à une température d'environ 40 °C. Les solutions mères ont été diluées

dans du KCl à $8,5 \text{ g.L}^{-1}$ de façon à inoculer les 15 mL de milieu Hoagland 0,5X peu gélifié par 100 μL de suspension bactérienne et atteindre une concentration finale de $1.10^3 \text{ CFU.mL}^{-1}$ pour chaque souche. Dans le cas d'un témoin négatif eau, 100 μL de KCl stérile ont été apportés. L'inoculation a été réalisée en déposant lentement 1,5 mL de solution inoculée de milieu Hoagland 0,5X peu gélifié à la surface du sable. Le tube étant froid, le milieu inoculant apporté se fige rapidement pour former un anneau gélifié à la surface du sable. Une graine a été alors déposée en surface, puis le tube a été fermé et scellé à l'aide d'un adhésif perméable à l'air (Cf. figure 3.22).

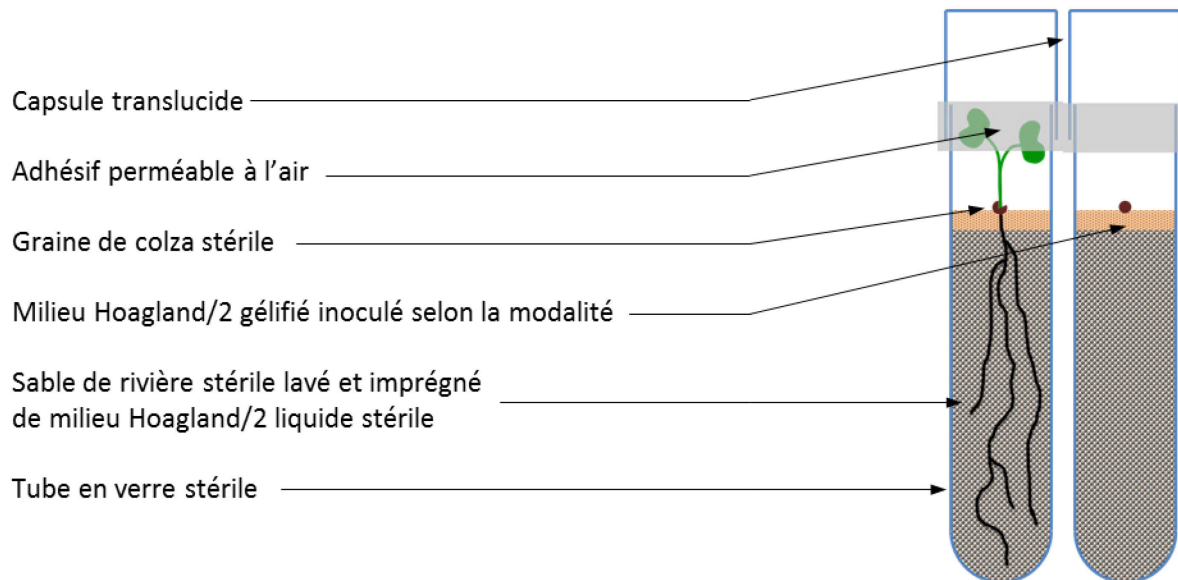


Figure 3.22 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les expérimentations de co-inoculation du colza.

Modalités de culture

Les modalités testées sont les suivantes :

- un témoin non inoculé « eau »,
- les modalités simples inoculations : souches NFM421, 11702, NO9, NO30, P71 et YAS34
- et les modalités doubles inoculées : NFM421/11702, NFM421/NO9, NFM421/NO30, NFM421/P71, NFM421/YAS34.

Les tubes contenant les différentes modalités ont été disposés aléatoirement sur des portoirs en respectant une organisation en bloc proposée par une macro-instruction éditée dans Excel (Microsoft, USA). Chaque modalité est présente au sein de chaque bloc.

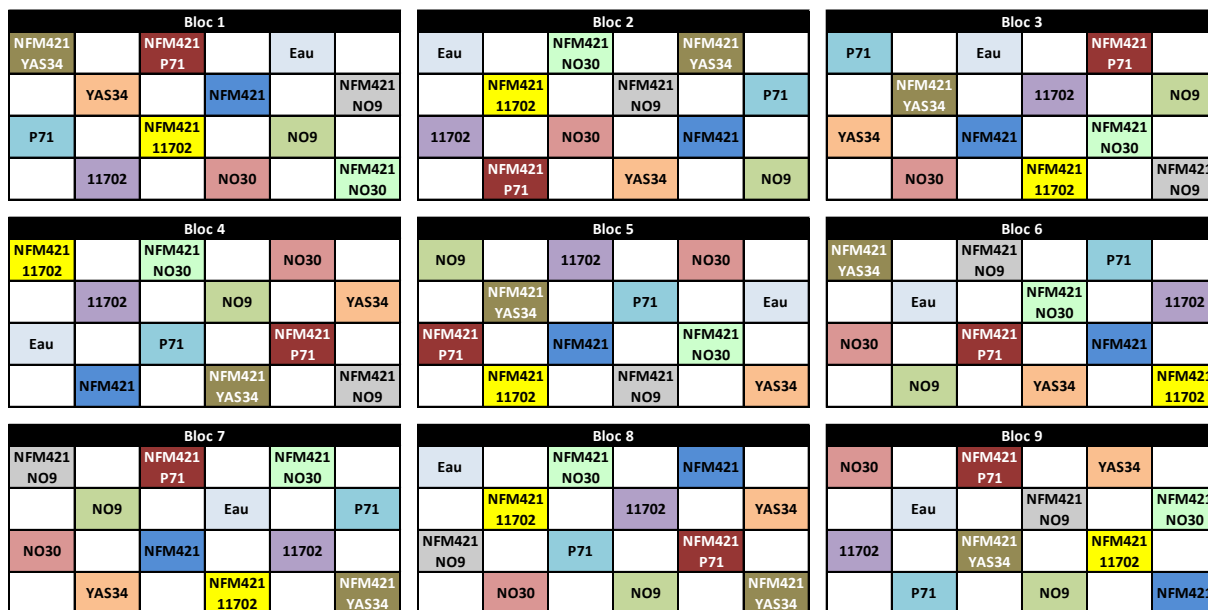


Figure 3.23 : Schéma illustrant le plan du dispositif expérimental composé des 9 blocs ordonnés selon les deux axes du plan portant chacun toutes les modalités.



Figure 3.24 : Dispositif en 9 blocs en cours de culture en tube avec le sable de rivière.

Échantillonnage de l'essai : trois campagnes de prélèvements

Dans la première, réalisée au 14^{ème} jour de culture, les blocs 2, 4 et 9 ont été récoltés pour réaliser un suivi de la colonisation racinaire des plantules. Chaque tube a été versé dans une boîte de Petri stérile, puis la plantule a été extraite. La racine a été rincée dans une boîte de Petri stérile contenant 45 mL de KCl concentré à 8,5 g.L⁻¹ stérile afin d'éliminer le sable adhérent. Les plantules ont été sectionnées stérilement au collet, puis la racine a été broyée au pilon dans un mortier préalablement flambé dans 1 mL d'eau Ultrapure stérile. 200 µL de broyat ont été prélevés, puis dilués 5 fois au 1/10^{ème}. Pour chaque dilution, 10 µL ont été prélevés et déposés en 4 répétitions sur des boîtes de

Petri carrées contenant 45 mL de milieu solide TSA/10^{ème}. Les boîtes ont été incubées une nuit à 28 °C, puis de quelques jours à plus d'une semaine, selon les souches, à 9 °C afin d'homogénéiser la croissance des différentes souches et d'en faciliter le comptage. La fluorescence des différentes souches a été recherchée à l'aide d'un microscope binoculaire à fluorescence Leica MZ FLIII Stereo-Fluorescence Microscope (Leica, Deutschland). La concentration de la solution mère a été estimée en calculant la moyenne des observations faites sur les 4 répétitions et en la rapportant au facteur de dilution.

Dans la deuxième campagne, réalisée au 53^{ème} jour de culture, les blocs 5, 7 et 8 ont été récoltés pour réaliser un suivi de la colonisation racinaire des plantules par microscopie optique à épifluorescence. Pour ce faire, les plantules ont été traitées de la même façon que précédemment pour les étapes de récolte, de lavage et de prélèvement de la racine puis trois sections de 1 cm environ ont été réalisées sur la racine : une au niveau de l'apex racinaire, une au niveau de la base et une à équidistance entre les deux. Ces trois sections ont été montées entre lames et lamelles, puis observées par épifluorescence au microscope (BX60 fluoview confocal, Olympus, Japan).

Enfin une dernière campagne de prélèvement a été menée au 76^{ème} jour de culture sur les blocs 1, 3 et 6 de façon analogue en sa totalité à la première campagne.

Résultats

L'observation des inoculations simples du prélèvement à 14 jours confirme les observations précédentes et notamment que l'inoculum initialement calibré à 1.10³ CFU.mL⁻¹ a pu non seulement se maintenir, mais aussi permettre aux souches inoculées de coloniser les racines, validant ainsi le dispositif expérimental (Tableau 3.7). Ce dispositif, à la différence de celui sur milieu gélosé en boîte de Petri ou en sol agricole, présente cependant un inconvénient. En effet, en raison de la place restreinte disponible au sein de chaque tube, une seule graine a pu être semée et, en raison de la baisse du niveau de fertilité des graines liée à l'étape de stérilisation, certaines modalités n'ont pas pu être mesurées (cas des couples NFM421/11702 et NFM421/YAS34). L'information supplémentaire apportée par cet essai est que, si la modalité inoculation simple avec *P. agglomerans* NO30 a permis à cette souche de se développer, aucune cellule de NO30 fluorescente n'a été observée en compétition avec *P. brassicacearum* NFM421.

Tableau 3.7 : Concentrations moyennes des populations bactériennes estimées par le comptage des colonies fluorescentes présentes sur les étalements des broyats racinaires de 3 plantules de colza par prélèvement. Les concentrations sont données en CFU.mL⁻¹. « - » désigne une donnée non pertinente, « nd » désigne l'absence de donnée (les trois individus de cette modalité n'ont pas poussé au sein des trois blocs étudiés).

	Prélèvement à 14 jours			Prélèvement à 76 jours			
	Totale	NFM421	Challenger	Totale	NFM421	Challenger	
Eau	0	-	-	0	-	-	
Simple inoc.	NFM421	-	5,6E+08	-	5,1E+06	-	
	11702	-	-	1,5E+08	-	4,2E+06	
	NO9	-	-	4,8E+08	-	2,3E+06	
	NO30	-	-	5,6E+07	-	2,3E+05	
	P71	-	-	5,5E+08	-	4,8E+06	
	YAS34	-	-	5,4E+08	-	9,4E+06	
Double inoc.	NFM421/11702	nd	nd	nd	6,0E+06	6,0E+06	0
	NFM421/NO9	7,0E+08	6,8E+08	2,1E+07	2,9E+06	2,6E+06	1,3E+05
	NFM421/NO30	3,5E+08	3,5E+08	0	8,1E+06	8,1E+06	0
	NFM421/P71	7,0E+08	5,6E+08	1,5E+08	1,8E+06	1,3E+06	4,7E+05
	NFM421/YAS34	nd	nd	nd	5,3E+06	2,9E+06	2,1E+06

Les résultats obtenus pour le prélèvement à 76 jours montrent que l'on atteint les limites du dispositif expérimental (Tableau 3.7). Nous avons pu constater que la plante présente des signes de stress que nous pensons pouvoir imputer au volume restreint disponible pour croître, mais aussi probablement à l'appauvrissement du milieu de culture. Cette observation est confirmée par les données recueillies qui témoignent d'une diminution globale moyenne d'un facteur 100 des populations bactériennes sur les racines. L'observation réalisée à 14 jours est confirmée à 76 jours : bien que la souche NO30 soit en mesure de croître seule, aucune cellule marquée n'a pu être observée en compétition avec la souche NFM421. Une information supplémentaire est apportée par l'étude de la modalité « NFM421 en compétition avec la souche 11702 » où l'on constate la disparition de cette dernière.

Aux deux dates, *E. radicincitans* NO9 se maintient à raison d'une cellule de NO9 pour 10 de la souche NFM421, *P. caribensis* P71 se maintient en concentration équivalente à celle de la souche NFM421 et, information nouvelle apportée par l'observation réalisée à 76 jours, *R. alarii* YAS34 se maintient elle aussi en concentration équivalente à celle de la souche NFM421.

La deuxième partie de cette étude visait à utiliser les échantillons des blocs restants (5, 7 et 8) pour réaliser l'observation des souches directement sur la racine, par microscopie optique confocale et à épifluorescence (Tableau 3.8, 3.9 et 3.10).

Le maintien des souches en conditions monoxéniques ayant déjà été discuté à l'aide des expériences précédentes, nous ne présentons ici que les observations réalisées en co-inoculation.

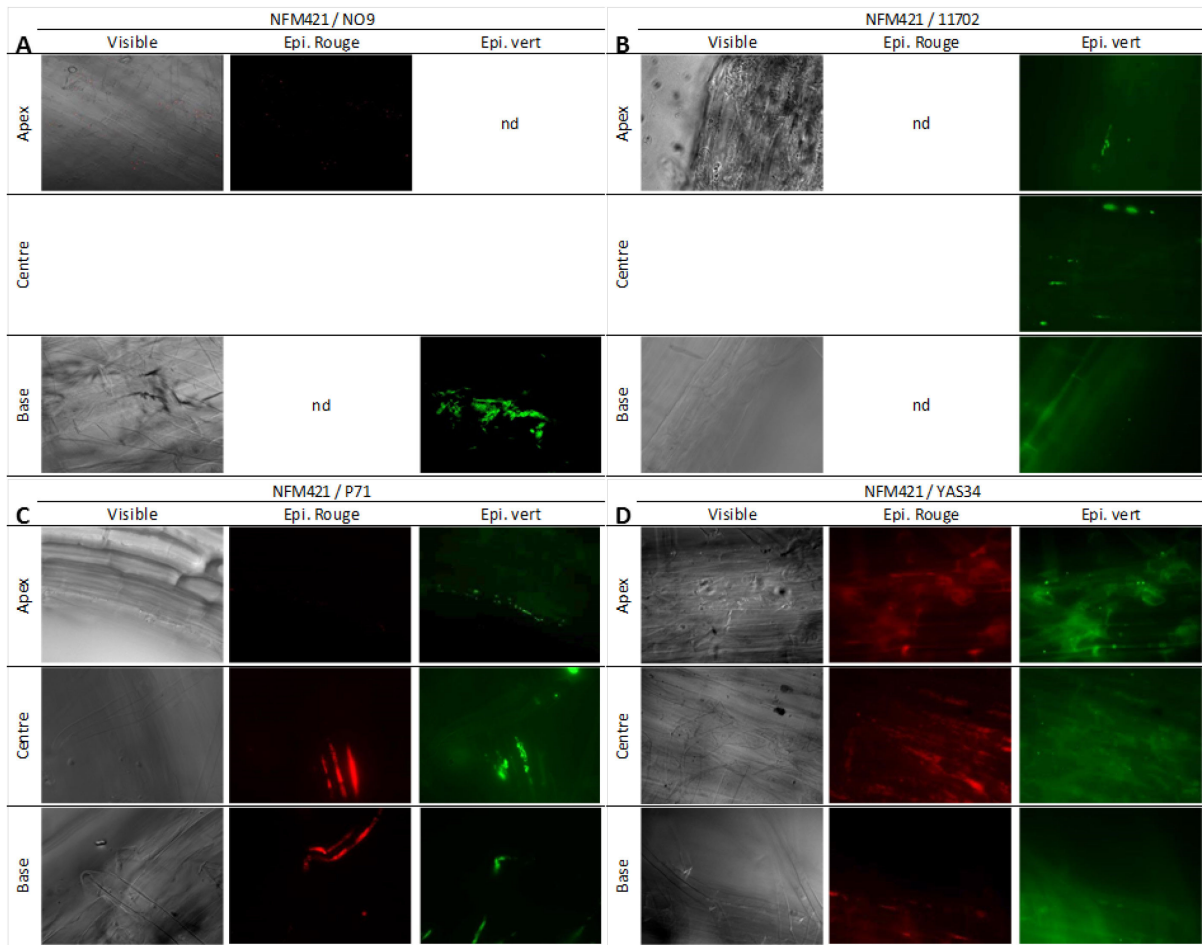


Tableau 3.8 : Localisation des souches sur les racines de colza (culture en tube avec le sable de rivière). Imagerie réalisée sur les échantillons du bloc 5 pour le couple *P. brassicearum* NFM421/*E. radicincitans* NO9 (A) sur les zones apicales et basales de la racine par microscopie optique confocale. Clichés suivants, imagerie réalisée sur le même bloc sur les zones apicales, centrales et basales de la racine par microscopie optique à épifluorescence pour les couples souche NFM421/ souche 11702 (B), souche NFM421/*P. caribensis* P71 (C) et souche NFM421/*R. alarii* YAS34 (D). « nd » désigne l'absence de candidats fluorescents observables sur l'échantillon.

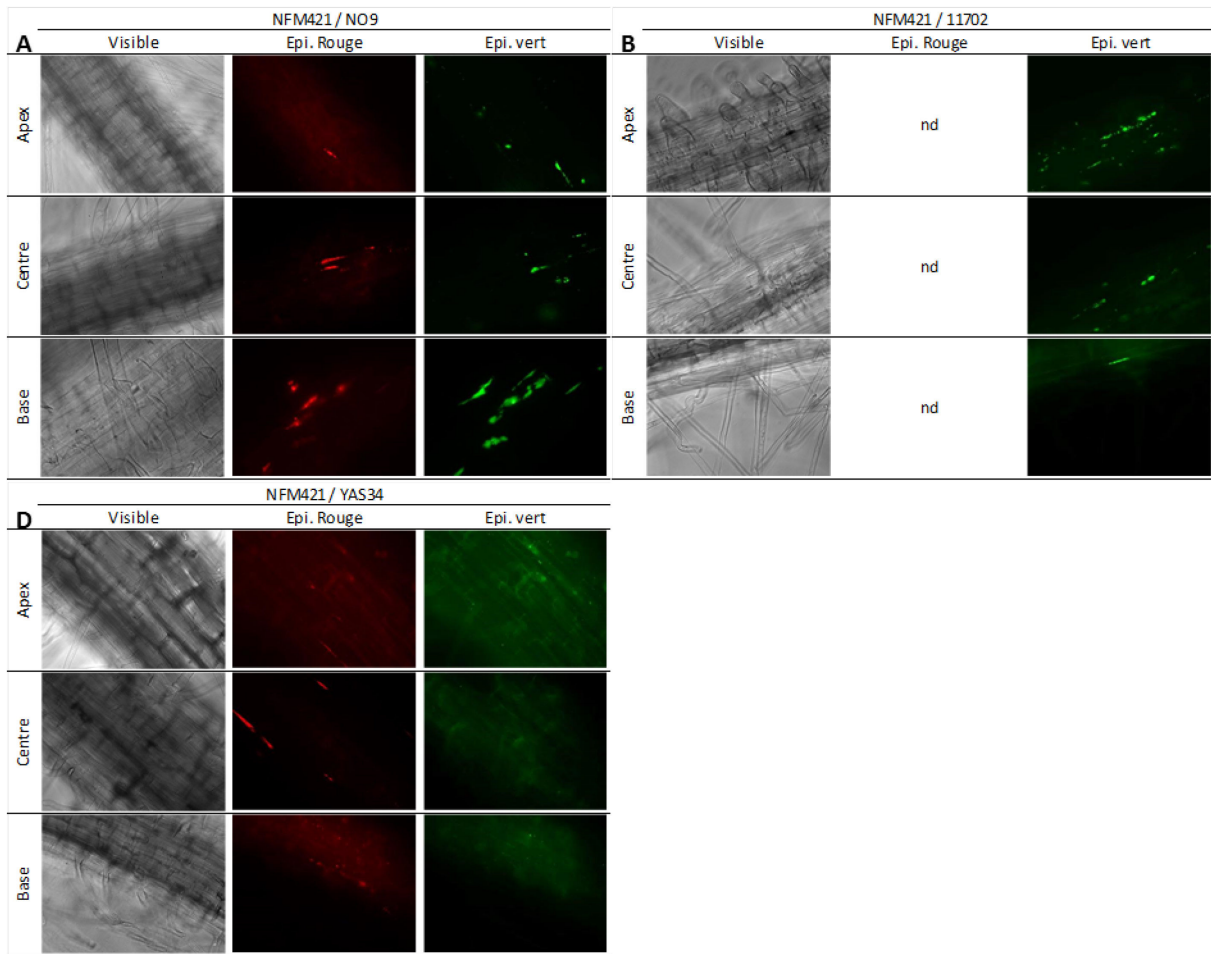


Tableau 3.9 : Localisation des souches sur les racines de colza (culture en tube avec le sable de rivière). Imagerie réalisée sur les échantillons du bloc 7 sur les zones apicales, centrales et basales de la racine par microscopie optique à épifluorescence pour les couples souche NFM421/*E. radicans* NO9 (**A**), souche NFM421/ souche 11702 (**B**) et souche NFM421/*R. alarii* YAS34 (**D**).

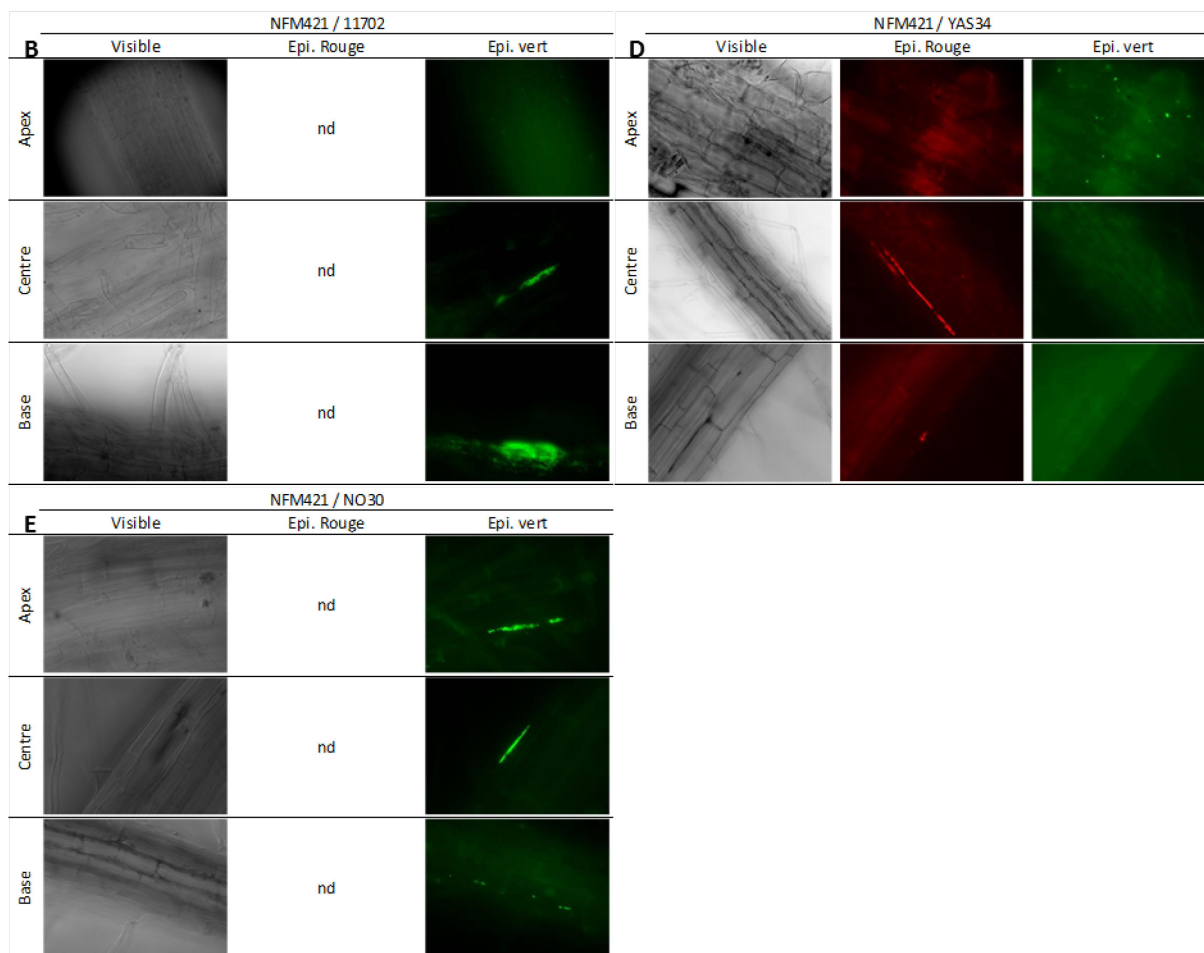


Tableau 3.10 : Localisation des souches sur les racines de colza (culture en tube avec le sable de rivière). Imagerie réalisée sur les échantillons du bloc 8 sur les zones apicales, centrales et basales de la racine par microscopie optique à épifluorescence pour les couples souche NFM421/ souche 11702 (B), souche NFM421/*R. alamii* YAS34 (D) et souche NFM421/*P. agglomerans* NO30 (E).

De la même façon que précédemment, la phase de stérilisation des graines diminuant leur taux de germination ainsi que le dispositif expérimental limitant le semis à une graine par tube se sont traduits par la perte de certaines modalités : bloc 5 : NFM421/NO30 (Tableau 3.8), bloc 7 : NFM421/NO30 et NFM421/P71 (Tableau 3.9), bloc 8 : NFM421/NO9 et NFM421/NO30 (Tableau 3.10).

- *P. brassicacearum* NFM421/NO9 : les résultats obtenus par microscopie confirment ceux obtenus par le comptage des bactéries sur racines : co-existence des souches NFM421 et *E. radicincitans* NO9. Les quelques colonies éparses observées sur l'échantillon apical du bloc 5 ont pu être observées en plus grand nombre sur l'échantillon du bloc 7 à tous niveaux.
- Souche NFM421/souche 11702 : il n'a pas été possible d'observer, dans aucun des trois échantillons analysés, de fluorescence rouge pour la souche 11702. N'ayant pu être observée sur l'étalement des broyats racinaires, la souche 11702 est visiblement absente sur la racine. De toute évidence, cette souche qui se maintient en compétition sur milieu solide mais, en milieu liquide, n'a pas la capacité de se maintenir et de croître dans les conditions carencées en nutriments imposées par cet essai. Elle semble bien moins compétitive que la souche NFM421 (confirmation des comptages sur racines).

- Souche NFM421/souche P71 : seul un échantillon a pu être observé mais les résultats obtenus confirment ceux des comptages sur racines. *P. caribensis* P71 se développe au voisinage des racines en présence de la souche NFM421. Cependant, la souche P71 semble principalement localisée à la base et le long de la racine comme le suggèrent les très rares cellules retrouvées à l'apex racinaire.
- Souche NFM421/*R. alarii* YAS34 : on observe ici la situation inverse à celle observée pour *P. caribensis* P71. Les cellules de la souche YAS34, peu nombreuses, sont préférentiellement observées dans les régions distales de l'apex de la racine, dans des régions qui semblent moins colonisées par la souche NFM421 colonisant, elle, les régions apicales.
- Souche NFM421/NO30 : de façon analogue aux résultats recueillis par comptage sur racines, la modalité que nous avons pu observer dans le bloc 8 est dépourvue des cellules fluorescentes de *P. agglomerans* NO30. De la même façon que la souche 11702, la souche NO30 n'a pas su se maintenir dans cet environnement, alors qu'en milieu liquide et solide, elle avait réussi à croître.

3.1.3 Sélection des trois souches les plus performantes

Résumé des conclusions obtenues à partir des expérimentations menées précédemment.

Les essais préalables menés sur l'arabette et le colza visaient à tester la capacité de nos différentes souches candidates à coloniser leur système racinaire. Ils nous ont permis de constater que la souche *R. tataouinensis* TTB310, testée dans nos conditions *in vitro*, n'est pas adaptée à la rhizosphère des brassicacées. Nous avons donc choisi de l'écartier très rapidement de l'étude.

Nous avons ensuite choisi de tester la capacité des autres candidats (à l'exception de *R. alarii* YAS34) à se maintenir sur le rhizoplan et au voisinage des racines de plantules de colza cultivées dans un sol agricole non stérilisé. À l'issue de cet essai, il apparaît que les candidats *P. brassicacearum* NFM421 et 11702 ainsi que *E. radicinicans* NO9 ont la capacité de se maintenir sur le rhizoplan du colza pendant trois mois. À l'inverse, la souche *P. agglomerans* NO30 n'a pas colonisé le système racinaire. Les conditions expérimentales n'ont pas permis de trancher le cas de *P. caribensis* P71 (Tableau 3.11).

Nous avons procédé ensuite à un criblage *in vitro* de nos souches candidates quant à leur capacité à solubiliser le phosphore minéral insoluble et donc inaccessible à la plante. Cet essai nous a permis d'observer une activité de solubilisation du phosphate de calcium de la souche NO30 et de la souche NO9. À la différence de la souche 11702, la souche NFM421 ne semble pas être capable de solubiliser efficacement le phosphate de calcium dans nos conditions expérimentales (Tableau 3.11). Nous avons pu constater que procéder à une co-inoculation entre la souche NFM421 et une autre souche diminuait généralement la capacité solubilisatrice du mélange (à l'exception de la souche NO9).

Nous avons alors testé la capacité de chaque souche à croître en présence de la souche NFM421 que, compte tenu de son très bon maintien dans le sol, nous avons choisi comme souche de référence. Les essais menés sur milieu de culture dilué, solide ou liquide, ne nous ont pas permis d'identifier clairement d'antagonisme entre souches candidates bien que *P. agglomerans* NO30 semble croître avec plus de difficultés que les autres sur un tapis de la souche NFM421. Nous avons donc renouvelé cet essai en augmentant sa pression de sélection, en reprenant la structure de l'essai mené en sol non stérilisé, mais en réalisant celui-ci *in vitro* sans autre source de nutriment pour les bactéries que les exsudats racinaires et sans autre source d'antagonisme que la souche NFM421. Cet essai a confirmé la capacité des souches candidates, en l'absence de compétiteur, à croître à l'aide des seuls exsudats racinaires et nous a montré qu'en co-inoculation avec la souche NFM421, les souches 11702 et NO30 ne sont pas compétitives. La deuxième information apportée par cette série d'essais est que la souche YAS34 est compétitive face à la souche NFM421 et a pu coloniser le rhizoplan des plantules de colza (Tableau 3.11).

Tableau 3.11 : Résumé des différentes étapes de criblage réalisées et bilan des résultats positifs (✓) ou négatifs (✗) par souche testée.

	<i>R. tataouinensis</i> TTB310	<i>P. agglomerans</i> NO30	<i>P. brassicacearum</i> NFM11702	<i>P. caribensis</i> P71	<i>R. alarii</i> YAS34	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	<i>E. radicitans</i> NO9
Test d'aptitude à la croissance en présence <i>A. thaliana</i>	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Test d'aptitude à la croissance en présence <i>B. napus</i>	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Test d'aptitude à solubiliser le phosphore minéral		✓	✓	✓	✗	✗	✓
Test d'aptitude au maintien en sol non stérilisé en présence <i>B. napus</i>		✗	✗	✗		✓	✓
Test d'aptitude au maintien en co-inoculation avec NFM421 en présence <i>B. napus</i>		✗	✗	✓	✓		✓

À cette étape de notre travail, nous avons dû faire un choix entre les souches candidates. Il apparaît à l'issue de ces tests que *P. brassicacearum* NFM421 conserve sa place de « leader » étant une souche candidate très bien adaptée au rhizoplan du colza. Les « challengers » sont donc les souches NO9, P71 et YAS34. Une concertation menée lors d'un des comités de pilotage de la thèse regroupant les personnes encadrant ce projet à la fois du côté du laboratoire LEMIRE et d'InVivo AgroSolution a mis en évidence un point critique au développement d'une préparation à visée commerciale. Afin d'être homologué et pouvoir être distribué, un inoculum expérimental doit être évalué en conditions réelles d'application et, pour cela, doit obtenir une autorisation de distribution pour expérimentation (ADE). La constitution d'un tel dossier réclame un investissement important à tous points de vue afin de pouvoir attester de l'innocuité du produit avant d'en revendiquer les effets bénéfiques pour la croissance des plantes. À ce titre, la relative proximité phylogénétique (bien que remise en question, nous l'avons vu précédemment) de *P. caribensis* avec le genre *Burkholderia*, au sein duquel certaines espèces sont opportunistes/pathogènes pour l'homme ou les plantes, représente un risque très important de refus d'autorisation de distribution pour l'expérimentation (ADE).

Par prudence, nous avons choisi d'écarter la souche *P. caribensis* P71 de notre liste afin de ne poursuivre l'étude que sur les souches NFM421, NO9 et YAS34.

Les trois souches sélectionnées ainsi que leurs effets phytobénéfiques potentiels sont listés dans le tableau 3.12

Tableau 3.12 : Résumé des effets phytobénéfiques complémentaires potentiels des souches sélectionnées pour la suite de l'étude.

	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	<i>E. radicitans</i> NO9	<i>R. alarii</i> YAS34
Stimulation de la croissance	✓	✓	✓
Capacité de biocontrôle	✓		
Production de métabolites antifongiques	✓		
Structuration du sol			✓
Solubilisation d'éléments minéraux		✓	

3.2 Effets des souches sélectionnées sur la croissance du colza

3.2.1 Effets des souches sur la croissance et la nutrition minérale du colza

Trois séries d'expérimentations ont été menées dans le but d'accumuler suffisamment de données pour valider l'effet de l'inoculum sur des paramètres chimiques et phénotypiques sur le colza.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Les essais ont été réalisés avec des semences de colza d'hiver (*Brassica napus*) de variété Sensation lot K11455 commercialisées par Semences de France (60 rue L. Beauchamp, 59930 La Chapelle d'Armentières) conservées hermétiquement en chambre climatisée à 9° C.

Souches bactériennes

Les trois souches bactériennes utilisées ont été transformées de façon à exprimer constitutivement une protéine fluorescente. La souche *P.brassicacearum* NFM421 marquée en rouge a été transformée au niveau du chromosome grâce à un transposon portant la séquence de la protéine fluorescente dsRed et la séquence du gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle d'un promoteur constitutif. La souche NFM421 a également été marquée en vert par l'intégration d'un plasmide p519ngfp (Matthysse *et al.*, 1996) portant la séquence codant la protéine fluorescente GFP, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle d'un promoteur constitutif. La souche *R. alamii* YAS34 contient un plasmide pHc60 portant la séquence codante de la GFP et le gène de résistance à la tétracycline sous le contrôle d'un promoteur constitutif. La souche d'*E. radicincitans* NO9 contient le plasmide pBBR1MCS-2 portant la séquence de la mKate2 (Evrogen, Russia) et le gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

Afin de pouvoir distinguer trois candidats différents avec deux couleurs fluorescentes, deux types de marquage de *P.brassicacearum* ont été utilisés selon la modalité :

Tableau 3.13 : Liste des protéines fluorescentes utilisées pour le marquage et la distinction des souches candidates.

Liste des modalités testées	Construction utilisée
Témoin négatif (eau)	
<i>P. brassicacearum</i> NFM421	NFM421 : GFP
<i>E. radicincitans</i> NO9	NO9 : mKate2
<i>R. alamii</i> YAS34	YAS34 : GFP
<i>P. brassicacearum</i> NFM421/ <i>E. radicincitans</i> NO9	NFM421 : GFP/NO9 : mKate2
<i>P. brassicacearum</i> NFM421/ <i>R. alamii</i> YAS34	NFM421 : DsRed/YAS34 : GFP
<i>E. radicincitans</i> NO9/ <i>R. alamii</i> YAS34	NO9 : mKate2/YAS34 : GFP
<i>P. brassicacearum</i> NFM421/ <i>E. radicincitans</i> NO9/ <i>R. alamii</i> YAS34	NFM421 : DsRed/NO9 : mKate2/ YAS34 : GFP

Sélection et stérilisation des graines

Les graines de colza ont été calibrées comme précédemment et stérilisées selon le protocole décrit en M&M 2.

Préparation et stockage du sol

Le sol utilisé a été échantillonné à partir du sol de surface d'une parcelle agricole située à proximité d'Aix-en-Provence (43°33'45.58'' N ; 05°28'38.78'' E) produisant du blé en monoculture. Le sol récolté a été débarrassé des pailles, insectes, pierres et racines, tamisé à 2,5 mm et étalé afin de sécher naturellement. Le sol a été stocké dans des bacs conservés à température ambiante (humidité mesurée dans le bac avant usage : entre 5 et 7 %).

Préparation des semis

Le sol a été réhydraté et homogénéisé manuellement, puis réparti dans les pots « MW » (schéma en Annexe 3) selon le protocole décrit en M&M 5

Préparation des pré-inoculum

Les souches ont été cultivées comme décrit en M&M 1. Un millilitre de préculture a été utilisé pour inoculer 250 mL de TSB/10^{ème}, puis cultivé 24 h à 28° C sous agitation.

Lavage et calibration des pré-inoculum

Le lavage a été réalisé comme décrit en M&M 2 en resuspendant les culots dans 50 mL d'eau MilliQ stérile, puis une série de dilutions a été réalisée pour permettre le comptage des cellules au microscope (BX60 fluoview confocal, Olympus, Japan) selon le protocole décrit en M&M 4.

Sélection et stérilisation des graines

Afin d'essayer d'obtenir davantage d'homogénéité dans la levée des semis, les graines de colza ont été calibrées entre deux tamis afin de sélectionner celles dont le diamètre était compris entre 1,6 et 2,0 mm. Elles ont été stérilisées selon le protocole précédemment décrit en M&M 2.

Inoculation des semis

L'inoculum a été obtenu en combinant les pré-inoculum pour une concentration finale de 1.10⁸ cfu.mL⁻¹ chacun. L'inoculation du semis a été réalisée en arrosant chaque graine progressivement avec 1 mL d'inoculum.

Randomisation des plants

Les 8 modalités sont réparties de façon aléatoire au sein de chacun des 8 blocs en utilisant une macro-instruction Excel (Microsoft, USA) (Annexe 6).

Mise en culture des plants

Les semis inoculés ont été transférés en cellule de culture selon le plan précédemment établi (Figure 3.25) et couverts pendant les 16 premières heures de culture pour éviter la déshydratation et ainsi favoriser la germination. La photopériode de type « jour court » a été définie à 8 h de jour et 16 h de

nuits, un éclairage de 200 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons. La température du jour a été fixée à 22 °C, celle de la nuit à 19 °C avec une consigne de 25 °C maximum. La consigne de CO₂ a été fixée à 380 $\mu\text{L.l}^{-1}$. L'arrosage a été consigné à 17 mL.pot⁻¹.jour⁻¹ pendant la première partie de l'essai, puis augmenté à 20 mL.pot⁻¹.jour⁻¹.

The figure consists of three 4x4 grids, each representing a randomization plan for a different trial. Each cell in the grid contains a specific treatment combination. The treatments are: NO9 mKate2, Eau, NF GFP, YAS34 GFP, and combinations of NO9 mKate2 and YAS34 GFP. The grids show how these treatments are distributed across 16 blocks in a randomized order.

Figure 3.25 : Plans de randomisation appliqués aux essais 1, 2 et 3. Chaque modalité est présente au sein de chacun des 8 blocs. D'un bloc à l'autre, les modalités ont été réarrangées aléatoirement. (NF = *P. brassicacearum* NFM421, NO9 = *E. radicans*, YAS34 = *R. alarii*).

Suivi et éclaircissement des cultures

Les cultures ont duré 5 semaines (Figure 3.26). Deux inoculations ont été réalisées, la première le premier jour, l'autre 8 à 16 jours plus tard selon l'essai. L'essai initialement irrigué à l'eau distillée a été irrigué au moyen d'une solution Coïc-Lesaint (cf. Annexe 2) à 0,5 X dès le 12^{ème} jour jusqu'à la fin de l'essai. L'irrigation initialement réglée à 17 mL par pot par jour a été augmentée à 20 mL par pots par jour à partir du 15^{ème} jour de culture jusqu'au terme de l'essai. Dès le début de l'essai, des éclaircissements quotidiens des semis ont été réalisés en déracinant les plantules de colza surnuméraires pour garantir l'homogénéité du nombre de plants et en déracinant toutes les repousses de plantules étrangères au semis.

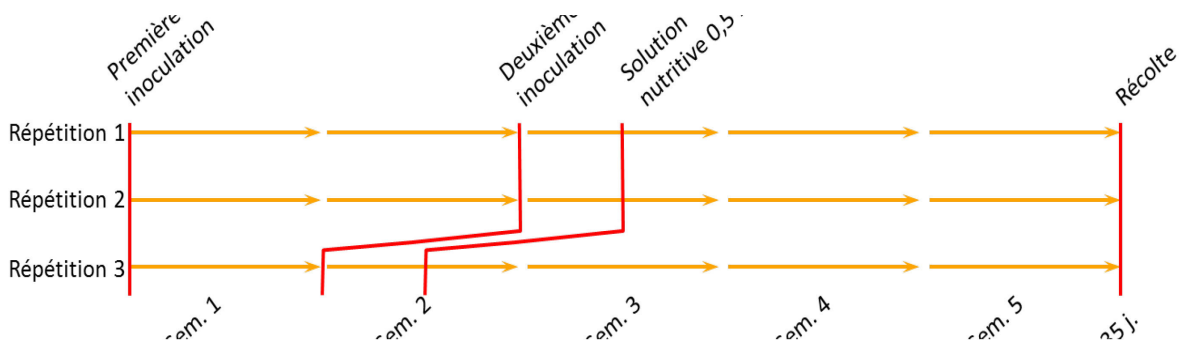


Figure 3.26 : Chronologie des 3 répétitions de l'essai en sol agricole non stérilisé.

Arrêt de l'essai

L'irrigation a été interrompue 24 h avant récolte. Le jour de la récolte, les blocs retirés ont été isolés dans un sac hermétique afin de limiter les pertes en eau et conservés en chambre climatisée à 9° C en attendant d'être traités.

Echantillonnage de l'essai

Pour chaque plantule, un échantillon de sol adhérent a été collecté pour en mesurer l'humidité. La partie racinaire, le sol adhérent et les parties aériennes ont été récoltés. Les échantillons racinaires ont ensuite été broyés, puis une série de dilutions a été réalisée pour visualiser les souches marquées sur milieu sélectif. Le sol adhérent a été séché puis pesé. Le détail de ces opérations est donné en M&M 5.

Résultats

Suivi des souches candidates sur les racines.

Les racines récoltées lors des différentes répétitions de cet essai ont été broyées stérilement et le broyat a été dilué afin d'être étalé sur une gélose de TSA $1/10^{ème}$.

L'observation macroscopique à la lumière et en épifluorescence de l'étalement sur boîte de Petri des broyats racinaire de chaque modalité nous a permis de repérer les souches candidates parmi le microbiote cultivable de rhizoplan et d'en estimer leur fréquence (Tableau 3.14).

Tableau 3.14 : Chacune des répétitions possède 8 blocs indépendants contenant chacun toutes les modalités. Cette figure donne le pourcentage total des modalités par répétition dans lesquelles ont pu être identifiées les souches Inoculées.

Modalité	Fréquence (en%) de la présence des candidats par modalité		
	<i>P.brassicacearum</i>	<i>E.radicincitans</i>	<i>R.alamii</i>
Série 1			
Eau			
NFM421	100,0%		
NO9		62,5%	
YAS34			50,0%
NFM421 / NO9	75,0%	12,5%	
NFM421 / YAS34	100,0%		50,0%
NO9 / YAS34		75,0%	50,0%
NFM421 / NO9 / YAS34	100,0%	0,0%	75,0%
Série 2			
Eau			
NFM421	100,0%		
NO9		87,5%	
YAS34			87,5%
NFM421 / NO9	100,0%	25,0%	
NFM421 / YAS34	100,0%		87,5%
NO9 / YAS34		62,5%	100,0%
NFM421 / NO9 / YAS34	100,0%	12,5%	100,0%
Série 3			
Eau			
NFM421	100,0%		
NO9		25,0%	
YAS34			100,0%
NFM421 / NO9	100,0%	12,5%	
NFM421 / YAS34	100,0%		100,0%
NO9 / YAS34		25,0%	100,0%
NFM421 / NO9 / YAS34	100,0%	0,0%	100,0%

La taille des populations bactériennes (cultivables) et de celle des souches inoculées a pu être estimée à partir des observations réalisées (Tableau 3.15).

Tableau 3.15 : Taille des populations « totales » et de celle des souches inoculées. La concentration donnée est la concentration moyenne des 8 répétitions de chaque modalité. « Totale » représente la mesure du microbiote cultivable mesuré dans ces conditions. « nd » désigne une absence de donnée.

	Modalité	Concentration CFU.mg ⁻¹ de racine			
		Totale	<i>P.brassicearum</i>	<i>E.radicincitans</i>	<i>R.alamii</i>
Série 1	Eau	1,0E+06			
	NFM421	2,4E+06	9,7E+03		
	NO9	3,3E+06		9,8E+02	
	YAS34	3,0E+06			2,5E+03
	NFM421 / NO9	4,3E+06	2,1E+03	4,2E+02	
	NFM421 / YAS34	1,6E+06	2,4E+04		2,2E+01
	NO9 / YAS34	1,4E+06		6,6E+02	3,2E+01
	NFM421 / NO9 / YAS34	1,7E+06	2,2E+04	nd	2,5E+01
Série 2	Eau	1,5E+06			
	NFM421	6,1E+05	7,2E+03		
	NO9	8,9E+05		9,0E+03	
	YAS34	5,3E+05			2,3E+03
	NFM421 / NO9	7,7E+05	8,0E+03	4,8E+03	
	NFM421 / YAS34	1,5E+06	6,5E+04		3,8E+03
	NO9 / YAS34	1,5E+06		1,0E+04	6,6E+04
	NFM421 / NO9 / YAS34	8,5E+05	2,0E+04	1,0E+03	2,0E+03
Série 3	Eau	2,1E+05			
	NFM421	3,8E+05	1,1E+04		
	NO9	7,4E+05		6,7E+02	
	YAS34	3,1E+05			6,1E+02
	NFM421 / NO9	3,5E+05	7,5E+03	1,2E+01	
	NFM421 / YAS34	3,5E+05	5,1E+03		4,4E+02
	NO9 / YAS34	5,1E+05		8,0E+01	4,3E+02
	NFM421 / NO9 / YAS34	3,6E+05	1,1E+04	nd	5,0E+02

Il apparaît que la souche NO9 se maintient dans le sol à faible densité. A l'inverse, les souches NFM421 et *R. alamii* YAS34 sont fréquemment retrouvées dans les broyats racinaires. Les valeurs moyennes pour toutes les répétitions sont résumées dans le tableau 3.16.

Tableau 3.16 : Fréquence moyenne d'apparition des candidats par répétition et concentration moyenne des candidats par répétition.

	Série 1	Série 2	Série 3
	Pourcentage de présence des candidats		
<i>P. brassicacearum</i> NFM421	98%	100%	100%
<i>E. radicincitans</i> NO9	38%	47%	16%
<i>R. alamii</i> YAS34	56%	94%	100%
	Concentration moyenne en CFU.mg ⁻¹ de racine		
Microbiote total cultivable	2,3E+06	1,0E+06	4,0E+05
<i>P. brassicacearum</i> NFM421	1,5E+04	2,5E+04	8,6E+03
<i>E. radicincitans</i> NO9	7,7E+02	8,3E+03	3,0E+02
<i>R. alamii</i> YAS34	5,8E+02	1,9E+04	5,0E+02

Mesure des paramètres agronomiques d'intérêt sur les plantules de colza

Analyse préalable au traitement des données

Notre souhait premier a été de standardiser au maximum les conditions de culture afin que les trois séries présentées ne représentent en définitive que les trois répétitions biologiques d'une seule et même expérience. Cette méthode nous aurait permis de cumuler les données dans le but de passer d'un effectif de 8 échantillons par modalité à 24 et, ainsi, gagner en puissance.

Cependant une analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur le logiciel SIMCA (Umetrics, Umeå, Sweden) par Catherine Santaella (LEMIRE) témoigne d'une distance importante entre les données des différentes séries comme l'illustre la figure 3.27.

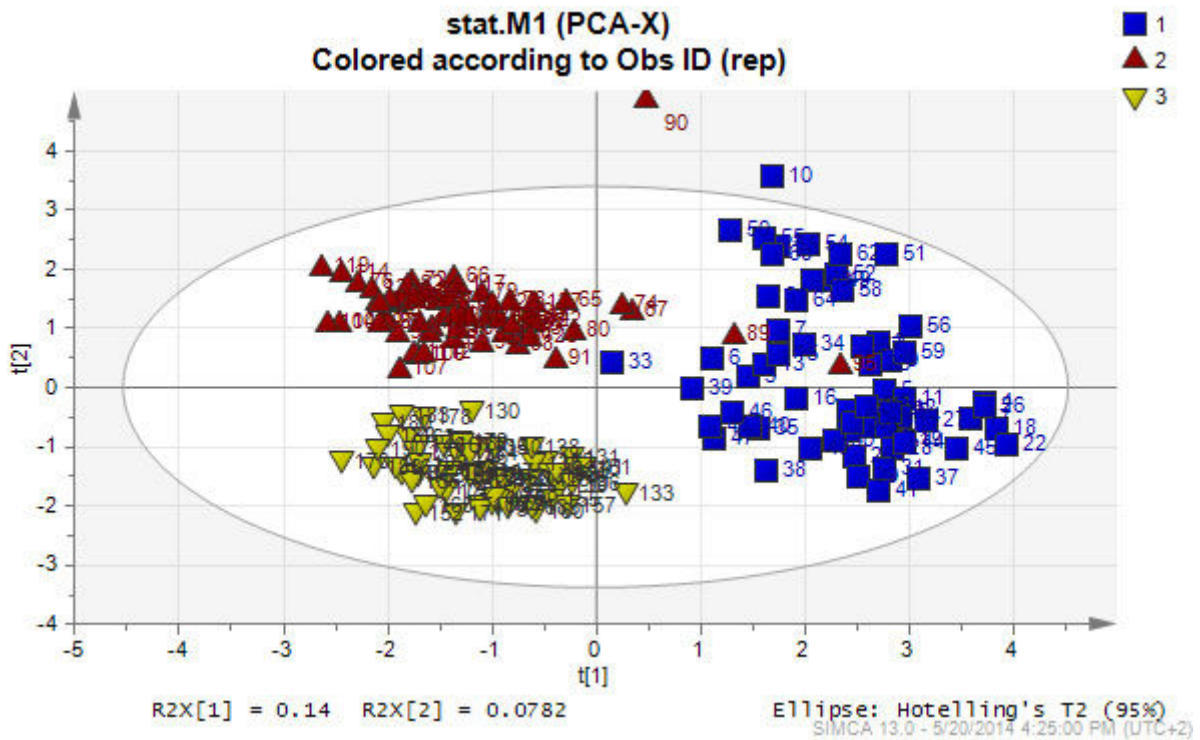


Figure 3.27 : Représentation graphique de l'analyse en composantes principales des données des séries 1 (carré bleu), 2 (triangle rouge) et 3 (triangle inversé jaune) organisées selon le facteur modalité et bloc.

En outre, une erreur commise dans le protocole de la troisième série (Figure 3.26) a nécessité de procéder à une deuxième inoculation anticipée d'une semaine. En conséquence, nous avons choisi de traiter ces données séparément en trois séries distinctes.

Mesure de la puissance de l'essai

La mesure de la puissance de l'essai a été réalisée dans le M&M 6 à partir des données synthétisées dans le tableau 3.17.

Tableau 3.17 : Résumé des statistiques descriptives des données des trois séries d'expérimentation en sol. « \bar{x} » : moyenne, « s » : écart type, « CV% » : coefficient de variation, « PA » : partie aérienne, « PR » : partie racinaire, « SA » : sol adhérent aux racines.

	Paramètre mesuré	\bar{x}	s	CV %
Série 1	Masse PA (mg)	156,34	47,42	30,33
	Masse PR (mg)	52,75	18,02	34,16
	Masse PR/Masse PA	0,34	0,08	24,06
	Masse SA/Masse PR	45,53	30,69	67,41
	Humidité (%)	10,89	3,12	28,63
Série 2	Masse PA (mg)	83,62	32,77	39,19
	Masse PR (mg)	23,41	14,63	62,49
	Masse PR/Masse PA	0,29	0,18	62,93
	Masse SA/Masse PR	26,11	13,81	52,90
	Humidité (%)	8,40	0,86	10,25
Série 3	Masse PA (mg)	101,42	22,33	22,02
	Masse PR (mg)	23,86	7,78	32,61
	Masse PR/Masse PA	0,24	0,06	23,91
	Masse SA/Masse PR	37,45	14,21	37,95
	Humidité (%)	7,47	0,78	10,41

En résumé, chacune des séries est composée de 64 échantillons, ces échantillons étant organisés et randomisés au sein de 8 blocs. L'estimation de l'effectif minimal est donnée dans le tableau 3.18 en faisant varier le risque α entre 5 et 10 % et la différence « souhaitée » « Δ » entre 20 et 30 %.

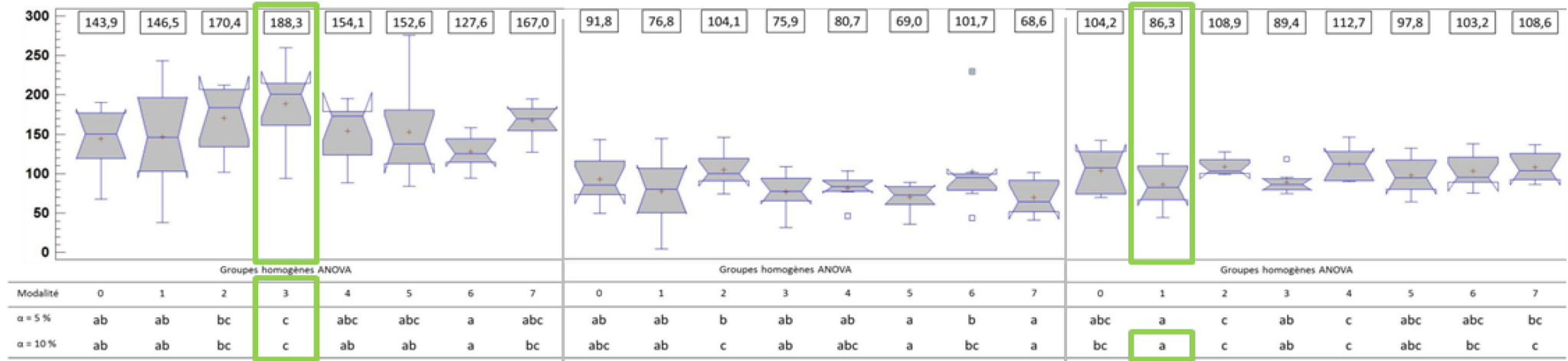
Tableau 3.18 : Estimation des effectifs minimums « Rép. Min » permettant, compte tenu des variations mesurées, d'obtenir une puissance suffisante pour répondre à la question posée. Les valeurs compatibles avec le dispositif expérimental sont encadrées en vert.

		β fixé à 10 %			Δ % Δ%/CV % Rép. min			Δ % Δ%/CV % Rép. min			Δ % Δ%/CV % Rép. min		
Série 1	α = 5 %	Masse PA	10	0,33	-	20	0,66	-	30	0,99	24		
		Masse PR	10	0,29	-	20	0,59	-	30	0,88	30		
		Masse PR/Masse PA	10	0,42	-	20	0,83	33	30	1,25	17		
		Masse SA/Masse PR	10	0,15	-	20	0,30	-	30	0,45	-		
		Humidité	10	0,35	-	20	0,70	-	30	1,05	22		
	α = 10 %	Masse PA	10	0,33	-	20	0,66	40	30	0,99	20		
		Masse PR	10	0,29	-	20	0,59	-	30	0,88	25		
		Masse PR/Masse PA	10	0,42	-	20	0,83	26	30	1,25	14		
		Masse SA/Masse PR	10	0,15	-	20	0,30	-	30	0,45	-		
		Humidité	10	0,35	-	20	0,70	37	30	1,05	18		
Série 2	α = 5 %	Masse PA	10	0,26	-	20	0,51	-	30	0,77	37		
		Masse PR	10	0,16	-	20	0,32	-	30	0,48	-		
		Masse PR/Masse PA	10	0,16	-	20	0,32	-	30	0,48	-		
		Masse SA/Masse PR	10	0,19	-	20	0,38	-	30	0,57	-		
		Humidité	10	0,98	24	20	1,95	9	30	2,93	6		
	α = 10 %	Masse PA	10	0,26	-	20	0,51	-	30	0,77	33		
		Masse PR	10	0,16	-	20	0,32	-	30	0,48	-		
		Masse PR/Masse PA	10	0,16	-	20	0,32	-	30	0,48	-		
		Masse SA/Masse PR	10	0,19	-	20	0,38	-	30	0,57	-		
		Humidité	10	0,98	20	20	1,95	7	30	2,93	5		
Série 3	α = 5 %	Masse PA	10	0,45	-	20	0,91	28	30	1,36	15		
		Masse PR	10	0,31	-	20	0,61	-	30	0,92	28		
		Masse PR/Masse PA	10	0,42	-	20	0,84	32	30	1,25	17		
		Masse SA/Masse PR	10	0,26	-	20	0,53	-	30	0,79	36		
		Humidité	10	0,96	25	20	1,92	9	30	2,88	6		
	α = 10 %	Masse PA	10	0,45	-	20	0,91	22	30	1,36	12		
		Masse PR	10	0,31	-	20	0,61	-	30	0,92	22		
		Masse PR/Masse PA	10	0,42	-	20	0,84	26	30	1,25	14		
		Masse SA/Masse PR	10	0,26	-	20	0,53	-	30	0,79	30		
		Humidité	10	0,96	20	20	1,92	7	30	2,88	5		

Suite à l'estimation des effectifs minimums détaillée dans le M&M 6, nous constatons que, compte tenu des variations mesurées, le nombre de répétitions par traitement que nous avons utilisé (8) est théoriquement insuffisant pour nous garantir d'être en mesure de relever une différence entre les modalités de l'ordre de 30 % aux risques $\alpha = 10\%$ et $\beta = 10\%$. Seules les séries 2 et 3 de ces essais nous offrent suffisamment de puissance pour être sûrs de pouvoir conclure sur les valeurs relativement homogènes de l'humidité.

À l'observation des résultats résumés sur la figure 3.28, en se basant sur les valeurs des écarts types, on constate que, malgré le souci permanent de standardiser les conditions de culture, la méthode a évolué entre la première série et les deux suivantes.

Effet modalité : Evolution de la masse de la partie aérienne (mg)



Effet modalité : Evolution de la masse de la partie racinaire (mg)

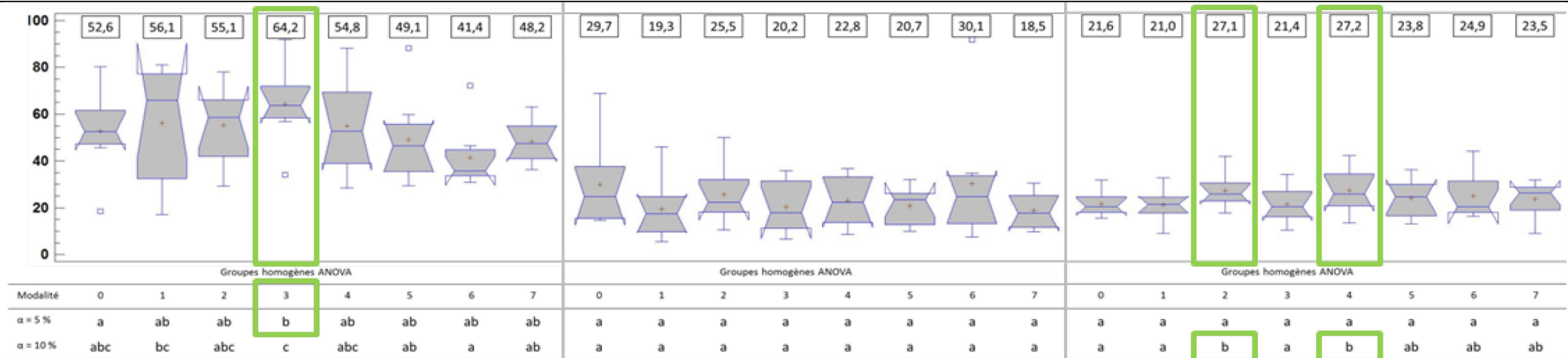
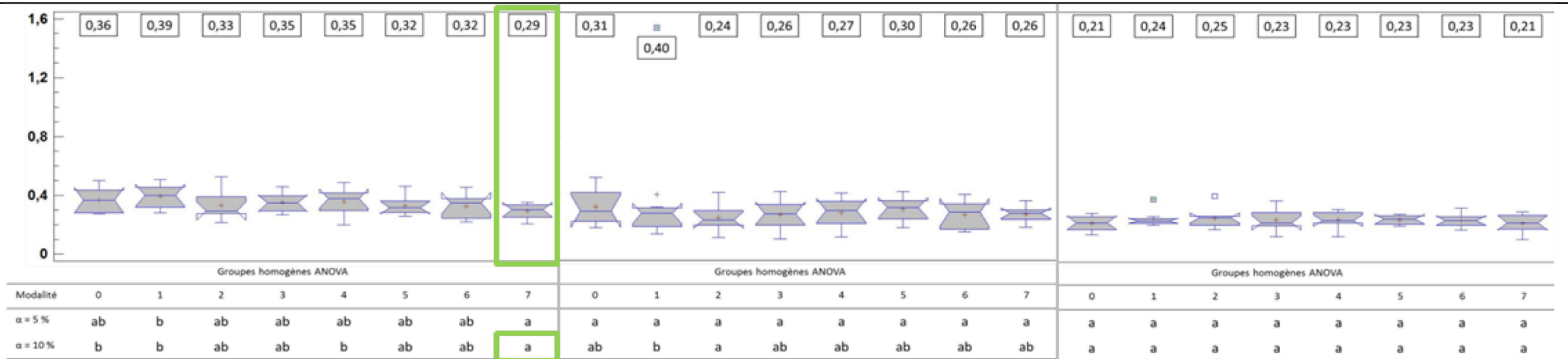


Figure 3.28 : (Partie 1) Synthèse des données mesurées à l'issue des trois séries d'expérimentation. Les valeurs des moyennes ont été inscrites dans le cadre au dessus de chaque modalité. Le tableau sous les boîtes à moustaches donne les groupes homogènes formés au moyen d'un test de type ANOVA (ANalysis Of VARIance).

Effet modalité : Evolution du rapport masse partie racinaire sur masse partie aérienne



Effet modalité : Evolution du rapport masse de sol adhérent sur masse partie racinaire

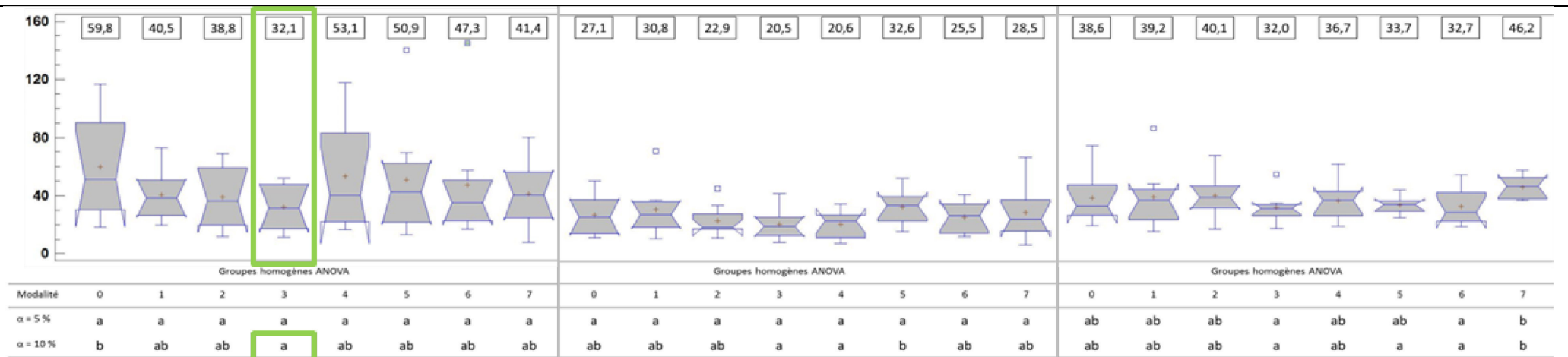


Figure 3.28 : (Partie 2) Synthèse des données mesurées à l'issue des trois séries d'expérimentation. Les valeurs des moyennes ont été inscrites dans le cadre au dessus de chaque modalité. Le tableau sous les boîtes à moustaches donne les groupes homogènes formés au moyen d'un test de type ANOVA (ANalysis Of VARIance).

Effet modalité : Evolution de l'humidité massique du sol (%)

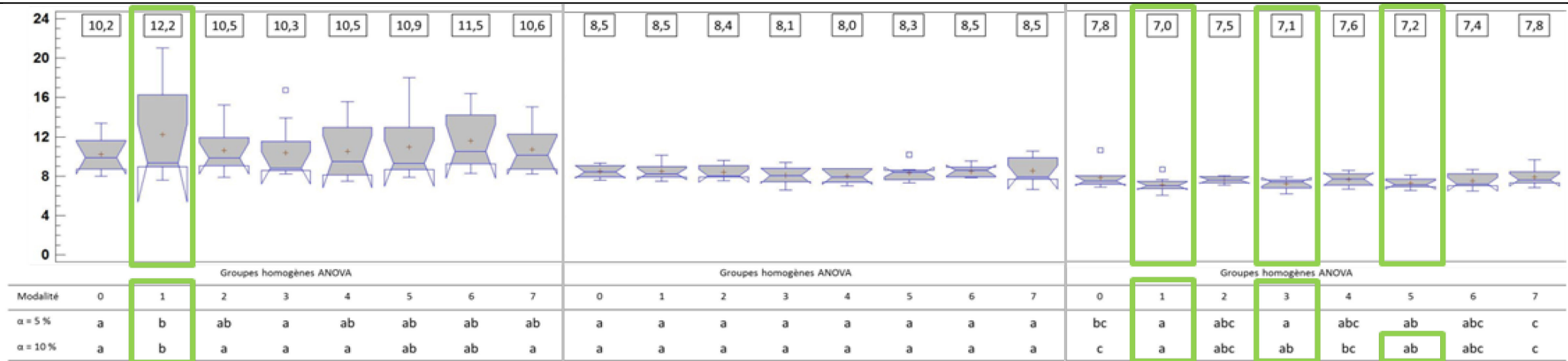


Figure 3.28 : (Partie 3) Synthèse des données mesurées à l'issue des trois séries d'expérimentation. Les valeurs des moyennes ont été inscrites dans le cadre au dessus de chaque modalité. Le tableau sous les boîtes à moustaches donne les groupes homogènes formés au moyen d'un test de type ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE).

Codage des modalités :

- Modalité 0 : témoin négatif « eau »
- Modalité 1 : simple inoculation *P. brassicacearum* NFM421
- Modalité 2 : simple inoculation *E. radicincitans* NO9
- Modalité 3 : simple inoculation *R. alamii* YAS34
- Modalité 4 : double inoculation NFM421/NO9
- Modalité 5 : double inoculation NFM421/YAS34
- Modalité 6 : double inoculation NO9/YAS34
- Modalité 7 : triple inoculation NFM421/NO9/YAS34

Résumé des effets significatifs dans la première série :

- La simple inoculation *R. alamii* YAS34 (modalité 3) stimule significativement la croissance de la partie aérienne (PA) face au témoin ($\alpha = 5$ ou 10%).
- La simple inoculation avec la souche YAS34 (modalité 3) stimule significativement la croissance de la partie racinaire (PR) face au témoin ($\alpha = 5\%$).
- La triple inoculation NFM421/NO9/YAS34 (modalité 7) se traduit par un rapport PR/PA significativement diminué face au témoin ($\alpha = 10\%$). L'allocation du carbone dans les racines semble légèrement diminuée dans ces conditions.
- La simple inoculation avec la souche YAS34 (modalité 3) se traduit pas un rapport « sol-adhérent aux racines/partie racinaire » (SA/PR) significativement diminué en comparaison avec le témoin ($\alpha = 10\%$).
- La simple inoculation avec la souche NFM421 (modalité 1) se traduit par une humidité post-récolte significativement supérieure au témoin ($\alpha = 5$ ou 10%).

Effets significatifs dans la deuxième série :

- Aucun effet significatif n'a pu être observé de la part d'une modalité en comparaison avec le témoin.

Effets significatifs dans la troisième série :

- La simple inoculation avec la souche NFM421 (modalité 1) diminue significativement la masse de la partie aérienne face au témoin ($\alpha = 10\%$).
- La simple inoculation avec *E. radicincitans* NO9 et la double inoculation NFM421/NO9 (respectivement modalités 2 et 4) se traduisent par une augmentation significative de la masse de la partie racinaire en comparaison avec le témoin ($\alpha = 10\%$).
- Dans l'inoculation par la souche NO9 et la simple inoculation avec la souche YAS34 (respectivement modalités 2 et 3) l'humidité post-récolte est significativement inférieure à celle du témoin ($\alpha = 5$ ou 10%) ainsi que dans la modalité 5 (double inoculation NFM421/YAS34) au seuil ($\alpha = 10\%$).

En conclusion, il n'apparaît pas d'effet significatif que l'on puisse retrouver dans les trois séries. L'observation des données d'écart-types et de coefficients de variation (Tableau 3.17) permet de mettre en évidence une diminution de la variabilité des paramètres mesurés et donc d'une

augmentation de la puissance de l'essai au fil des séries (observable également dans le tableau 3.18). Il peut paraître donc plus prudent de discuter des tendances observées dans la troisième série, bien que la puissance de l'essai soit insuffisante pour garantir sa capacité à détecter une différence si elle existe.

Il n'en reste pas moins que la souche YAS34 a un effet significatif et positif sur la croissance du colza dans la première série : la masse moyenne de la partie aérienne de la simple inoculation avec la souche YAS34 (modalité 3) est de 188 mg ce qui représente près de 31 % d'augmentation par rapport au témoin (modalité 0, avec 144 mg) et la masse moyenne de la partie racinaire est de 64 mg ce qui représente une augmentation de près de 22 % face au témoin non inoculé (modalité 0, avec 53 mg).

Concernant NO9, les données obtenues sur la troisième série mettent en évidence une tendance à la stimulation de la croissance des racines. Cette observation va dans le sens des données présentées dans la littérature. Il apparaît cependant que toutes les modalités contenant NO9 ne réagissent pas de la même façon. Les modalités 6 (double inoculation NO9/YAS34) et 7 (triple inoculation NFM421/NO9/YAS34) bien que légèrement supérieures au témoin n'en sont pas significativement différentes comme si l'ajout de la souche YAS34 (dénominateur commun à ces modalités) perturbait l'efficacité de NO9. En confrontant ces données avec celles présentées dans le tableau 3.15, nous pouvons conclure que l'absence d'effet de NO9 sur la modalité 7 (triple inoculation NFM421/NO9/YAS34) est probablement liée à un déficit de colonisation du rhizoplan. En revanche, pour la modalité 6 (double inoculation NO9/YAS34), les données de dénombrement ont permis d'estimer la colonisation racinaire par la souche NO9 à 80 CFU.mg⁻¹ de racine, du même ordre de grandeur que pour la modalité 4 (double inoculation NFM421/NO9) estimée à 12 CFU.mg⁻¹. Aucun effet n'ayant pu être observé, deux hypothèses sont envisageables : la souche YAS34 interagirait directement ou indirectement sur l'effet rhizostimulateur de la souche NO9 ou tout simplement, comme nous l'avons vu précédemment, l'essai n'est pas assez puissant pour voir cette différence si elle existe. Nous reviendrons sur cette hypothèse par la suite dans un nouvel essai de co-inoculation en sol agricole non stérilisé dans lequel nous avons choisi de diminuer les modalités pour augmenter les effectifs et, ainsi, tenter de gagner en puissance de l'essai.

Dosage des éléments minéraux par ICP-AES

Les souches bactériennes utilisées dans l'inoculum sont connues pour stimuler la croissance des plantes de deux façons. En marge des effets de stimulation directe de la croissance (production de phytohormones), une souche PGPR peut agir indirectement notamment en stimulant l'absorption des micronutriments par la racine ou en mettant à disposition de celle-ci de nouvelles ressources initialement inaccessibles. L'analyse fine du profil minéral des parties aériennes et racinaires des échantillons avait pour objectif de mettre en évidence un éventuel effet des bactéries sur l'absorption par la plante de certains minéraux.

Parmi tous les éléments minéraux dosés, nous avons choisi de ne présenter que les données relatives au phosphore, un élément limitant pour le développement de la plantule et dont la teneur de notre sol est faible à très faible (Cf. annexe 5), et celles relatives au soufre, un élément primordial pour le métabolisme basal du fait qu'il entre dans la composition des acides aminés (méthionine, cystéine et leur dérivés), mais aussi dans la composition de molécules de défense des plantes comme les glucosinolates du colza notamment.

Matériels et méthodes

Dissolution des échantillons

Les échantillons (broyats racinaires et parties aériennes) ont été dissous dans l'acide nitrique concentré puis filtrés selon le protocole donné dans le M&M 7. Les dosages ont ensuite été effectués par Pierre Richaud (LB3M, BIAM, CEA Cadarache).

Mesure de la teneur par ICP-AES

Les valeurs obtenues ont ensuite été converties en concentration finale en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ selon la méthode présentée dans le M&M 7.

Mesure de la puissance de l'essai

Seules les valeurs mesurées pour le soufre et le phosphore ont été retenues pour la suite de l'étude. La mesure de la puissance de l'essai a été effectuée par la méthode présentée dans le M&M 6 avec les données synthétisées dans le M&M 7.

Résultats

Les teneurs mesurées exprimées en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ sont présentées dans les figures suivantes sous forme de boîtes à moustaches. La valeur de la moyenne a été inscrite dans le cadre au-dessus de la boîte à moustache correspondante.

L'analyse statistique des résultats réalisée par un test ANOVA à deux voies (effet modalité et effet bloc) met en évidence que la simple inoculation avec *R. alarii* YAS34 (modalité 3) diminue de façon significative ($\alpha = 5\%$) la teneur en phosphore de la partie aérienne des plantes de la série 2 avec $2,1 \mu\text{g.mg}^{-1}$ contre $2,4 \mu\text{g.mg}^{-1}$ pour le témoin (Figure 3.29). Cet effet n'a pas été retrouvé dans les plantules de la série 3. Nous n'avons pas observé de différences significatives concernant le soufre (Figure 3.29).

La simple inoculation avec *E. radicincitans* NO9 (modalité 2, série 3) augmente de façon significative la teneur en phosphore des racines ($7,2 \mu\text{g.mg}^{-1}$ contre $3,5 \mu\text{g.mg}^{-1}$ pour le témoin, figure 3.30). La triple inoculation avec NFM421/NO9/YAS34 (modalité 7 de la série 3) augmente de façon significative ($\alpha = 5\%$) la teneur en soufre des racines ($0,5 \mu\text{g.mg}^{-1}$ contre $0,4 \mu\text{g.mg}^{-1}$ pour le témoin, figure 3.30). Cet effet n'est pas retrouvé dans les valeurs de la série 2.

Avec un seuil α fixé à 10%, la simple inoculation *R. alarii* YAS34 (modalité 3, série 2) et la double inoculation NFM421/NO9 (modalité 4, série 2) diminuent de façon significative la teneur en soufre des racines (avec respectivement $0,19$ et $0,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre $0,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le témoin, figure 3.30). Dans la troisième série, la simple inoculation *E. radicincitans* NO9 (modalité 2) augmente significativement la teneur en soufre des racines ($0,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre $0,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le témoin, figure 3.30).

Codage des modalités :

- Modalité 0 : témoin négatif « eau »
- Modalité 1 : simple inoculation avec *P. brassicacearum* NFM421
- Modalité 2 : simple inoculation avec *E. radicincitans* NO9
- Modalité 3 : simple inoculation avec *R. alarii* YAS34
- Modalité 4 : double inoculation avec NFM421/NO9
- Modalité 5 : double inoculation avec NFM421/YAS34
- Modalité 6 : double inoculation avec NO9/YAS34
- Modalité 7 : triple inoculation avec NFM421/NO9/YAS34

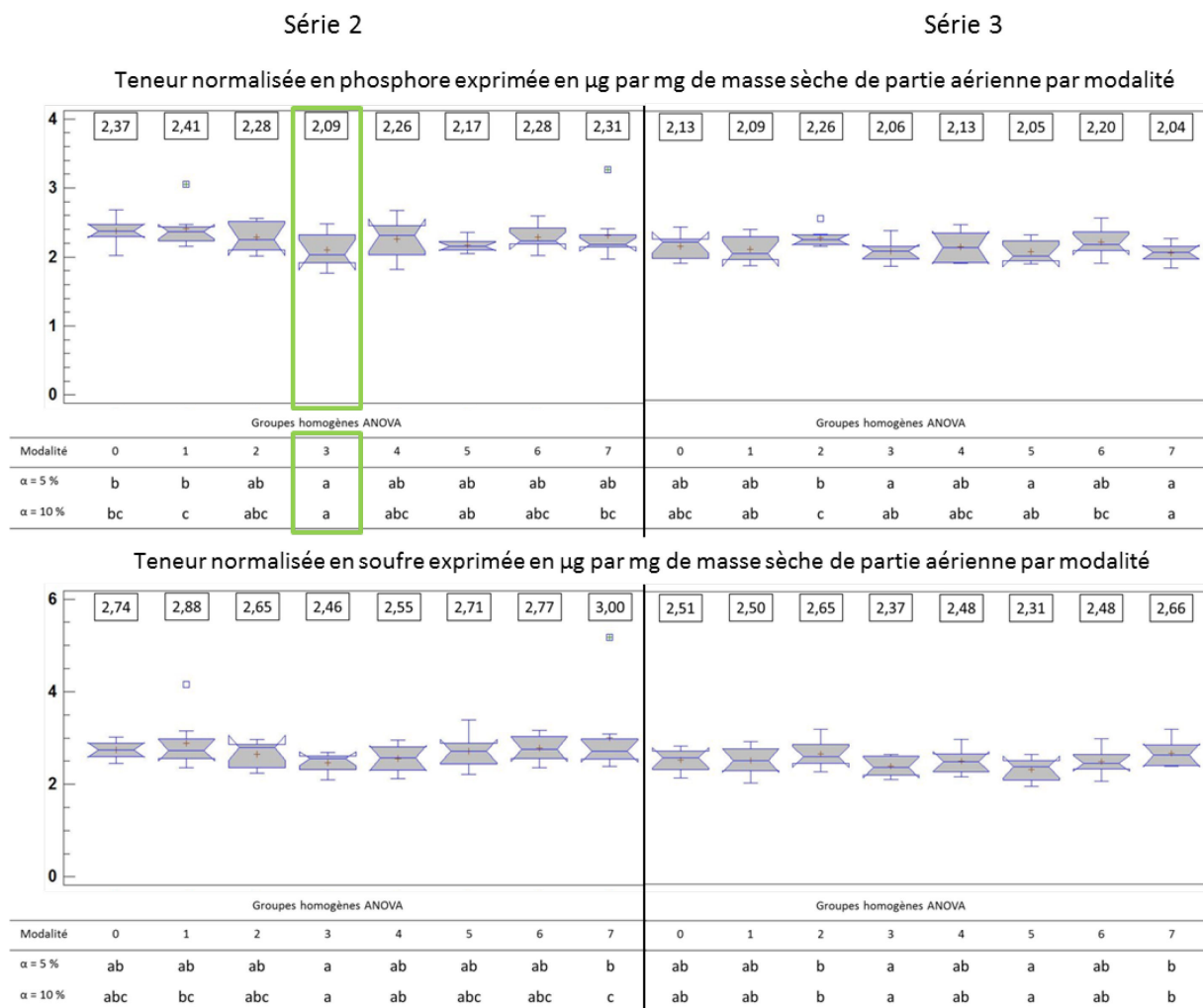


Figure 3.29 : Teneur en phosphore et en soufre mesurées **par modalité** dans la **partie aérienne** des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.

Série 2

Série 3

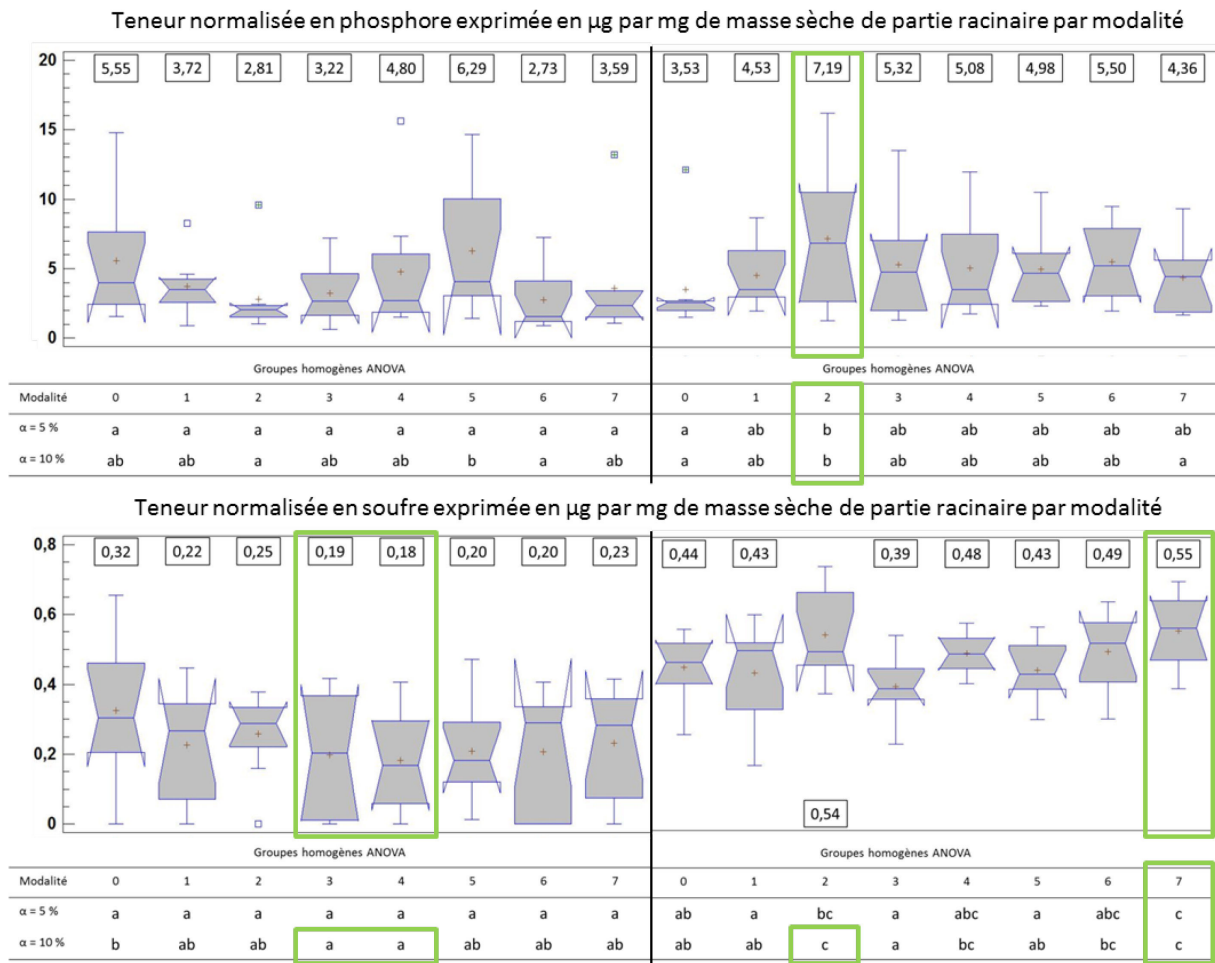


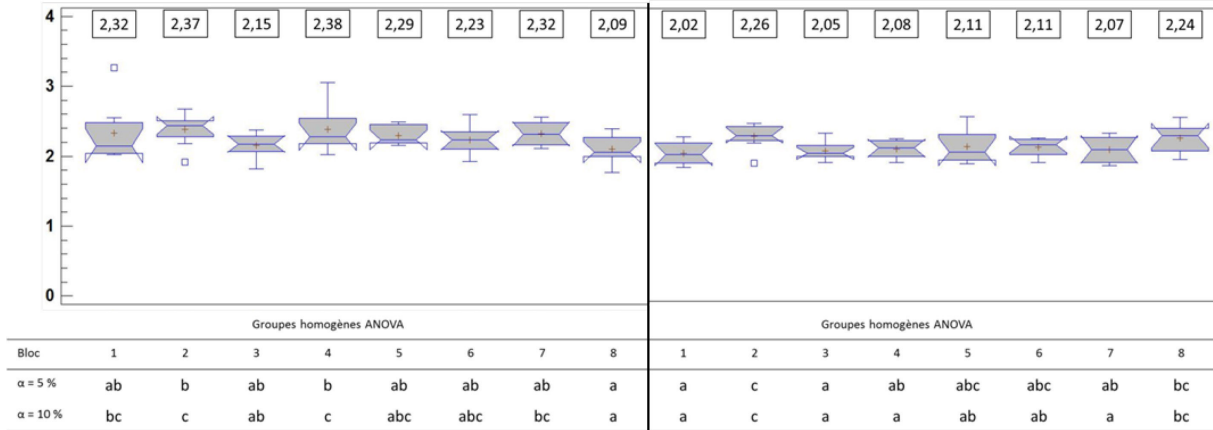
Figure 3.30 : Teneur en phosphore et en soufre mesurées par modalité dans la partie racinaire des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.

Nous pouvons voir sur figures suivantes l'illustration des conclusions émises lors du calcul de la puissance de l'essai. Les valeurs mesurées pour les parties aériennes présentent peu de variations et une bonne homogénéité au niveau des blocs alors que celle mesurées pour la partie racinaire est très variable (Figures 3.31 et 3.32).

Série 2

Série 3

Teneur normalisée en phosphore exprimée en μg par mg de masse sèche de partie aérienne par bloc



Teneur normalisée en soufre exprimée en μg par mg de masse sèche de partie aérienne par bloc

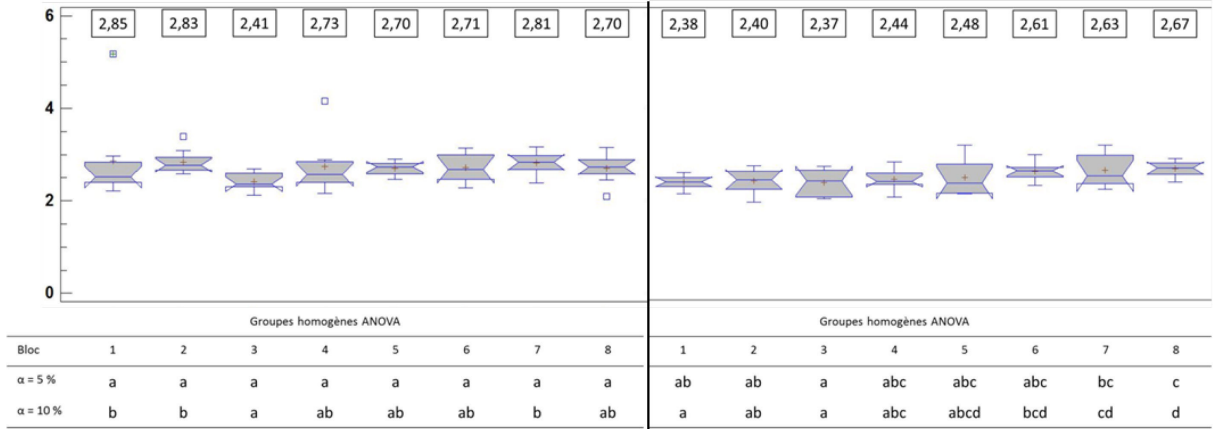


Figure 3.31 : Teneurs en phosphore et en soufre mesurées **par bloc** dans la **partie aérienne** des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.

Série 2

Série 3

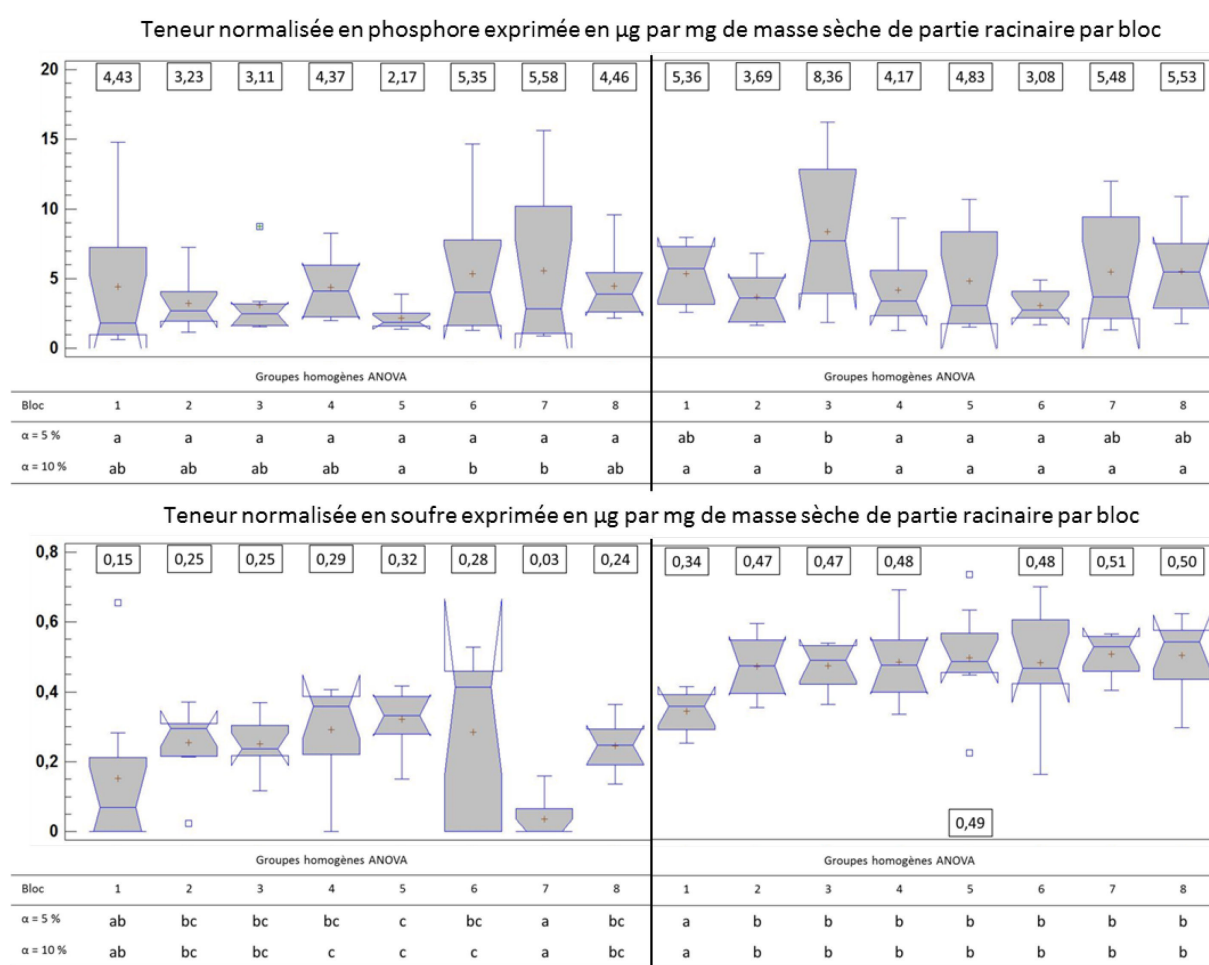


Figure 3.32 : Teneurs en phosphore et en soufre mesurées **par bloc** dans la **partie racinaire** des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.

Comme nous l'avons observé pour l'analyse précédente réalisée sur la masse des parties aériennes, racinaires et du sol adhérent, malgré un soin particulier apporté aux conditions de culture, il apparaît que les différences entre les séries demeurent importantes et ne permettent pas de dégager de tendance nette concernant l'effet de l'inoculum sur la nutrition minérale du colza.

Récapitulatif des effets observés :

- *E. radicincitans* NO9 augmente significativement la teneur en phosphore ($\alpha = 5$ et 10% , série 3) et en soufre ($\alpha = 10\%$, série 3) des parties racinaires des plantes,
- *R. alarii* YAS34 diminue significativement la teneur en phosphore ($\alpha = 5$ et 10% , série 2) des parties aériennes des plantes et diminue significativement la teneur en soufre ($\alpha = 10\%$, série 2) des parties racinaires des plantes,
- La double inoculation *P. brassicacearum* NFM421/NO9 diminue significativement la teneur en soufre ($\alpha = 10\%$, série 2) des parties racinaires des plantes,
- La triple inoculation NFM421/NO9/YAS34 augmente significativement la teneur en soufre ($\alpha = 5$ et 10% , série 3) des parties racinaires des plantes.

Essai de co-inoculation en effectifs augmentés

L'essai a été préparé selon le protocole utilisé dans l'essai précédent (M&M 5).

Dans le but d'augmenter la puissance de l'essai, nous avons choisi d'augmenter les effectifs pour les conditions que nous avons estimées prioritaires. Le nombre de modalités d'inoculation a été ramené à deux : la modalité « inoculée » (notée « I ») a reçu un inoculum composé en proportions égales d'une suspension de *P. brassicacearum* NFM421, *E. radicincitans* NO9 et de *R. alarii* YAS34. L'autre modalité (notée « NI ») est un témoin dans lequel l'inoculum a été remplacé par de l'eau distillée. Cet inoculum mixte a été préparé avant inoculation des plants, de sorte que chacune des souches bactériennes le composant soit ajustée à 10^8 cfu.mL⁻¹. Afin de nous placer dans les conditions d'inoculation les plus proches possibles de celles qui pourraient être utilisées en conditions réelles de culture, nous avons choisi d'utiliser des souches bactériennes sauvages non marquées.

Le plan de l'expérience conserve une structure en bloc en raison du fort effet mis en évidence dans les expériences précédentes. Les 8 blocs se composent chacun de 4 témoins négatifs et de 4 modalités inoculées disposés aléatoirement selon un plan de randomisation imposé par la macro-instruction Excel précédemment utilisée (Figure 3.33).

1	2	3	4	17	18	19	20	33	34	35	36	49	50	51	52	Inoc
5	6	7	8	21	22	23	24	37	38	39	40	53	54	55	56	Ninoc
9	10	11	12	25	26	27	28	41	42	43	44	57	58	59	60	
13	14	15	16	29	30	31	32	45	46	47	48	61	62	63	64	

Figure 3.33 : Plan de répartition des modalités testées au sein des 8 blocs et organisation dans l'enceinte de culture. Modalités jaunes : inoculées par une suspension des souches NFM421, NO9 et YAS34 à 10^8 cfu.mL⁻¹ chacun. Modalités grisées : témoins non inoculés.

De même que pour les essais précédents, une veille quotidienne a été exercée afin de contrôler l'arrosage, de réaliser l'éclaircissement des semis et de supprimer les plantules adventives. La structure chronologique de cet essai est présentée sur la figure 3.34.

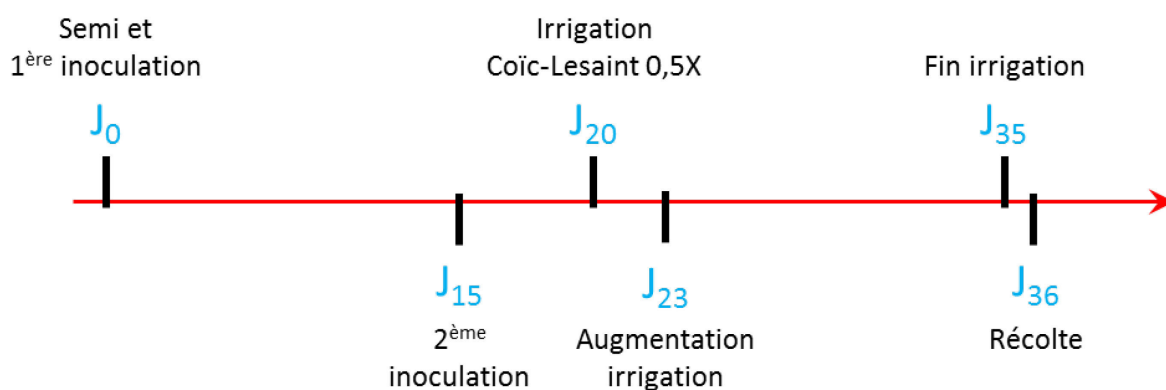


Figure 3.34 : Chronologie de l'essai graduée en jours depuis la première inoculation (J₀).

L'éclaircissement a pris fin au 15^{ème} jour de culture, au matin de la deuxième inoculation.

A l'issue de l'essai, quatre pots (pots n°1, 9, 29 et 41) ont été maintenus sans plantule, deux pour chaque modalité. Une partie du sol de ces modalités sera ultérieurement utilisée en qualité de sol nu, inoculé et non inoculé. Ils seront considérés comme témoins de référence lors de l'analyse du microbiote des différentes fractions par metabarcoding du gène ADNr 16S. De la même façon, les racines et le sol des pots n°23, 30, 42, 48, 49 et 60 ont été retenus pour être utilisés pour le suivi de l'inoculum en qualité d'échantillon de sol adhérent, de rhizoplan et de sol non rhizosphérique. Ces observations sont résumées dans la figure 3.35.

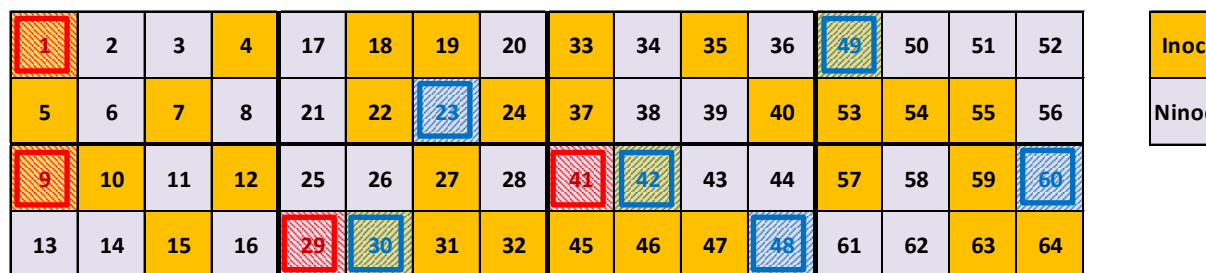


Figure 3.35 : Plan de répartition des modalités testées par pyroséquençage au sein des blocs et organisation géographique dans l'enceinte de culture. Les modalités encadrées de rouge ont été maintenues sans plantule pour établir le profil microbiologique d'un sol nu, celles en bleu pour les profils « sol adhérent », « rhizoplan » et « sol non rhizosphérique ».

Mesure de la puissance de l'essai

Ces échantillons étant réservés pour des analyses complémentaires, les effectifs finaux de cet essai ont donc été modifiés et légèrement diminués différemment selon le paramètre mesuré. L'inventaire de ces effectifs est donné dans le tableau 3.19.

Tableau 3.19 : Effectifs maximaux par paramètre agronomique d'intérêt mesuré, une fois exclus les échantillons réservés à l'expérimentation visant à déterminer le profil microbiologique des échantillons par pyroséquençage.

Paramètre agronomique mesuré	Effectif maximal par modalité
Masse partie aérienne (PA)	30 plantules
Masse partie racinaire (PR)	27 plantules
Ratio de masse PR / PA	27 plantules
Ratio de masse SA / PR	27 plantules
Humidité du sol	29 et 30 échantillons (donnée manquante pour n°32)

Comme pour les autres essais, la puissance de discrimination de notre dispositif a été estimée selon la méthode de Philippeau (1984).

Nous nous sommes fixés comme objectif de pouvoir trancher sur les résultats avec un risque de première espèce « α » (risque de conclure à une différence qui n'existe pas) compris entre 5 et 10 %, un risque de deuxième espèce « β » (risque de ne pas détecter une différence qui existe) fixé à 10 % et une différence entre traitements « Δ » (différence vraie) d'environ 30 %.

La puissance de l'essai a été calculée selon la méthode précédemment décrite (M&M 6) à partir des données résumées dans le tableau 3.20.

Tableau 3.20 : Calcul du coefficient de variation des données de l'essai par paramètre agronomique d'intérêt mesuré. (écart-type « s », moyenne « \bar{x} », coefficient de variation « CV »).

		\bar{x}	s	CV %
Paramètre mesuré	Masse PA (mg)	98,93	30,20	30,52
	Masse PR (mg)	41,69	22,05	52,89
	Ratio de masse PR/PA	0,40	0,13	31,59
	Ratio de masse SA/PR	91,17	27,76	30,44
	Humidité (%)	10,58	1,58	14,90

En reportant les valeurs de CV calculées dans le tableau 3.20 sur les abaques présentés précédemment, nous pouvons estimer le nombre minimal de répétitions permettant de mettre en évidence un résultat significatif, s'il existe, dans les conditions que nous nous sommes fixées (Tableau 3.21).

Tableau 3.21 : Détermination de l'effectif minimal significatif calculé en tenant compte des coefficients de variation de l'essai pour un α de 5 et 10 %, un β fixé à 10 % et un Δ allant de 10 à 30 %. Les signes « - » désignent un effectif supérieur à 40 qui dépasse le pouvoir de prédiction de l'abaque.

β fixé à 10 %		Δ % Δ %/CV % Rép. Min.			Δ % Δ %/CV % Rép. Min.			Δ % Δ %/CV % Rép. Min.		
$\alpha = 5$ %	Masse PA	10	0,33	-	20	0,66	-	30	0,98	23
	Masse PR	10	0,19	-	20	0,38	-	30	0,57	-
	Ratio de masse PR/PA	10	0,32	-	20	0,63	-	30	0,95	25
	Ratio de masse SA/PR	10	0,33	-	20	0,66	-	30	0,99	23
	Humidité	10	0,67	-	20	1,34	15	30	2,01	8
$\alpha = 10$ %	Masse PA	10	0,33	-	20	0,66	40	30	0,98	18
	Masse PR	10	0,19	-	20	0,38	-	30	0,57	-
	Ratio de masse PR/PA	10	0,32	-	20	0,63	-	30	0,95	21
	Ratio de masse SA/PR	10	0,33	-	20	0,66	40	30	0,99	19
	Humidité	10	0,67	40	20	1,34	11	30	2,01	6

Ces chiffres mettent en évidence que, pour pouvoir trancher sur les données de cet essai et, compte tenu de nos effectifs se situant entre 27 et 30 par traitement (Tableau 3.19), nous pourrions conclure sur les résultats de « masse de la partie aérienne », les rapports « masse partie racinaire sur masse partie aérienne » et « masse sol adhérent sur masse partie racinaire » avec les paramètres suivants : $\alpha = 5$ %, $\beta = 10$ % et $\Delta = 30$ % (effectif maximum requis : 25).

Il semble qu'à ce stade, la puissance de notre essai est suffisante pour tous les paramètres mesurés à l'exception des masses racinaires. Il s'agit là d'un résultat décevant car, en confrontant ces résultats à ceux obtenus lors des précédents essais, on constate une diminution de la puissance de cet essai pour le paramètre « masse racinaire » (Tableau 3.22).

Tableau 3.22 : Détermination de l'effectif minimal significatif calculé pour chacun des 4 essais en tenant compte des coefficients de variation de l'essai pour un α de 5%, un β fixé à 10 % et un Δ de 30%. Les signes « - » désignent un effectif supérieur à 40 qui dépasse le pouvoir de prédiction de l'abaque.

β fixe = 10 %		$\Delta = 30 \%$			
		Série 1	Série 2	Série 3	Essai final
$\alpha = 5 \%$	Masse PA	24	37	15	23
	Masse PR	30	-	28	-
	Ratio de masse PR/PA	17	-	17	25
	Ratio de masse SA/PR	-	-	36	23
	Humidité	22	6	6	8

Résultats

Les données obtenues pour les paramètres « masse PA », « masse PR », « ratio PR/PA », « ratio SA/PR » et « humidité massique du sol » ont été comparées au moyen du logiciel de traitement statistique des données « Statgraphics® Centurion XVI » (Statpoint Technologies, Inc, USA, 2009) par un test ANOVA à deux voies intégrant le facteur « modalité d'inoculation » et le facteur « bloc » comme composantes principales de la variation observée. Ce test, réputé « robuste », permet de traiter des données ne suivant pas exactement une Loi Normale. En revanche, la normalité de la distribution des résidus formés par le test a été vérifiée chaque fois pour garantir la validité des résultats présentés.

Les données ont été représentées sous forme de boîte à moustaches selon le facteur « inoculation » et « bloc » suivi des groupes statistiquement homogènes formés par le test ANOVA.

Etude de l'humidité massique du sol

Ce paramètre est difficile à appréhender en raison des nombreux facteurs externes pouvant l'influencer.

Il est tout d'abord fortement influencé par la qualité du dispositif expérimental : l'homogénéité de l'arrosage et des conditions de ventilation au niveau de l'enceinte de culture peuvent fortement impacter l'humidité des cultures. Nous supposons que cet effet est constant dans le temps et nous avons tenté de nous en affranchir en structurant l'essai en 8 blocs répartis dans les deux axes du plan. En outre, ce paramètre peut être influencé aussi par l'expérimentation. Le dépouillement de l'essai représente environ 8 heures de travail au cours desquelles l'humidité peut varier (décroître), et ce, en dépit de toutes les précautions prises. Afin de limiter les variations, chaque bloc a été traité dans son intégralité, les autres blocs étant conservés hermétiquement à basse température pour limiter l'évaporation.

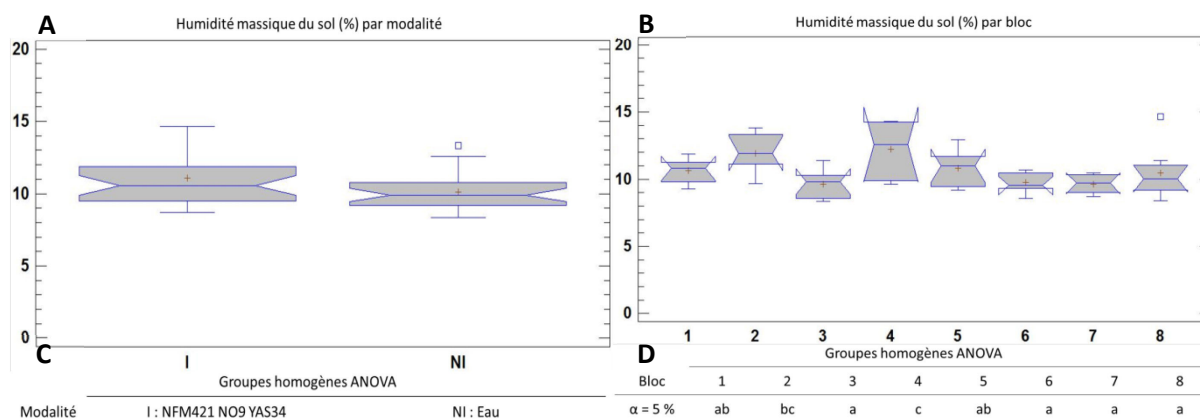


Figure 3.36 : Représentation graphique de l'humidité massique du sol. **A :** évolution de l'humidité en % en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. **B :** évolution de l'humidité en % en fonction du bloc. Les encoches sur les boîtes à moustaches désignent l'intervalle de confiance. **C et D :** groupes homogènes formés par le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5 \%$.

L'inoculation par les trois souches NFM421/NO9/YAS34 augmente de façon significative ($\alpha = 5 \%$) l'humidité du sol dans lequel le colza a été cultivé pendant 36 jours. L'humidité moyenne mesurée dans le témoin est de 10 %, celle mesurée dans la modalité inoculée 11%(Figure 3.36).

Etude de la partie aérienne (masse PA)

L'analyse statistique des résultats montre que la triple inoculation n'a aucun effet significatif sur la masse de la partie aérienne après 36 jours de culture (Figure 3.37). En revanche, il est à souligner que les améliorations apportées au protocole de l'essai semblent avoir porté leurs fruits, non pas sur le coefficient de variation, mais sur l'effet bloc qui disparaît pour ce paramètre précis en dépit des blocs 4 et 8 présentant un fort coefficient de variation. L'essai semble donc plus homogène du point de vue des conditions de cultures pour ce paramètre. Afin de vérifier que l'effet relevé pour les blocs 4 et 8 n'impacte pas les résultats, une analyse de l'effet bloc a été réalisée en Annexe 7. Aucun effet reproductible n'a pu être mis en évidence.

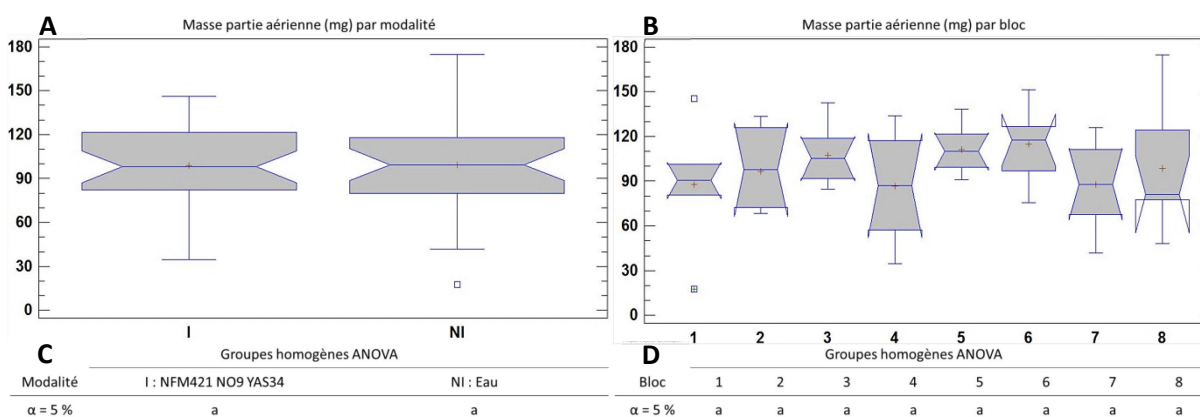


Figure 3.37 : Représentation graphique des masses des parties aériennes. **A :** évolution de la masse en milligrammes de la partie aérienne des plantules en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. **B :** évolution de la masse de

la partie aérienne des plantules en fonction du bloc (mg) ; **C** et **D** : groupes homogènes formés par le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5 \%$.

Etude de la masse de la partie racinaire (masse PR)

L'analyse statistique des résultats montre que la triple inoculation n'a aucun effet significatif sur la masse de racines après 36 jours de culture (Figure 3.38).

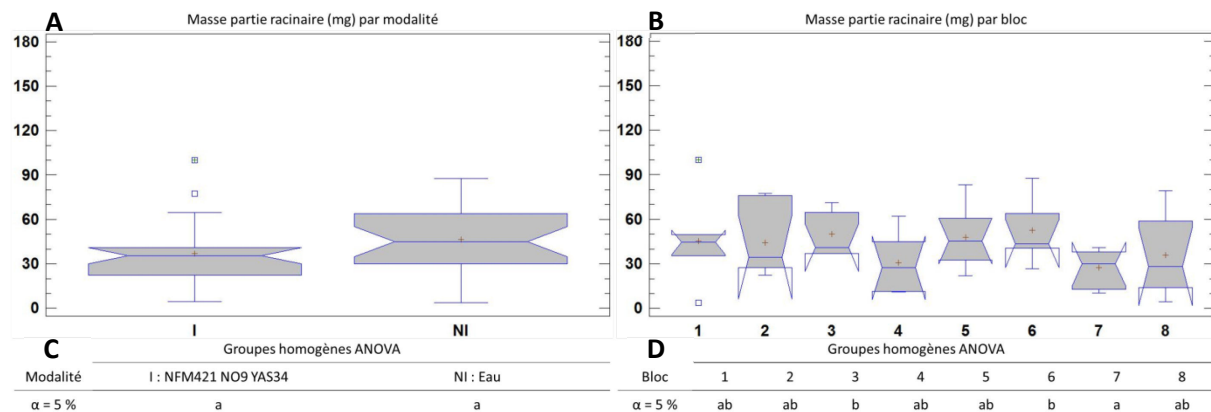


Figure 3.38 : Représentation graphique des masses des parties racinaires. **A** : évolution de la masse en milligrammes de la partie racinaire des plantules en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. **B** : évolution de la masse des racines des plantules en fonction du bloc (mg). **C** et **D** : groupes homogènes formés par le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5 \%$.

Etude du rapport de la masse de la partie racinaire sur la masse de la partie aérienne (ratio de masse PR/PA)

Le test ANOVA réalisé sur ce jeu de données met en évidence deux groupes homogènes significativement différents pour un risque de première espèce fixé à 5 %. L'inoculation diminue le rapport « masse partie racinaire sur la masse de la partie aérienne » de 16,7 % (Figure 3.39). Ce résultat mis en regard du précédent concernant l'effet de la triple inoculation sur la baisse non significative de la « masse racinaire » permet de conclure que cet effet sur le ratio « masse racinaire/masse partie aérienne » s'explique essentiellement par une plus faible croissance racinaire en présence de l'inoculum.

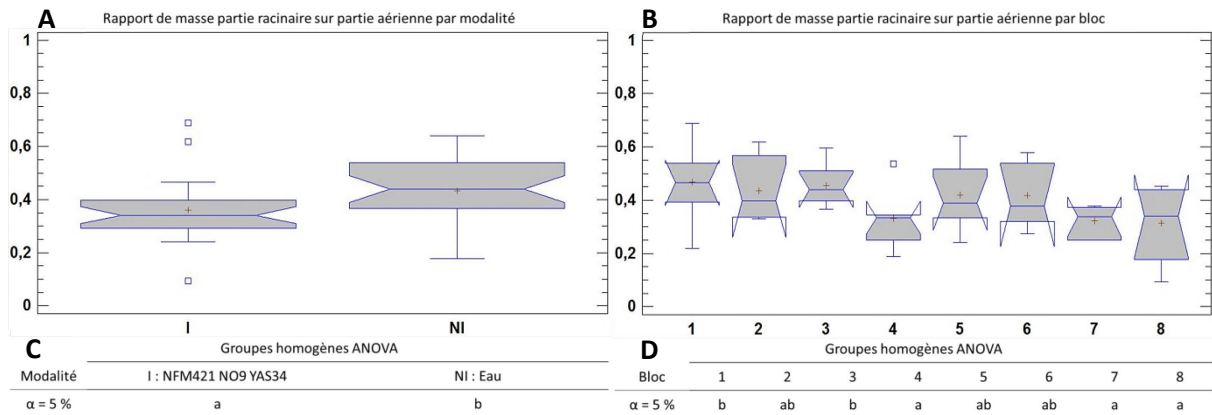


Figure 3.39 : Représentation graphique du rapport de masse des parties racinaires sur aériennes. **A :** évolution du rapport de la masse racinaire sur la masse de la partie aérienne en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. **B :** évolution du ratio « masse racinaire sur masse aérienne » en fonction du bloc (mg). **C** et **D :** groupes homogènes formés pas le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.

Etude sur rapport de la masse de sol adhérent sur la masse racinaire (masse SA/PR)

Même si nous pouvons noter une légère augmentation du « ratio de sol adhérent/masse de racines » après inoculation avec le mélange des trois souches avec une moyenne de 94 pour la condition inoculée contre 88 pour le témoin, la différence observée n'est pas significative ni au seuil $\alpha = 5\%$ ni $\alpha = 10\%$ (Figure 3.40).

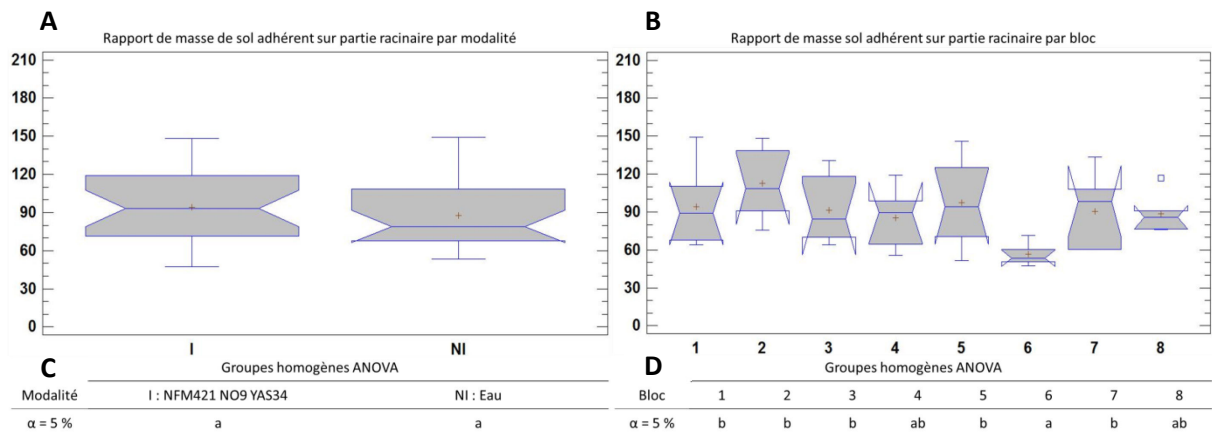


Figure 3.40 : Représentation graphique du rapport de la masse de sol adhérent sur la masse de la partie racinaire. **A :** évolution du rapport de la « masse de sol adhérent sur la masse de la partie racinaire » en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. **B :** évolution de la masse de sol adhérent sur la masse de la partie racinaire en fonction du bloc. **C** et **D :** groupes homogènes formés pas le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.

Dosage du phosphore et du soufre dans les échantillons par ICPAES

Matériels et méthodes

Dissolution des échantillons

Les échantillons ont été traités de la façon décrite précédemment dans le M&M 7. Les dosages ont ensuite été réalisés par Pierre Richaud (LB3M, BIAM, CEA Cadarache).

Mesure de la teneur par ICP-AES

Les valeurs obtenues ont ensuite été converties en concentration finale en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ selon la méthode présentée dans le M&M 7.

Mesure de la puissance de l'essai

La mesure de la puissance de l'essai a été effectuée par la méthode présentée dans le M&M 6 avec les données synthétisées dans le M&M 7.

De la même façon que précédemment, le calcul de la puissance de l'essai est un préalable au traitement des données relevées. Les effectifs sont de 30 échantillons pour les parties aériennes et de 27 échantillons pour les parties racinaires (tableau 3.23).

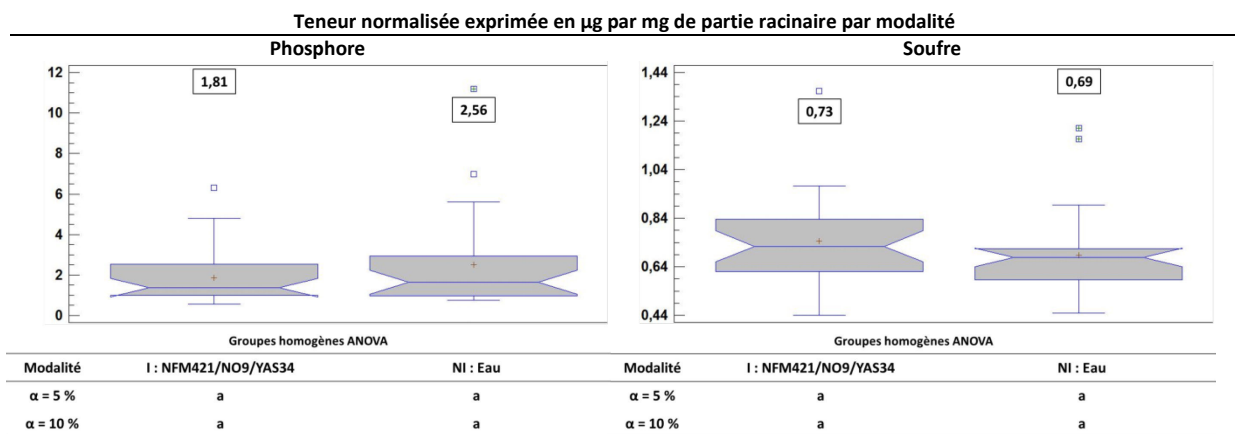
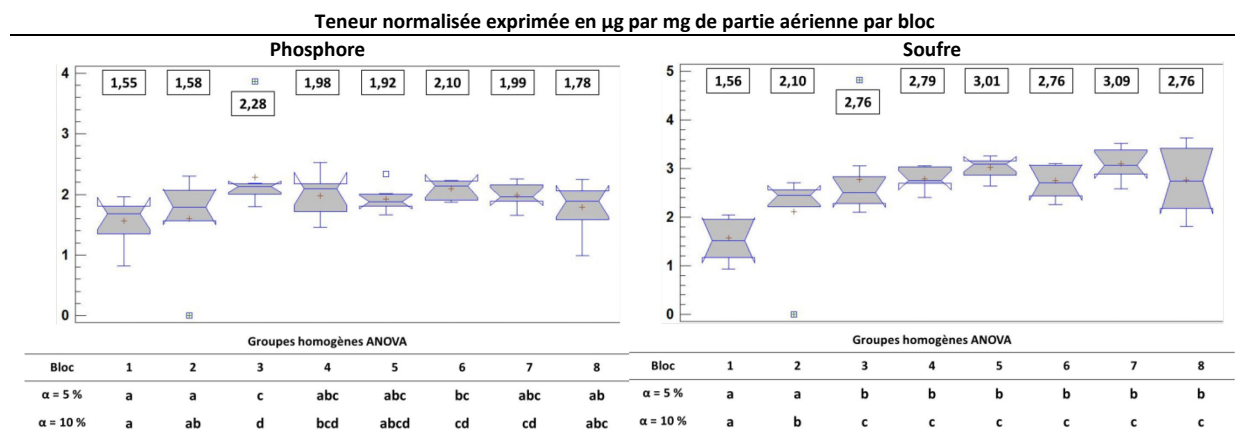
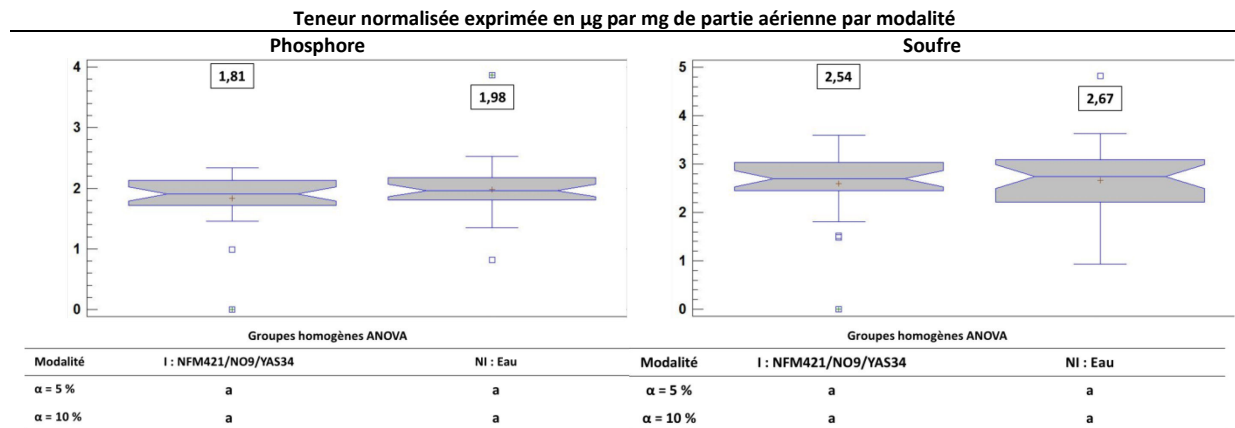
Tableau 3.23 : Détermination de l'effectif minimal significatif calculé en tenant compte des coefficients de variation de l'essai pour un α de 5%, un β fixé à 10% et un Δ à 30%. Les signes « - » désignent un effectif supérieur à 40 qui dépasse le pouvoir de prédiction de l'abaque.

	β fixé à 10 %	\bar{x}	s	CV %	Δ %	Δ %/CV %	Rép. min
Partie aérienne - $\alpha = 5$ %	Aluminium (Al)	0,1267	0,2023	159,7	30	0,19	-
	Bore (B)	0,0120	0,0107	89,5	30	0,34	-
	Calcium (Ca)	14,8218	4,1991	28,3	30	1,06	22
	Cadmium (Cd)	0,0005	0,0010	192,1	30	0,16	-
	Cuivre (Cu)	0,0032	0,0042	130,4	30	0,23	-
	Fer (Fe)	0,1448	0,2119	146,4	30	0,20	-
	Potassium (K)	28,4550	13,6865	48,1	30	0,62	-
	Magnésium (Mg)	3,2706	0,6204	19,0	30	1,58	11
	Manganèse (Mn)	0,0642	0,0182	28,3	30	1,06	21
	Sodium (Na)	3,3365	1,5534	46,6	30	0,64	-
	Phosphore (P)	1,9089	0,4680	24,5	30	1,22	17
Soufre (S)	2,6307	0,7169	27,3	30	1,10	20	
Zinc (Zn)	0,0342	0,0095	27,7	30	1,08	21	
Partie racinaire - $\alpha = 5$ %	Aluminium (Al)	1,7662	0,8794	49,8	30	0,60	-
	Calcium (Ca)	73,0301	21,9947	30,1	30	1,00	23
	Cuivre (Cu)	0,0050	0,0069	136,5	30	0,22	-
	Fer (Fe)	2,0381	1,1353	55,7	30	0,54	-
	Magnésium (Mg)	1,2971	0,7943	61,2	30	0,49	-
	Manganèse (Mn)	0,0774	0,0384	49,6	30	0,61	-
	Sodium (Na)	8,9626	10,6715	119,1	30	0,25	-
	Phosphore (P)	2,1889	1,9003	86,8	30	0,35	-
Soufre (S)	0,7158	0,1855	25,9	30	1,16	18	
Zinc (Zn)	0,0111	0,0072	64,4	30	0,47	-	

Résultats

De même que précédemment, nous ne présentons que les données mesurées pour le phosphore et le soufre. Le calcul de la puissance de l'essai nous indique qu'il sera possible de conclure sur les dosages du phosphore et du soufre dans les parties aériennes, mais seulement pour celui du soufre pour les parties racinaires (tableau 3.23).

Les teneurs mesurées exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ sont présentées dans la figure 3.41 sous forme de boîtes à moustaches. La valeur de la moyenne a été inscrite dans le cadre au-dessus de la boîte à moustache correspondante.



Teneur normalisée exprimée en μg par mg de partie racinaire par bloc

Phosphore
Soufre

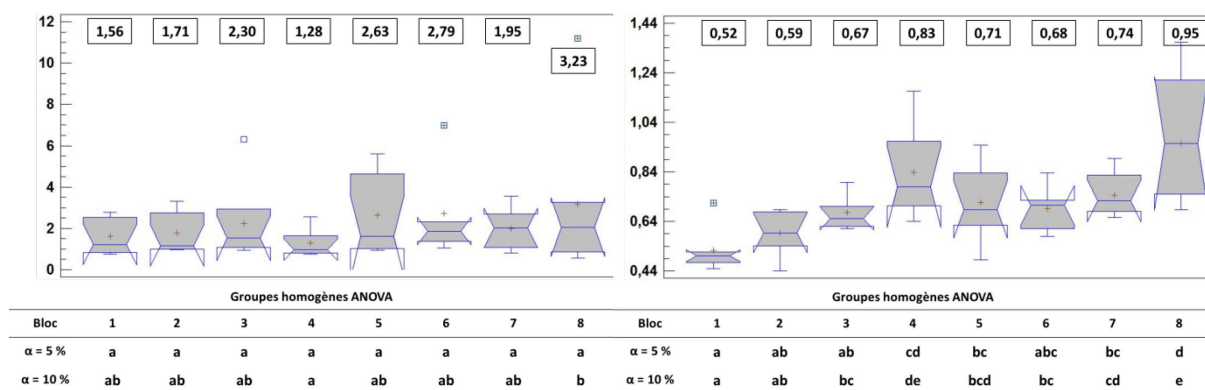


Figure 3.41 : Teneurs en phosphore et en soufre mesurées par modalité dans les parties aériennes et racinaires des échantillons. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.

Il apparaît que l'inoculation, bien que présente au sein du rhizoplan, n'a pas eu d'influence sur la teneur en phosphore et en soufre au sein des tissus étudiés (Figure 3.41).

Dans l'expérience précédente, la modalité triple inoculation (NFM421/NO9/YAS34) augmentait significativement la teneur en soufre des racines pour la série 3 à un seuil $\alpha = 10\%$. Dans cet essai, la puissance est suffisante pour conclure mais aucun effet significatif n'a pu être mesuré.

3.2.2 Suivi de l'inoculum par métabarcoding du gène ADNr 16S

Hypothèse de travail

L'échantillonnage prévu pour cette expérience a été réalisé parmi les échantillons collectés lors de l'essai final. Dans l'optique de proposer un produit compatible avec une utilisation commerciale, cet essai a été réalisé avec des souches sauvages non marquées.

Afin de suivre l'évolution de l'inoculum (mélange de trois souches) au sein de la rhizosphère et son impact sur les populations endémiques, les échantillons ont été analysés par pyroséquençage de l'ADNr 16S (métabarcoding de l'ADNr 16S).

L'analyse de la séquence de l'ADNr 16S bactérien permet d'identifier une souche au niveau de l'espèce ou du genre en fonction des espèces bactériennes. Le fait de le séquencer permet de décrire en profondeur la diversité du microbiote d'un échantillon (au-delà des cultivables).

Pour cela, quatre compartiments ont été définis. Le premier « sol non rhizosphérique » se compose de sol prélevé dans les pots une fois la plantule et son sol adhérent retirés. Le deuxième compartiment dit « racinaire » est formé à partir du broyat des racines débarrassées de leur sol adhérent. Le troisième compartiment « sol adhérent aux racines » représente la fraction de sol retenu par les racines et récolté par lavage de celles-ci. Enfin le quatrième compartiment « sol nu » est obtenu à partir de pots maintenus sans aucune plantule mais traités et entretenus exactement de la même façon que les autres pots (Figure 3.42)

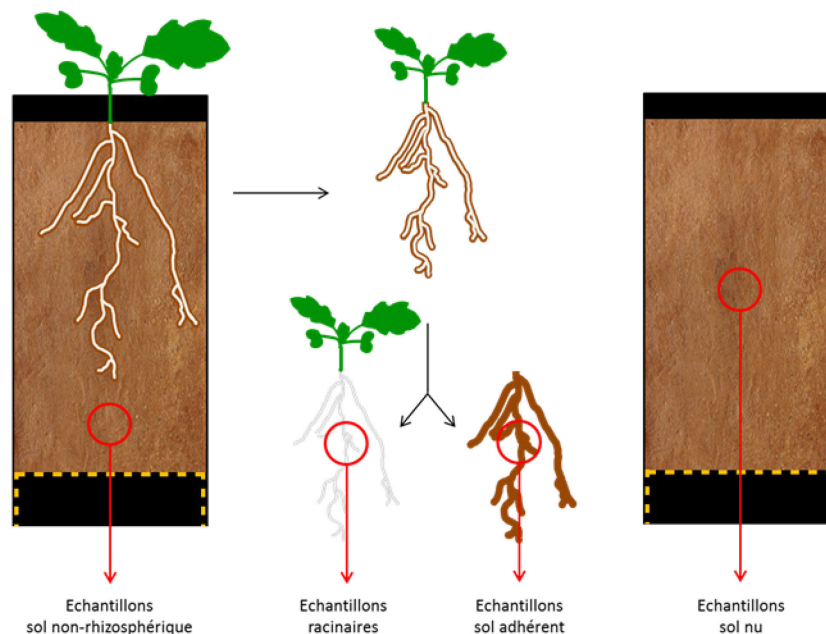


Figure 3.42 : Schéma récapitulant le mode d'obtention des échantillons des 4 compartiments analysés par metabarcoding du 16S (ou pyroséquençage).

Les trois souches composant l'inoculum bactérien appartiennent au phylum de protéobactéries et aux classes des alpha et gammaprotéobactéries (Tableau 3.24).

Tableau 3.24 : Taxonomie résumée des souches candidates de l'étude

	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<i>Enterobacter radicincitans</i>	<i>Rhizobium alamii</i>
Super règne	<i>Bacteria</i>		
Phylum	<i>Proteobacteria</i>		
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>		<i>Alphaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonales</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Rhizobiales</i>
Famille	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Rhizobium</i>

Selon la profondeur d'analyse des résultats du pyroséquençage, on peut structurer les résultats depuis le phylum jusqu'à l'espèce dans certains cas. Dans les analyses de données de metabarcoding du 16S, on utilise le terme d'OTU (Operational Taxonomic Unit) plutôt qu'espèce. En accord avec la littérature, nous avons défini nos OTUs avec un seuil de 97% d'homologie. Cela signifie que les séquences d'ADNr 16S regroupées dans un OTU ont au moins 97% d'homologie entre elles.

La représentation graphique suivante permet de suivre l'évolution des proportions des différentes classes de protéobactéries au sein des compartiments étudiés.

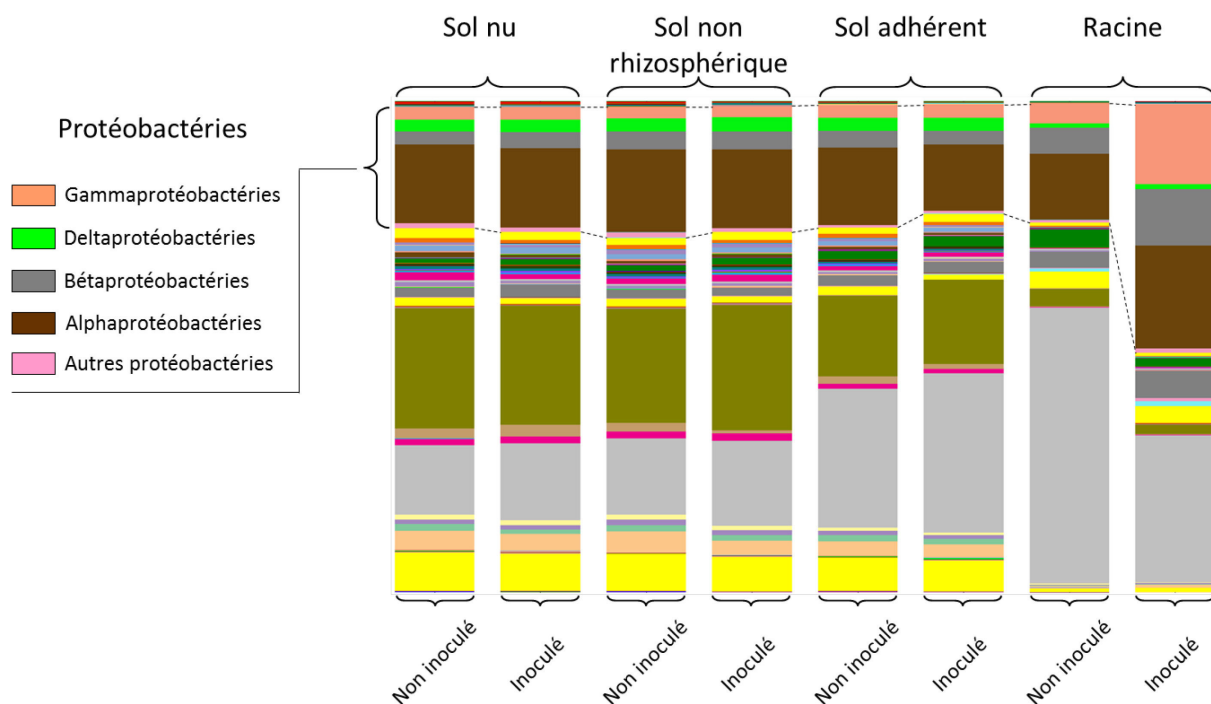


Figure 3.43 : Représentation schématique de la diversité du microbiote des échantillons prélevés avec ou sans inoculation par les souches NFM421, NO9 et YAS34. Chaque couleur représente une classe bactérienne distincte, l’aire de la couleur est fonction de son abondance au sein de l’échantillon. Détail des données en Annexe 8.

Ces résultats suggèrent que la présence de l’inoculum (mélange des 3 souches) semble peu affecter la structure microbienne des compartiments « sol nu », « sol non-rhizosphérique » et « sol adhérent ». En revanche, la diversité du microbiote en interaction étroite avec les racines semble répondre à la présence de l’inoculum. Les proportions des OTUs appartenant aux classes des alpha-, bêta- et gammaprotéobactéries semblent augmentées dans les traitements ayant été inoculés (Figure 3.43). L’ensemble des OTUs appartenant aux trois genres ciblés (*Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Rhizobium*) ont été regroupés pour en évaluer la fréquence.

Tableau 3.25 : Variation des proportions des OTUs appartenant aux genres auxquels appartiennent les souches inoculées, selon le compartiment et la condition d’inoculation (mélange des souches NFM421, NO9 et YAS34).

	Nombre total de séquences et proportion globale	Proportions par compartiment							
		Sol nu		Sol non rhizosphérique		Sol adhérent		Racine	
		NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
<i>Pseudomonas sp.</i>	176 – 0,2 %	0,0 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,2 %	1,1 %
<i>Enterobacter sp.</i>	21 – 0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %	0,0 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %
<i>Rhizobium sp.</i>	92 – 0,1 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %	0,2 %	0,4 %

La proportion des genres auxquels appartiennent les souches de l’inoculum est augmentée par cet inoculum au niveau des racines et pour les genres *Pseudomonas* (1,1 vs. 0,2 %) et *Rhizobium* (0,4 vs. 0,2 %) (Tableau 3.25). Il apparaît donc que l’inoculation n’a pas eu d’impact au-delà du système racinaire. Cette observation est confirmée par la recherche des séquences d’ADNr 16S des souches candidates dans chaque compartiment.

Si l'inoculum n'a pas eu d'impact sur la rhizosphère (sol adhérent aux racines) et au delà, il apparaît clairement que les souches *P. brassicacearum* NFM421 et *R. alamii* YAS34 ont colonisé les racines de colza (Tableau 3.26) et représentent jusqu'à 1 % du microbiote présent sur le rhizoplan dans le cas des *Pseudomonas* (Tableau 3.25). L'augmentation des proportions des classes des alpha, beta et gammaprotéobactéries (Figure 3.43) pourrait être associée à la présence, même de façon transitoire, de l'inoculum.

Tableau 3.26 : Nombre de séquences d'ADNr 16S identifiées par pyroséquençage par échantillon et par compartiment. Les signes « - » correspondent à une absence de séquence au sein de l'échantillon.

Séquences	Sol nu						Sol adhérent					
	Inoculé			Non inoculé			Inoculé			Non inoculé		
	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Ech. 4	Ech. 5	Ech. 6	Ech. 7	Ech. 8	Ech. 9	Ech. 10	Ech. 11	Ech. 12
Total	4741	3770	3628	3902	4091	3988	5032	4485	4870	6534	4808	5669
<i>P.brassicacearum</i>	-	1	8	-	-	-	-	-	3	-	1	-
<i>E.radicincitans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R.alamii</i>	-	1	5	2	8	5	5	4	7	2	8	9

Séquences	Racine						Sol non-rhizosphérique					
	Inoculé			Non inoculé			Inoculé			Non inoculé		
	Ech. 13	Ech. 14	Ech. 15	Ech. 16	Ech. 17	Ech. 18	Ech. 19	Ech. 20	Ech. 21	Ech. 22	Ech. 23	Ech. 24
Total	6915	2980	2778	3357	2421	2721	4249	4027	4432	3219	4192	4723
<i>P.brassicacearum</i>	66	1	50	-	7	6	-	-	2	-	-	-
<i>E.radicincitans</i>	-	-	1	-	2	4	5	3	-	-	-	-
<i>R.alamii</i>	90	35	39	3	14	17	3	-	6	4	6	2

Une analyse plus fine des données de pyroséquençage pourrait permettre d'identifier d'éventuelles synergies ou antagonismes entre l'inoculum et le microbiote du sol. De manière générale, les écarts constatés, lorsqu'ils existent, sont au minimum de 0,1 %. Il s'agit donc là probablement de notre limite de détection. Nous avons donc choisi de ne présenter que les résultats présentant une variation d'abondance supérieure à 0,5%.

Selon le compartiment, la diversité du microbiote du sol varie. Les résultats ne démontrent pas d'effet d'antagonisme de façon générale à l'exception du compartiment racinaire. Ici, une espèce apparaît comme fortement impactée par la présence de l'inoculum (mélange de trois souches) : en son absence, les séquences correspondantes à l'espèce *Rhodococcus sp.* représentent 4,7 % des séquences détectées sur la racine, alors qu'en présence de l'inoculum, aucune séquence de cette espèce n'a pu être détectée. Ce résultat n'est observé que sur le rhizoplan, car la présence de *Rhodococcus sp.* ne dépasse pas le seuil de détection dans les autres compartiments (Tableau 3.27).

Tableau 3.27 : Pourcentage total de séquences appartenant à l'espèce *Rhodococcus sp.* selon le compartiment observé.

	Sol non inoculé	Sol inoculé
Sol nu	0,00%	0,10%
Sol non rhizosphérique	0,00%	0,00%
Sol adhérent	0,00%	0,00%
Rhizoplan	4,70%	0,00%

Ce résultat suggère que *Rhodococcus sp.* est exclusivement présent sur le rhizoplan du colza et que, directement ou indirectement, l'inoculum est responsable de sa quasi disparition (fréquence inférieure au seuil de détection).

Appartenant au genre des *Actinomycetales*, le genre *Rhodococcus* est majoritairement étudié au travers de *Rhodococcus equi*, un microorganisme pathogène pulmonaire du bétail et essentiellement du poulain (Vázquez-Boland *et al.*, 2013), et qui, dans de rares cas, semble pouvoir affecter l'Homme en causant une pneumonie (Herath *et al.*, 2013). Le genre *Rhodococcus* est aussi étudié en biotechnologie avec *Rhodococcus erythropolis* pour la richesse de son système enzymatique capable de métaboliser une grande variété de composés d'intérêts industriels (pharmaceutiques, chimiques, alimentaires etc.) (de Carvalho *et da Fonseca*, 2005). Au sein du règne végétal, l'organisme le plus décrit est *Rhodococcus fascians*. Il s'agit de la seule souche phytopathogène appartenant au genre *Rhodococcus* actuellement connue (Stes *et al.*, 2011). Elle peut causer des symptômes de galle principalement sur la pomme de terre (Stes *et al.*, 2013), mais aussi sur de nombreux hôtes (Goethals *et al.*, 2001) dont *A. thaliana* (Goethals *et al.*, 2001). Il n'existe aucune donnée sur le colza.

De façon générale, on assiste à des effets de synergie ou d'antagonisme relatifs. Les figures suivantes résument selon le compartiment les variations dans les proportions observées supérieures au seuil de 0,5%.

Une première lecture des phylums-genres témoigne des variations spécifiques de chaque compartiment étayant notre choix de compartimentation (Figures 3.44 à 3.47).

Le compartiment « sol nu » présente très peu de variations en réponse à l'inoculation. Elles sont essentiellement liées au phylum *Actinobacteria* qui présente une augmentation globale de 2 % de la part des *Actinomycetales* sans pouvoir dégager de genre précis.

De façon analogue, le sol non rhizosphérique présente lui aussi une augmentation de 2,7 % du phylum *Actinobacteria* qui semble provenir essentiellement de variations dans les populations appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* et des *Gaiellales*.

Le compartiment « sol adhérent » varie lui aussi avec une fréquence plus élevée du phylum *Actinobacteria* (+ 4 %) par l'augmentation de plus de 5 % des représentants de la famille des *Micrococcaceae*. En outre, la classe des *Alphaproteobacteria* est diminuée de 2 % liée à la diminution des *Rhizobiales* et ce, en dépit de l'inoculation contenant une souche de *Rhizobium*.

Enfin le compartiment le plus affecté par l'inoculation est le compartiment racinaire. On observe ici, à l'inverse de tous les autres compartiments, une baisse de près de 30 % des membres appartenant au phylum *Actinobacteria* (- 26 %) et majoritairement des familles des *Streptomyetaceae* (- 13 %) et des *Nocardiaceae* essentiellement du genre *Rhodococcus* (- 5 %). À l'inverse, on note une augmentation de presque autant (+ 26 %) du phylum *Proteobacteria*. La classe des *Alphaproteobacteria* augmente de 7,5 % et plus particulièrement l'ordre des *Rhizobiales* (+ 5 %), la classe des *Betaproteobacteria* augmente de 6 % et plus particulièrement l'ordre des *Burkholderiales* (+ 6 %) et enfin la classe des *Gammaproteobacteria* augmente de + 12 %) et plus particulièrement l'ordre des *Xanthomonadales* (+ 11 %) et plus précisément le genre *Stenotrophomonas* (+ 10 %). On observe une faible augmentation du phylum *Bacteroidetes* (+ 3 %) essentiellement liée au genre *Chitinophaga* (+ 3 %).

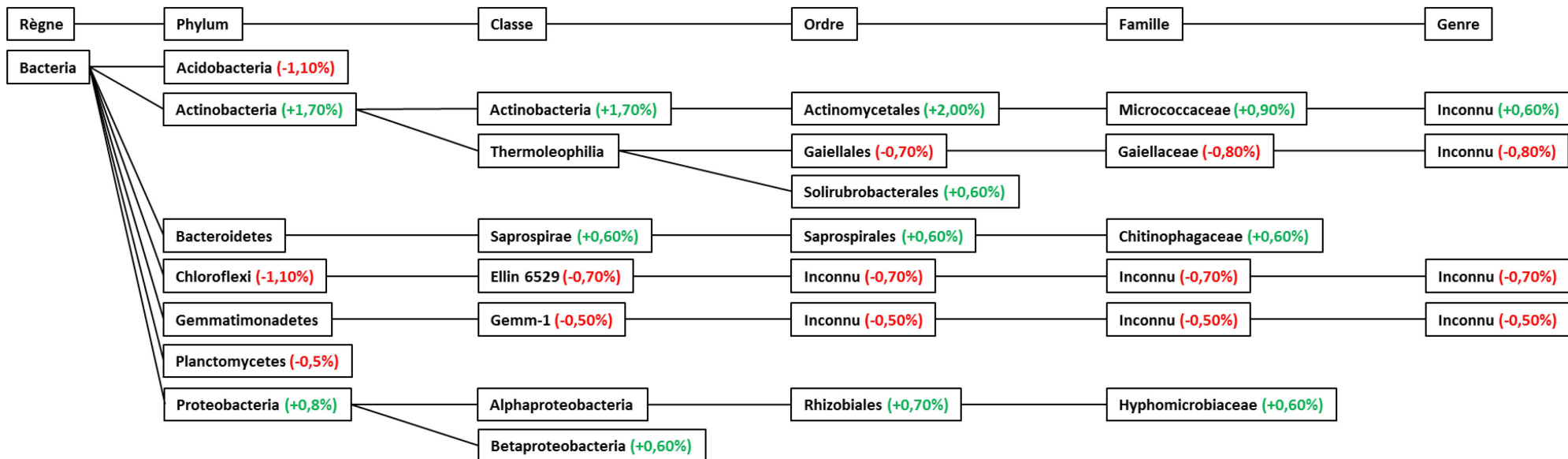


Figure 3.44 : Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment sol nu

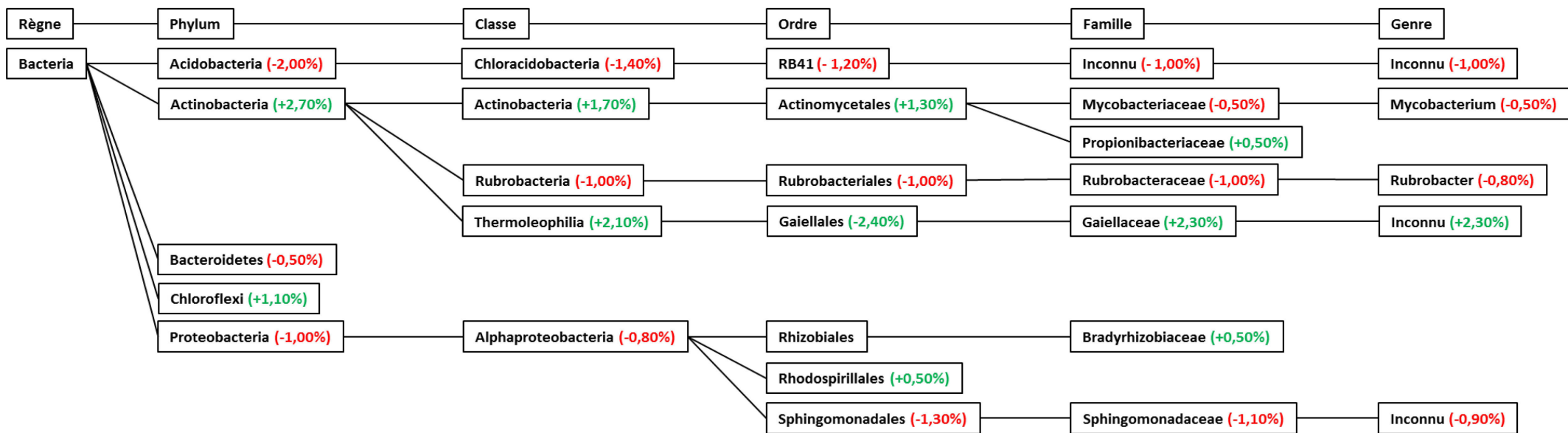


Figure 3.45 : Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment sol non rhizosphérique

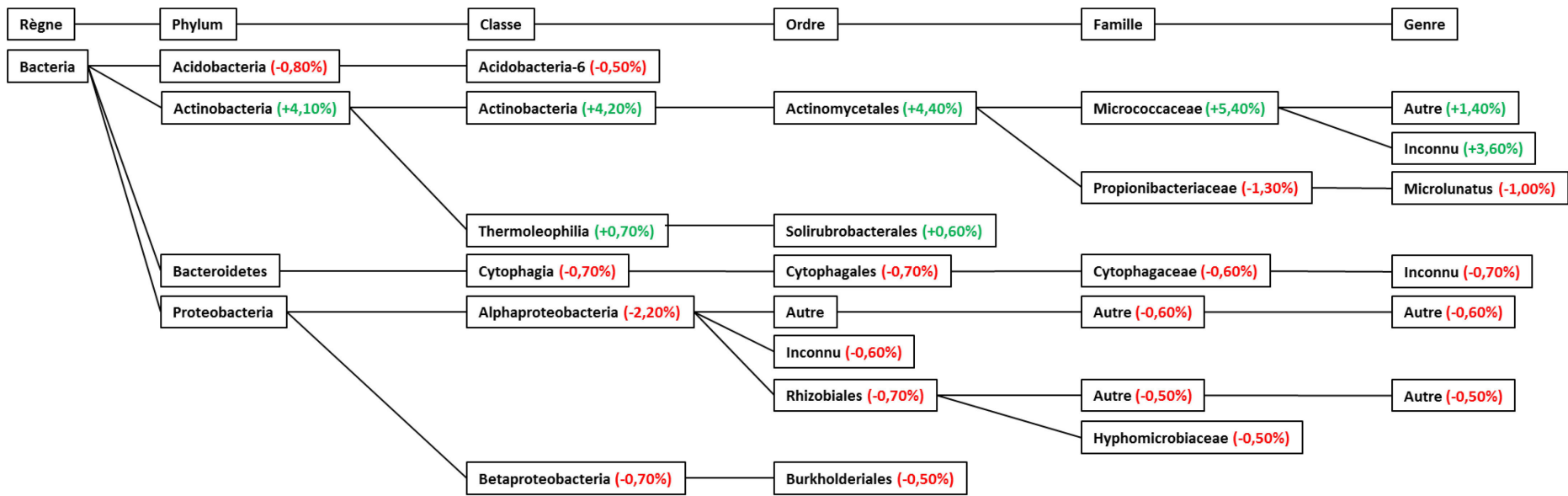


Figure 3.46 : Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment sol adhérent

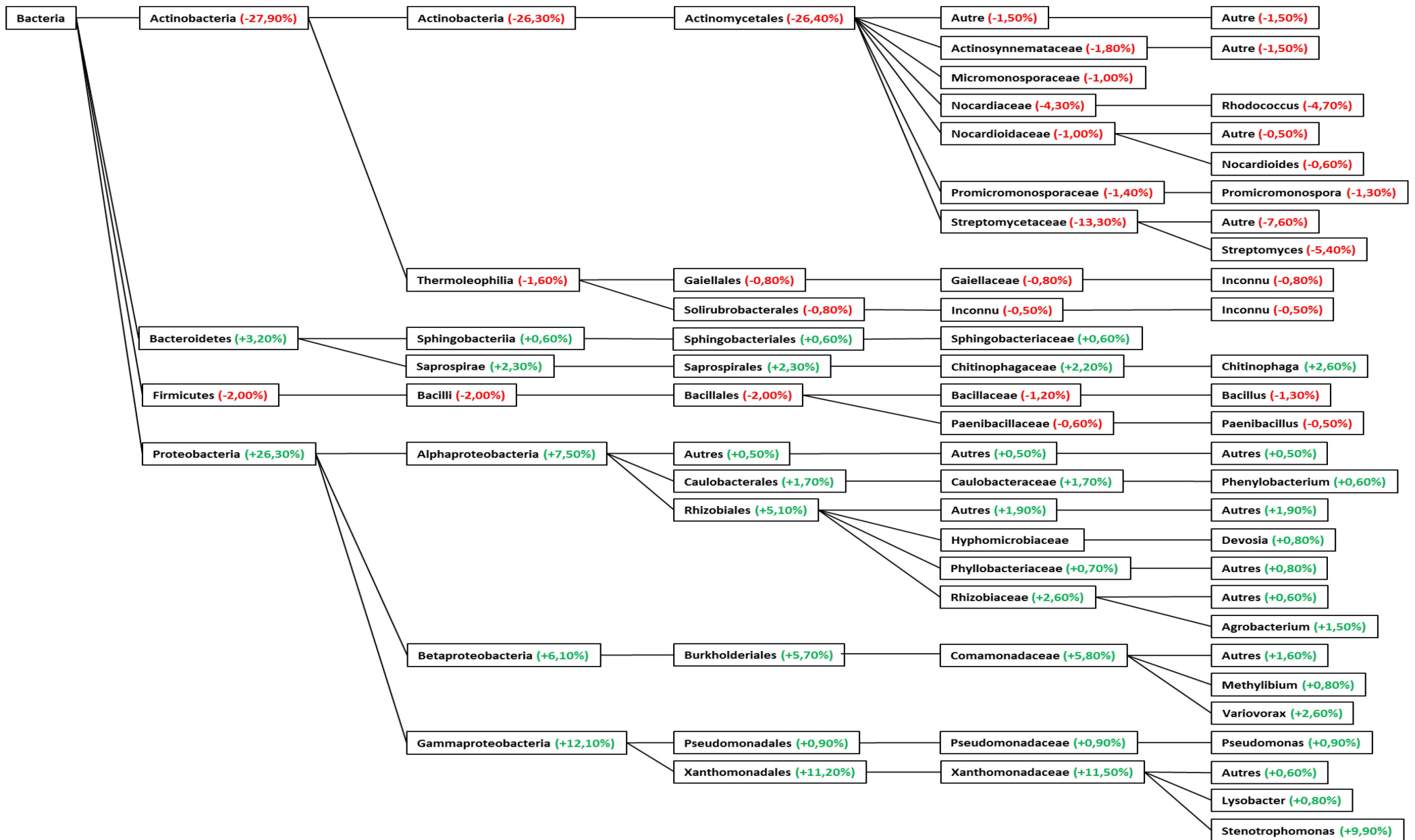


Figure 3.47 : Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment racinaire

En résumé :

Compartiment sol nu :

- Variations faibles, essentiellement liées à l'ordre des *Actinomycetales*.

Compartiment sol non-rhizosphérique :

- Variations essentiellement liées à l'ordre des *Actinomycetales* et des *Gaiellales*.

Compartiment sol adhérent :

- Augmentation de la famille des *Micrococcaceae* et faible diminution de l'ordre des *Rhizobiales*.

Compartiment racinaire :

- Disparition du genre *Rhodococcus*.
- Diminution importante de la famille des *Streptomycetaceae*.

Les membres de la famille des *Streptomycetaceae* et, plus particulièrement, les membres du genre *Streptomyces* ont longtemps été étudiés pour leur capacité à produire des antibiotiques (Watve *et al.*, 2001). Leur importance économique ne se limite pas à l'industrie pharmaceutique mais aussi au domaine agronomique. En effet, certains représentants du genre *Streptomyces*, notamment *Streptomyces scabies*, sont connus pour leur action pathogène causant la galle de la pomme de terre (Loria *et al.*, 2006). À l'inverse, des études récentes ont mis en évidence un pouvoir PGPR de ces souches (Franco-Correa *et al.*, 2010, Jog *et al.*, 2014).

- Augmentation des protéobactéries (*Rhizobiales* et *Burkholdérales* avec le genre *Variovorax*) différentes de celles apportées par l'inoculum.

Retrouvé fréquemment dans l'eau et les sols, le genre *Variovorax* a été nommé ainsi en raison de sa capacité à métaboliser de nombreux composés d'une grande variété chimique ou minérale (Satola *et al.*, 2013). Essentiellement décrit au travers de *Variovorax paradoxus* (séquencé en 2011 par Han *et al.*), son métabolisme fortement diversifié en fait un outil biotechnologique très intéressant (Brandt *et al.*, 2014). De récentes études menées en interaction avec les plantes ont pu mettre en évidence une activité endophyte PGPR essentiellement liée à sa capacité à dégrader l'éthylène (Chen *et al.*, 2013) sachant que *V. paradoxus* est également capable de produire des indoles analogues à l'auxine. En outre, *V. paradoxus* est capable de dégrader un grand nombre des molécules telles que les homosérine-lactones impliquées dans les mécanismes de « quorum-sensing » à l'origine de la pathogénicité d'un certain nombre de microorganismes (Leadbetter & Greenberg, 2000) ou encore certains polluants industriels du sol comme les acrylamides (Liu *et al.*, 2013) ou certains herbicides (Satsuma, 2010)

- Stimulation du genre *Stenotrophomonas* et, dans une moindre mesure, du genre *Chitinophaga*.

Le genre *Stenotrophomonas*, comportant 8 espèces, est majoritairement étudié au travers de *Stenotrophomonas maltophilia*. Cette espèce ubiquitaire, décrite comme étant capable de former

des biofilms sur les surfaces biotiques et abiotiques est multirésistante et se comporte en pathogène opportuniste pour l'homme, à l'origine de graves maladies nosocomiales (infections, pneumonies, endocardites...) d'importance croissante (Gherardi *et al.*, 2015). Des études menées au sein de la rhizosphère ont pu mettre en évidence la présence de certains représentants du genre *Stenotrophomonas* sur le rhizoplan, mais aussi des tissus de la plante dans le cadre d'interactions endophytiques. (Ryan *et al.*, 2009). Deux espèces principales ont été décrites : *Stenotrophomonas maltophilia* dont les mécanismes impliqués dans sa pathogénicité sur l'homme participent à son mode d'action PGPR, mais aussi *Stenotrophomonas rhizophila*, espèce isolée sur colza (Wolf *et al.*, 2002), qui se distingue de l'autre espèce par son apparente innocuité pour l'homme (Alavi *et al.*, 2013). Ces deux espèces partagent un grand nombre de traits phytobénéfiques répertoriés dans la revue de Ryan *et al.* (2009) :

- une aptitude à la colonisation des sols par leur mobilité (bactéries flagellées), une capacité d'adhésion aux racines (production de pili et de fimbriae), une capacité à pouvoir utiliser les sidérophores produits par d'autres microorganismes (ferrichrome), une capacité à fixer l'azote atmosphérique et une capacité à métaboliser des molécules polluantes des sols tels que les hydrocarbures, les composés phénoliques, benzéniques ou certains polluants minéraux (sélénium) ;
- des propriétés de biocontrôle d'agents pathogènes par la production de protéines de dégradation du type protéase, lipases, nucléases, chitinases, élastase, etc., potentiellement impliquées dans les phénomènes de biocontrôle de pathogènes microbiens comme *Magnaporthe poae*, la production de métabolites secondaires comme la maltophiline et la xanthobaccine impliquées dans le biocontrôle de certains champignons et oomycètes, la diffusion de composés organiques volatiles du type β -phényléthanol et dodécanal potentiellement impliqués dans le biocontrôle de *Rhizoctonia solani* (Kay *et al.*, 2007) ;
- un effet protecteur et stimulant sur les plantes par la production et la diffusion de tréhalose et de glucosylglycérol (actifs contre le stress osmotique) ayant prouvé leur efficacité sur la protection des plantes croissant dans des sols fortement concentrés en sel, par la production de phytohormones stimulatrice de la croissance des plantes du type acide indole 3-acétique et par leur capacité à solubiliser le phosphate minéralisé dans les sols le rendant ainsi disponible à l'absorption racinaire.

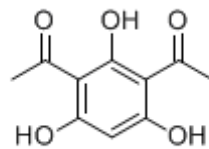
En conclusion, il apparaît que les souches *P. brassicacearum* NFM421 et *R. alarii* YAS34 ont colonisé le compartiment racinaire du colza (populations représentant environ 1 % du microbiote), ce qui n'est pas le cas de la souche *E. radicincitans* NO9. Cette colonisation a eu un effet sur le microbiote du compartiment racinaire. Le métabarconding de l'ADNr 16S ne permet pas de donner avec précision quelles sont les espèces qui ont été impactées par l'inoculation, mais il apparaît que certains genres potentiellement phytobénéfiques ont été stimulés (*Streptomyces*, *Variovorax*, *Stenotrophomonas*) et que le genre *Rhodococcus* a été contre-sélectionné par cette inoculation. Seule une étude réalisée sur un à plusieurs cycles de culture complet du colza pourrait permettre d'évaluer la résilience de ce phénomène (transitoire ou durable). En outre, cet essai n'a été réalisé que dans une optique d'emploi de bactéries PGPR comme des phytostimulateur de croissance ou des

biofertilisateurs. Un autre champ d'action restera à explorer : la bioprotection vis-à-vis de phytopathogènes.

3.3 Dialogue moléculaire entre *P. brassicacearum* et les autres souches testées

Essais préalables

Nous avons pu observer lors de l'essai de co-inoculation en culture liquide que le milieu de culture prenait une coloration différente selon le couple de souches utilisées. Cette coloration brune est liée à la production de 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG). Ce métabolite secondaire toxique à activité antibiotique est à la base de l'effet PGPR de *P. brassicacearum*. En effet, cette souche, en plus de sa capacité à stimuler la croissance de la plante par la production d'analogues de phytohormones, possède une capacité de biocontrôle contre un certain nombre de microorganismes bactériens, fongiques, ou encore sur les virus et les nématodes sensibles au DAPG (Meyer *et al.*, 2009).



2,4-diacetylphloroglucinol

Figure 3.48 : structure de la molécule du DAPG

En outre, des expériences menées *in vitro* sur des plantes ont démontré que sa présence stimule l'exsudation racinaire d'acides aminées et donc la mise à disposition de molécules nutritives pour les bactéries du rhizoplan de certaines espèces végétales (Phillips *et al.*, 2004). L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de cette molécule dans la rhizosphère de quatre espèces végétales a montré une forte implication de la plante dans le contrôle de la production du DAPG (Haichar *et al.*, 2014). Alors que le blé active fortement la production de DAPG et la luzerne tronquée dans une moindre mesure, l'arabette et le colza semblent inactiver sa production (Haichar *et al.*, 2014). L'approche de traçage par des isotopes stables semble indiquer que, soit l'arabette, soit les communautés microbiennes de la rhizosphère seraient impliquées dans cette inactivation (Haichar *et al.*, 2012). Schnider-Keel *et al.* (2000) ont également rapporté le rôle de métabolites secondaires dans le contrôle de la production du DAPG tels que la fusarine, la pyolutéorine et l'acide salicylique produits par d'autres microorganismes et les plantes.

Cette molécule est donc impliquée à la fois dans des phénomènes de biocontrôle et dans la manipulation de la plante pour la production de plus de nutriments via les exsudats racinaires. Etant sous le contrôle du dialogue moléculaire qui s'opère au niveau de la rhizosphère, il nous a paru logique d'étudier le contrôle des gènes de biosynthèse du DAPG dans la rhizosphère. Nous avons choisi de reprendre notre dispositif expérimental précédent en le modifiant afin d'exacerber les phénotypes précédemment observés un mois après inoculation. Pour cela, nous avons choisi de tester aussi un autre milieu de culture, le milieu CAA ou « casamino acids » qui est carencé en fer, en NaCl, en cystéine et en tryptophane. Le tryptophane étant un acide aminé qui est à la base de la

production d'acide indole acétique ou AIA par *Pseudomonas* (Oberhänsli *et al.*, 1991). De plus le rôle du fer dans la production du DAPG a été démontré par Almario *et al.* (2013).

Si, comme nous l'avons vu précédemment, le DAPG a pour rôle principal de permettre à *P. brassicacearum* de lutter contre d'éventuels compétiteurs ou organismes phytopathogènes grâce à son action antibiotique, il ne s'agit pas là du seul mécanisme de biocontrôle pouvant être mis en place par *P. brassicacearum*. En effet, elle produit aussi des cyanures d'hydrogènes dont les trois gènes de synthèse sont réunis au sein de l'opéron *hcnABC* comme décrit pour *P. protegens* (Laville *et al.*, 1998). Cet opéron code pour trois sous-unités d'une enzyme appelée HCN synthétase dont l'activité catalyse la réaction de déshydrogénation/oxydation de la glycine pour arriver à la production d'HCN et de CO₂. Cette réaction a lieu préférentiellement pendant la période de transition entre la phase exponentielle et stationnaire de croissance de cellules en condition de micro aérobie (Laville *et al.*, 1998). En outre, une étude plus récente a mis en évidence le rôle régulateur du fer dans l'expression de cet opéron (Blumer & Haas, 2000). En effet, une carence en fer du milieu environnant pourrait agir sur la conformation du régulateur anaérobie ANR causant l'arrêt de la production d'HCN chez *P. protegens*. Il apparaît ici que la capacité de *P. brassicacearum* à recruter le fer présent dans le milieu environnant est un facteur clé dans la production d'HCN et donc dans l'établissement de la partie HCN-dépendante de sa capacité de biocontrôle. Même si le fer est abondant dans les sols, on les retrouve généralement sous forme d'oxydes de fer dans des sols aérés les rendent moins disponible (Lindsay and Schwab, 1982). La rhizosphère étant globalement carencée en fer (Marschner *et al.*, 2011), la compétition entre les cellules pour s'accaparer les atomes de fer à proximité est l'un des piliers de la capacité d'une souche à s'implanter dans le rhizoplan.

Comme nous avons pu le voir précédemment, la production de DAPG et de cyanures d'hydrogène est à la base d'une partie des effets phytobénéfiques de *P. brassicacearum* NFM421 sur sa plante hôte. Dans ce travail, nous avons pu jusqu'à présent confirmer la présence des souches bactériennes de l'inoculum dans le sol ainsi que leur persistance au sein de la rhizosphère dans le cadre d'essais réalisés en sol agricole non stérile. Les premières estimations de l'abondance des souches introduites ont prouvé l'efficacité de *P. brassicacearum* à coloniser le rhizoplan dans des proportions supérieures aux autres souches testées, mais une importante question reste donc en suspens : les autres souches de l'inoculum n'interfèrent pas négativement dans la colonisation du rhizoplan du colza par la souche NFM421, mais ont-elles un impact négatif ou positif sur l'expression de son potentiel phytobénéfique ?

Le travail qui suit, réalisé *in vitro*, nous a permis dans un premier temps de confirmer l'excellente capacité colonisatrice de la souche NFM421 par la mesure précise par RT-PCR quantitative des proportions des souches de l'inoculum réalisé en l'absence ou en présence d'une plantule de colza. Puis, dans un second temps, ce travail apporte une réponse à la question posée par la mesure de l'expression des gènes *phlD* et *hcnA* impliqués respectivement dans la production de DAPG et des cyanures d'hydrogène par *P. brassicacearum* NFM421, témoignant ainsi de l'importance cruciale de la compréhension des dialogues moléculaires qui ont lieu entre les espèces bactériennes, au sein du microbiote, dans l'établissement des effets phytobénéfiques des PGPR.

Phytobeneficial Traits under the Control of Multiple Crosstalks' Belowground

Arnaud Laveilhé^{1}, Sylvain Fochesato^{1*}, Marie Bertrand¹, David Lalaouna², Thierry Heulin¹, Wafa Achouak^{1#}*

¹*Aix-Marseille University, CEA, CNRS, UMR 7265 BIAM, Lab Ecol Microb Rhizosphere Environ Ext (LEMIRE), 13108, Saint-Paul-Lez-Durance, France*

²*Department of Biochemistry, RNA Group, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

* These authors contributed equally to the study

Author for correspondence: BIAM, UMR 7265, Bât 161, CEA Cadarache. Tel.: +33(0)442 254 961;

E-mail: wafa.achouak@cea.fr

To be submitted in *Frontiers in Plant Sciences*

ABSTRACT

Among the very large biodiversity of rhizobacteria able to colonize and interact with plant hosts, pseudomonads play crucial roles in plant growth promotion and control of plant diseases. However other living organisms, including other rhizobacteria, fungi and plants might interfere with their biocontrol efficiency. Certain fluorescent pseudomonads produce antimicrobial secondary metabolites as hydrogen cyanide (HCN), and of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG). We hypothesized that failure of biocontrol agents in suppressing plant disease, under natural conditions, could be linked to a negative control of their phytobeneficial traits by others rhizobacteria competing for the same nutritive resources in the rhizosphere.

In this work, we assessed expression of phytobeneficial genes, *phlD* and *hcnA*, in *Pseudomonas brassicacearum* co-cultivated with three plant pathogen fungi (*Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*) and two other rhizobacteria (*Kosakonia sacchari* NO9 and *Rhizobium alamii* YAS34) in presence or absence of plant, as well as in relation to iron availability. We found that *P. brassicacearum* antifungal activity is dependant on DAPG production. This effect was not due to a direct effect of HCN as fungi induced down-regulation of *hcn* gene expression. We also showed that both rhizobacteria (*K. sacchari* NO9 and *R. alamii* YAS34) decrease *P. brassicacearum* antagonistic activity towards phytopathogen fungi by diminishing *phlD* and *hcnA* expression. This modulation was exacerbated under iron starvation.

In this work, we evidenced the potential modulation of biocontrol activity, and its regulation by biotic and abiotic factors.

Keywords: *Pseudomonas*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Brassica napus*, DAPG, HCN, competition, gene expression

INTRODUCTION

The soil microbiota selected by plant rhizosphere interact with plant roots in a continuum of ecological interactions ranging from pathogenicity, mutualism to symbiosis. The microbiota is believed to provide the host with valuable capabilities, which influence its physiology and improve its fitness (**Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008**). The rhizosphere microbiota may play an important role in plant nutrition and protection against pathogens. Many biocontrol fluorescent pseudomonads protect plants from soil-borne diseases by the production of antimicrobial secondary metabolite(s) such as hydrogen cyanide (HCN) and of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), which are important biocontrol determinants (**Haas and Défago, 2005, Vincent et al., 1991; Fenton et al., 1992; Keel et al., 1992**). DAPG has antifungal, antibacterial, antiviral, antihelminthic, and phytotoxic properties (**Brazelton et al., 2008, Haas and Keel, 2003**), induces systemic resistance in plants (**Iavicoli et al., 2003**), triggers exudation of amino acids from plant roots (**Phillips et al., 2004**), and inhibits cyst reactivation of protists (**Jousset et al., 2006**). *Phl* cluster encoding DAPG synthesis is involved in biocontrol of a broad spectrum of diseases by many antagonistic bacterial strains (**Haas and Défago, 2005**). Statistical analysis of the distribution of biocontrol rhizobacteria indicated that DAPG production ability was associated with higher disease suppression activity in the *Pythium*–cucumber and *Fusarium*–tomato pathosystems, and this was also the case with HCN production ability (**Rezzonico et al., 2007**). **Rezzonico et al. (2007)** also showed that *Phl*⁺ biocontrol pseudomonads generally protected better than *Phl*[–] biocontrol pseudomonads.

Phl implication in biocontrol was evidenced from studies of root-colonizing *Pseudomonas* in disease suppressive and conducive soils (**Raaijmakers and Weller, 1998; Weller et al., 2002**). The presence of *Phl*⁺ strains does not guaranty disease suppression as they were also found in conducive soils (**Ramette et al., 2003**). Indeed, **Rezzonico et al (2007)** reported an absence of correlation between the amounts of *Phl* produced *in vitro* by the *Phl* producers and their biocontrol efficiency *in planta*. The reason for the divergence between both studies is not elucidated.

Several studies have reported the interest of introducing particular bacterial strains, harbouring *in vitro* antifungal activity, into fields as a strategy for disease control. For the effective application of this approach in the field, it is needed to know which biotic and abiotic factors influence the introduced strain functions, especially under *in natura* conditions. Biocontrol involves exploiting disease-suppressive microorganisms to improve plant protection. Disease suppression by biocontrol involves plant-bacteria, bacteria-plant pathogen and bacteria-bacteria interactions, as well as interaction with the physico-chemical environment. Although there is an increasing demand in the frame of sustainable agricultural, biocontrol under field conditions is scarcely managed. Notwithstanding some successful assays with biocontrol agents in agriculture, there is a general scepticism born of past failures (**Cook and Baker, 1983; Weller, 1988**).

The interaction of biocontrol agents with the root-colonizing microbiota may provide evidences to explain why many microorganisms suppress disease efficiently in the laboratory conditions, but fail in

the field. Biocontrol agents may be affected by other microbial communities, and in some cases, they may work in synergy to suppress disease. In some cases, multiple partners interact to govern a single phytobeneficial trait. These complex relationships have important ecological impacts and are investigated in current symbiosis research (**Hussa and Goodrich-Blair, 2013**).

Pseudomonas brassicacearum has been described as the major root-associated bacterium in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* (**Achouak et al., 2000; Fromin et al., 2001**). Mutations in *gacS-gacA* system lead to drastic pleiotropic changes in *P. brassicacearum* (**Lalaouna et al., 2012**). In the variants with mutation in *gacS* or *gacA* genes, the expression of secondary metabolites (e.g. the antifungal compounds DAPG and cyanide), auxin, exoenzymes (e.g. lipase and protease), three different *N*-acyl-homoserine lactone molecules, the type VI secretion machinery, and alginate was downregulated, and biofilm formation ability was greatly reduced (**Lalaouna et al., 2012**). The expression of *phl* and *hcn* genes is thus under the positive control of GacS/GacA system. **Combes-Meynet et al. (2011)** showed that DAPG could act as a signal by which some beneficial pseudomonads may stimulate plant-beneficial activities of the PGPR *Azospirillum*.

To shed light on *in situ* phytobeneficial bacterial gene expression, **Haichar et al. (2013)** investigated the expression of *phlD* by developing the mRNA-stable isotope probing (mRNA-SIP) and showed that *phlD* gene was present and expressed by bacteria inhabiting rhizosphere soil and deriving nutrients from the breakdown of organic matter and from root exudates, whereas *phlD* gene expression seemed to be repressed on roots of *A. thaliana* (**Haichar et al., 2013**). The *in vitro* expression of *phlD* gene showed that *phlD* gene expression of *P. brassicacearum* was highly activated by root exudates of wheat and *Medicago truncatula*, and to a lesser extent by that of *Brassica napus* while it was downregulated by root exudates of *A. thaliana* (**Haichar et al., 2013**).

Little is known about the activity of genes underpinning biocontrol under natural conditions. Therefore, the aim of the current work was to better understand the behaviour of biocontrol agents by assessing the impact of biological factors on the expression of *phl* and *hcn* genes, encoding two major biocontrol determinants. In this work, we investigated the ability of *P. brassicacearum* NFM421 to compete with two other plant root-associated bacteria, *Kosakonia sacchari* NO9 and *Rhizobium alamii* YAS34, under iron depletion and iron repletion conditions, and in the presence (or not) of *B. napus*. We analysed the expression of *phlD* and *hcnA* genes of NFM421 strain under these different experimental conditions. We also tested the antagonism of *P. brassicacearum* NFM421wt and knockout mutants, $\Delta phlD$ and $\Delta gacA$, towards three soil-borne plant pathogens, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*, to compare the antifungal activity of DAPG and HCN. In the present study, we showed that antifungal activity of *P. brassicacearum* is mainly linked to DAPG production. An additional aspect of co-culture conditions we used is to assess the impact of biotic competitors (other root-colonizing bacteria) on the expression of biocontrol genes such as *phl* and *hcn*. Our results reveal strategies evolved by rhizobacteria cohabiting and competing for the same carbon and energy resources, in the same ecological niche. Despite the low number of competing

strains, their impact on the expression of *P. brassicacearum* antifungal genes was highly significant.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Cultures and Growing Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are summarized in Table 1. These include *P. brassicacearum* NFM421 isolated from the rhizosphere of *A. thaliana* (Achouak et al., 2000), *Kosakonia sacchari* NO9 isolated from the rhizosphere of rice (Omar et al., 1989), and *Rhizobium alamii* YAS34 from the rhizosphere of sunflower (Alami et al., 2000, Berge et al., 2009).

The fungal-bacteria interaction experiments were performed using the Potato-Dextrose-agar (PDA) medium. The PDA plates (8.5-cm diameter) were inoculated in the centre with each of the three fungi, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale* (kindly provided by Biovitis), and incubated at 25 °C for at least 48 h. Bacterial inocula, consisting of two spots of 10 µL containing 10⁷ cells washed in a 110 mM KCl solution were laid on either side of fungi at 2 cm from the fungal mycelium border. Two spots of 10 µL of KCl were also laid on either side of fungi and then all plates were incubated at 25 °C for more three days.

The bacterial co-culture experiments were performed using the iron-limited CAA medium supplemented with FeCl₃ 300 µM or without FeCl₃. Bacterial inoculum, consisting of 10⁷ cells of *P. brassicacearum* NFM421 were grown in pure culture or co-culture of equal cell numbers of *K. sacchari* NO9 or *R. alamii* YAS34, or both in a final volume of 10 mL CAA or iron-supplemented CAA medium. Cultures were incubated at 28 °C for 48 h, and bacterial cells were collected for DNA and RNA extraction.

Construction of $\Delta phlD$ Mutant

Upstream and downstream regions of *phlD* were amplified from *P. brassicacearum* NFM421 genomic DNA with the MD-*phlD*-1/MD-*phlD*-2 and MD-*phlD*-3/MD-*phlD*-4 primers, respectively (Table S1). In a second PCR, the overlap between primers MD-*phlD*-2 and MD-*phlD*-3 enabled amplification of a 2-kb fragment, in which the upstream and downstream regions were ligated together. This fragment was then cloned into the suicide vector pME3087 (41) and introduced into *E. coli* S17-1 by transformation. The recombinant plasmid was then introduced into the wild type by conjugation; cells were selected on TSB 1/10 agar plates supplemented with ampicillin (100 µg/mL) and tetracycline (100 µg/mL). Potential mutants were obtained by serial growth in TSB 1/10 broth and screening for tetracycline-sensitive cells. The resulting deletion in *phlD* was verified by PCR.

Quantification of Bacteria

Single copies and specific genes to *P. brassicacearum* NFM421, *K. sacchari* NO9, *R. alamii* YAS34, *phlD*, *hycE* and *gls* respectively, encoding DAPG, large subunit of hydrogenase and glycosyltransferase respectively, were identified, amplified from genomic DNA of each bacterial

species and cloned into plasmids TopoXL and used as standards in quantitative PCR. A serial dilution of the plasmid DNA was performed and the copy number of each specific gene from the three bacterial species was determined in the different culture combination. Calculations were performed for determining the mass of plasmid containing cloned target sequences (plasmid + insert) that correspond to copy numbers of target nucleic acid sequences. DNA was extracted from pure cultures or co-cultures by using phenol/chlorophorm/isoamyl alcohol extraction protocol for bacterial culture.

***phlD* and *hcnA* Gene Expression**

Overnight cultures of the appropriate strains were diluted in fresh CAA medium containing or not FeCl₃ 300 μM and incubated at 28 °C with agitation for 24 hours, then samples (0.5 mL) of the cultures were used for RNA extraction by using RNeasy Kit (Quiagen). q(RT)PCR assays were used to quantify *phlD* and *hcnA* expression of *P. brassicacearum* NFM421 alone or interacting with *K. sacchari* NO9 and/or *R. alamii* YAS34. Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic acid extracts were analysed in triplicate. Total RNA was extracted from *P. brassicacearum* NFM421 growing alone or in bipartite or tripartite interaction by using the RNAprotect bacteria reagent and RNeasy mini kit (Qiagen). Reverse transcription-PCR (RT PCR) assays were done using the Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche). Gene-specific primers of real-time PCR were designed based on *P. brassicacearum* NFM421 *phlD* and *hcnA* sequences to obtain predicted PCR products of 200-250 bases (Table S1). Amplifications were performed according to the real Q-PCR Light Cyclers 480 SYBR Green I Master kit instructions in Light Cyclers 480 Real Time PCR System (Roche). Real-time PCR was performed in triplicate, mRNA relative expression was normalized to 16S reference gene.

TABLE S1

Construction of Transcriptional *gfp* Fusions and Confocal Imagery

To construct transcriptional fusions, we amplified the promoter regions of *phlA* and *hcnA* by PCR with primers listed in Table S1 in the supplemental material. In these transcriptional fusions, the promoter fragments covered a region extending to 546 bp and 402 bp upstream of the deduced transcription start site of *phlA* and *hcnA*, respectively. The PCR products were then digested with appropriate restriction enzymes and cloned into pOT1e plasmid containing a promoterless *egfp* (Allaway et al., 2001). The constructs were checked by PCR and sequencing.

Confocal Imagery of *phlD* and *hcnA* Expression

For monitoring *in vitro* expression of antifungal genes, ds-red protein tagged *P. brassicacearum* NFM421 strains carrying a *phlA-gfp* or *hcnA-gfp* fusion (on plasmids pOtle-*phlA*, pOtle-*hcnA*, respectively) were grown in CAA medium ± FeCl₃, or *in planta* (*Brassica napus*).

The expression of the GFP- reporter and ds-red was monitored on a CSLM (Olympus) equipped with

an argon-krypton laser, detectors, and filter sets for simultaneous monitoring of GFP and RFP. Shadow projections and optical sections were generated using the Fluoview software package. The green fluorescence (excitation at 480 nm and emission at 520 nm) and red fluorescence (excitation at 587 nm and emission at 661 nm) were measured.

***phlD* and *hcnA* Gene Expression in planta**

Canola seeds (*Brassica napus* cv. Sensation) were calibrated between 1.6 and 2.0 mm, and then surface-sterilized for 15 min in 2.5 % NaClO (vol/vol) solution containing 60 µL of Tween 20 and then thoroughly rinsed with sterile distilled water. Seeds were suspended in ethanol and then air dried in a Petri dish. *P. brassicacearum* NFM421::*rfp* obtained using a PA1/04/03-RBSII*dsRed*-T0-T1 which harbours mini-Tn5 transposons (Tolker-Nielsen et al. 2000), as previously described (Achauak et al., 2004) was used to visualise them among competing strains.

Gfp Fusion

A suspension of 10^2 to 10^3 CFU of each competing strain *P. brassicacearum* NFM421::*rfp* harbouring *phlA* promoter-*egfp* fusion or *P. brassicacearum* NFM421::*rfp* harbouring *hcnA* promoter-*egfp* fusion, *K. sacchari* NO9 and *R. alarii* YAS34 were used alone or in combination with NO9 or YAS34 or both strains. Bacterial suspensions were added to 1 mL of agar at 5 g/L containing half-strength Hoagland medium (Arnon and Hoagland, 1940) and poured as a band where surface-sterilized canola seeds were sown (3 sterile seeds per plate) on half-strength Hoagland medium and 0.8 % phytigel (Sigma, St. Louis). The squared dishes (15 by 15 cm) were sealed with micropore tape (3M, St. Paul, MN, U.S.A.) and incubated vertically at 22 °C with 16 h of light and 18 °C at night (approximately 100 photons/m²/s) per day. *In situ* expression of *phlD* and *hcnA* genes and colonization patterns of *P. brassicacearum* NFM421 were monitored and imaged on roots by confocal microscopy.

Table S1 Strains, plasmids and primers used in this study.

Strains, plasmids and primers used in this study		
Strains	Description	Reference or source
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Strr) endA1-	Invitrogen
GM2163	F- dam-13::Tn9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsx-78 supE44 McrA- McrB-	
S17-1	thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu, Kn::Tn7	
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		
Phase I NFM421	Wild type	Achouak <i>et al.</i> , 2000
NFM421 Δ gacA	Δ gacA	Lalaouna <i>et al.</i> 2012
NFM421 <i>phlD</i>	Δ phlD	This study
Plasmids		
pME3087	ColE1-based suicide plasmid, Tc ^r	Voisard <i>et al.</i> , 2007
pME3087- Δ gacA	pME3087 derivate containing upstream and downstream regions of <i>gacA</i>	Lalaouna <i>et al.</i> 2012
pME3087- Δ phlD	pME3087 derivate containing upstream and downstream regions of <i>phlD</i>	This study
pOT1e	Promoter probe vector based on pBBR1MCS-5 replicon. Contains promoterless egfp and MCS between two transcriptional terminators; Gmr	Allaway <i>et al.</i> 2001
pOT1e- <i>phlA</i>	Promoter probe vector based on pBBR1MCS-5 replicon containing promoterless egfp, harboring <i>phlA</i> promoter	This study
pOT1e- <i>hcnA</i>	Promoter probe vector based on pBBR1MCS-5 replicon containing promoterless egfp, harboring <i>hcnA</i> promoter	This study
pmKate2-N		Evrogen, Russia
pBBR1MCS-2	Broad-host-range, Km ^r <i>lacPOZ mobRP4</i>	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBBR1MCS-2::GFP	pBBR1MCS-2 harboring PCR product comprising <i>gfp</i>	This study
pBBR1MCS-2::mkate	pBBR1MCS-2 harboring PCR product comprising <i>mkate</i>	This study
Primers		
<i>phlD</i> mutagenesis		
MD- <i>phlD</i> -1	CATAGAATTCGATGTGGCGCAAGTCTACG	This study
MD- <i>phlD</i> -2	CATAGCTAGCACAAGTCCTCGGCGAGAAG	This study
MD- <i>phlD</i> -3	CAGTGCTAGCCAGACCCGATAAAACACCG	This study
MD- <i>phlD</i> -4	CATACTGCAGAGAAATGATCATGGCCATGGAG	This study
q-PCR		
gta-fw	AGTGTGGCGCTGTTCTACG	This study
gta-rev	CGGCGAGTCTTAGCAGATG	This study
hycE5 fw	TGGCAGACCAAAGACCAGATGA	This study
hycE5 rev	ACGGACGGATATTCCGGTTTCA	This study
phlD-fw	CAATCGAGCCAATGACTTCGC	This study
phlD-rev	CAAGGTGAAATGAAAGCCGC	This study

q-RT-PCR		This study
hcnA-fw	CTGCCCACGGTGAAACAGTCCT	This study
hcnA-rev	CGTTTCGGGGATGCGGTTGAC	This study
16s PSEBR fw	GCATTAACCTAATACGTTAGTG	This study
16s PSEBR rev	CTGCGCCACTAAGAGC	This study
phlD-fw	CAATCGAGCCAATGACTTCGC	This study
phlD-rev	CAAGGTGAAATGAAAGCCGC	This study
Transcriptional fusions		This study
PhlA Hind III	CATAAAGCTTACCGCCTCGATGCTCAACC	This study
PhlA SalI	CATAGTCGACTTCATGTGTACTTCCTCCAGATTC	This study
hcnA-ClaI	CATA <u>AATCGATA</u> ACCGCCCGTTCCAGG	
hcnA-PmeI	CATAGTTTAAACGCATCATAACGGCTCTTC	
mkate construct		
mkate-fw	CATACATATGATGGTGAGCGAGCTGATTAAGG	This study
mkate-rev	CATAGAATTCTCATCTGTGCCCCAGTTTGCTA	This study

Statistical Analysis

For each experiment, triplicates were used. Statistical analyses were carried out on q-PCR data from three replicates per treatment in each experiment. The significance of results was examined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by posthoc tests (Student-Newman-Keuls test). These analyses were performed in STATGRAPHICS Centurion XVI.II. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Only DAPG is Required for Biocontrol Activity in *P. brassicacearum*

We assessed the antagonistic activity of *P. brassicacearum* wt and the knockout mutants, $\Delta phlD$ and $\Delta gacA$ towards soil-borne plant pathogens *F. culmorum*, *F. graminearum* and *M. nivale*. The GacS/GacA two-component system positively controls the expression of *hcn* and *phl* genes in *P. brassicacearum*. The mutant $\Delta gacA$ produced neither DAPG nor cyanide, while the mutant $\Delta phlD$ was able to produce cyanide not DAPG. Only the wild type was able to inhibit the growth of the three fungi tested, underscoring the role of DAPG produced by *P. brassicacearum* NFM421 in its antifungal activity. *F. graminearum* and *M. nivale* showed increased sensitivity to 2,4-DAPG in comparison to *F. culmorum*, as their growth was strongly inhibited by the wild-type of *P. brassicacearum*, whereas the mutants $\Delta phlD$ and $\Delta gacA$ did not exhibit any antifungal activity (Table 2, Figure 1).

TABLE 2 | Antifungal activity of *P. brassicacearum* NFM421 wt and its $\Delta phlD$ and $\Delta gacA$ mutants against soil-borne plant pathogen *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*. (Inhibition radius in cm)

Strain	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>M. nivale</i>
WT	19.00	29.00	31.00
$\Delta gacA$	6.00	0.00	0.00
$\Delta phlD$	0.00	0.00	0.00

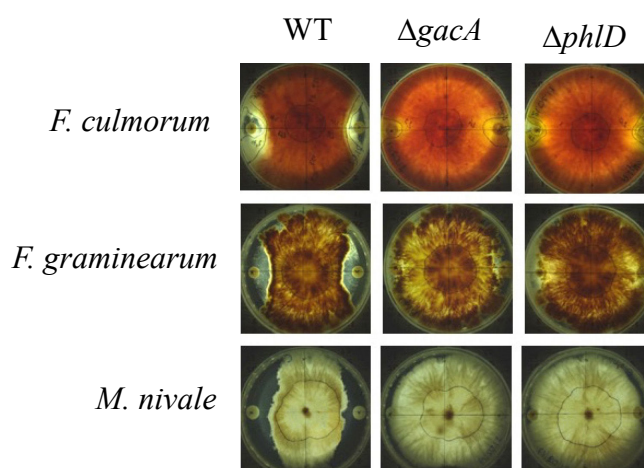


FIGURE 1 | Antifungal activity of *P. brassicacearum* NFM421 wt and its $\Delta phlD$ and $\Delta gacA$ mutants against soil-borne plant pathogen *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*.

Bacteria-Fungi Dialogue

To further investigate whether *phl* and *hcn* genes are expressed when bacteria are facing the fungi, we deposited *P. brassicacearum* NFM421 in the border of the Petri dish and the growing fungi

(*F. culmorum*, *F. graminearum* and *M. nivale*) at the center for 48 h. The expression level of *phlD* and *hcnA* genes of NFM421 strain was determined by qRT-PCR in PDA medium, and in presence or not of the three fungi. No significant impact was observed on *phlD* expression by any of the three fungal species (Figure 2A), while *hcnA* expression was significantly decreased by *M. nivale* and to a lower extent by *F. culmorum* and *F. graminearum* (Figure 2B), indicating a fungal negative control of cyanide production by *P. brassicacearum* NFM421, explaining the absence of antifungal activity with the cyanide-producing $\Delta phlD$ mutant (Figure 1). These data denote the importance of DAPG in *P. brassicacearum* NFM421 in the control of plant pathogen fungi.

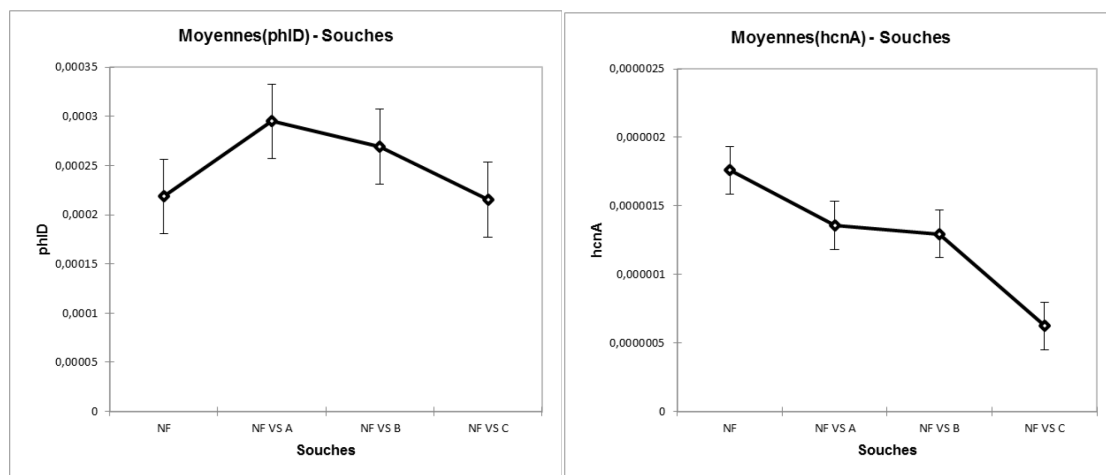


FIGURE 2 | Expression of *phlD* (A) and *hcnA* (B) genes of *P. brassicacearum* NFM421 grown alone or in presence of *Fusarium culmorum* (NF vs A) or *Fusarium graminearum* (NF vs B), or *Microdochium nivale* (NF vs C).

Population Size of Competing Bacteria *in vitro* and *in planta*

The aim of this investigation was to establish a quantitative method for the detection of the three interacting strains using qPCR. To do this, the *phlD* gene was used for the quantification of *P. brassicacearum* NFM421, the *hycE* gene encoding hydrogenase for the quantification of *K. sacchari* NO9 (Roumagnac et al., 2012) and the *gta* gene encoding glycosyltransferase for the quantification of *R. alarii* YAS34 (Santaella et al., 2008). To this end, a standard curve with a plasmid DNA template plasmids containing cloned target sequences *phlD*, *hycE* and *gls* were created and used as standards in quantitative PCR.

Bacterial population size under *in vitro* competitions: *P. brassicacearum* NFM421 was cultivated alone or in co-culture with each or both competing YAS34 and NO9 strains, in iron depleted or iron replete (FeCl_3 300 μM) conditions by using CAA medium. During interactions, equal cell numbers of each strain were used to inoculate culture media. The proportion of each strain was determined to assess competitive interactions occurring between NFM421 strain and the two other strains. In all situations, *P. brassicacearum* NFM421 was highly significantly more abundant than competing strains

(Table 3). *R. alarii* YAS34 did not exceed 3 % when co-cultured with NFM421 strain and less than 2 % when co-cultured with the two other strains together, whatever the iron availability in the growth culture. The proportion of *K. sacchari* NO9 was higher, up to 17 % when competing with NFM421 strain alone, and up to 14 % during the tripartite interaction (Table 3). Here again, no significant difference was observed in relation to iron availability.

TABLE 3 | Population size (in percentage) of *P. brassicacearum* NFM421 grown alone or in competition with *K. sacchari* NO9 or *R. alarii* YAS34, or with both competitors NO9 and YAS34, in CAA medium supplemented with FeCl₃ or not (-). %Mean ± SD

Treatment	NFM421	SD	YAS34	SD	NO9	SD
NFM421+FeCl ₃	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFM421-	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFM421/YAS34+FeCl ₃	97.8	0.2	2.2	0.2	0.0	0.0
NFM421/YAS34-	96.8	0.1	3.2	0.1	0.0	0.0
NFM421/NO9+ FeCl ₃	83.2	4.1	0.0	0.0	16.8	4.1
NFM421/NO9-	87.2	2.1	0.0	0.0	12.8	2.1
NFM421/YAS34/NO9+FeCl ₃	85.1	3.8	1.6	0.2	13.3	3.7
NFM421/YAS34/NO9-	83.7	1.4	1.9	0.1	14.4	1.3

Bacterial population size under *in planta* competitions: *B. napus* seeds were inoculated with the same cell numbers of each strain. Compared to *in vitro* conditions, *R. alarii* YAS34 showed a higher ability to compete *in planta* with NFM421, mainly under iron depleted conditions with a percentage reaching 18.5 % (Table 4). However during tripartite interaction, *R. alarii* YAS34 represented 2.7 and 5.6%, respectively under iron replete and depleted conditions, which is comparable with *in vitro* conditions (Table 3). When competing with NFM421 alone, *K. sacchari* NO9 strain represented 8 % in iron-independent manner, while this strain were much less competitive under iron-depleted condition during tripartite interaction, representing about 2 % of total bacteria interacting with plant, remaining competitive in presence of FeCl₃ (14.7 %, Table 4). Whatever the strain competitor and whatever the iron availability, *P. brassicacearum* NFM421 was highly significantly dominant.

TABLE 4 | Population size (in percentage) of *P. brassicacearum* NFM421 grown alone or in competition with *K. sacchari* NO9 or *R. alarii* YAS34, or with both competitors NO9 and YAS34, in association with *Brassica napus* supplemented with FeCl₃ or not (-). %Mean ± SD

Treatment	NFM421	SD	YAS34	SD	NO9	SD
NFM421+FeCl ₃	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFM421-	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFM421/YAS34+FeCl ₃	96.0	0.5	4.0	0.5	0.0	0.0
NFM421/YAS34-	81.5	2.4	18.5	2.4	0.0	0.0
NFM421/NO9+ FeCl ₃	91.9	3.4	0.0	0.0	8.1	3.4
NFM421/NO9-	91.5	4.4	0.0	0.0	8.5	4.4
NFM421/YAS34/NO9+FeCl ₃	82.6	10.8	2.7	0.7	14.7	10.3
NFM421/YAS34/NO9-	92.6	1.2	5.6	1.2	1.8	0.7

Bacteria-Bacteria Dialogue

The molecular dialogue between *P. brassicacearum* NFM421 and the two bacterial competitors (*K. sacchari* NO9, *R. alamii* YAS34) was assessed by evaluating their impact on the expression of two genes, *phlD* and *hcnA*, involved in the biocontrol capacity of NFM421 strain. The presence of the two other strains (single or in combination), even if they represented less than 20 % of total bacterial counts, caused significant transcriptional changes in the expression of *phlD* and *hcnA* in *P. brassicacearum* NFM421, respectively in both iron conditions and in iron-depleted condition (Figure 3). The *phlD* gene in NFM421 is expressed in the same manner whatever iron availability when the bacterium is grown alone. However, the presence of competitors in bipartite or tripartite co-cultures significantly decreased the *phlD* expression level under iron-replete conditions, and more sharply under iron depleted conditions by two and threefold respectively (Figure 3). The *hcnA* gene is positively regulated under iron starvation in *P. brassicacearum* NFM421 grown alone, with six-fold expression increased. This highly significant increase ($P < 0.05$) in iron-depleted condition was no longer observed when *P. brassicacearum* NFM421 was grown with both competitors (single or in combination) (Figure 3). Despite their limited growth in presence of *P. brassicacearum* NFM421, the two competitors have a highly significant impact on antifungal gene expression by *P. brassicacearum* NFM421.

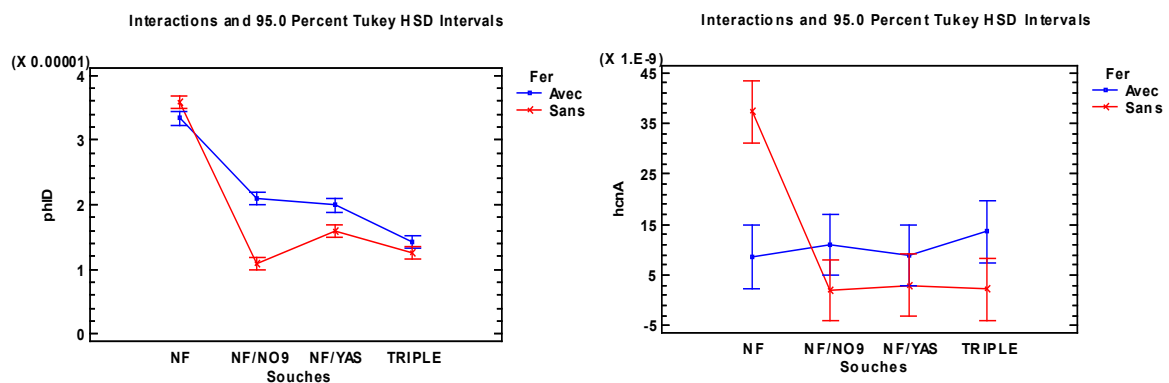


FIGURE 3 | Expression of *phlD* (A) and *hcnA* (B) genes of *P. brassicacearum* NFM421 grown alone or in competition with *K. sacchari* NO9 (NF/NO9) or *R. alamii* YAS34 (NF/YAS), or with both competitors NO9 and YAS34 (Triple).

Plant-Bacteria-Bacteria Dialogue

We also investigated transcriptional changes of *P. brassicacearum* NFM421 antifungal genes in the presence of the two competing bacterial species during their interaction with canola seedlings. Here again, the expression of *phlD* gene of *P. brassicacearum* NFM421 is unchanged in response to iron availability, when the strain was grown alone. The presence of *K. sacchari* NO9 changed the *phlD* expression in two opposite ways, by a twofold increase under iron limitation and a threefold decrease

when iron was not limited (Figure 4). In comparison, the presence of *R. alarii* YAS34 slightly but significantly decreased *phlD* expression whatever iron availability. During interaction of the three competitors *in planta*, the impact of *K. sacchari* NO9 strain was attenuated, but still significant in a similar way as during its bipartite interaction with NFM421 strain. The expression of *hcnA* gene was unchanged in relation to iron availability, whenever *P. brassicacearum* NFM421 was alone *in planta* or interacting with each or both competitors.

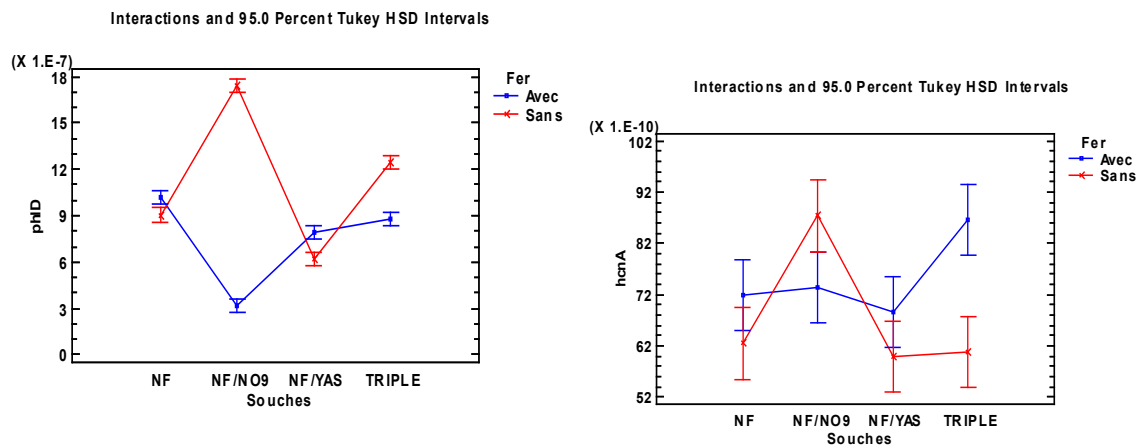


FIGURE 4 | Expression of *phlD* (A) and *hcnA* (B) genes of *P. brassicacearum* NFM421 grown in the rhizosphere of *Brassica napus*, alone or in competition with *K. sacchari* NO9 (NF/NO9) or *R. alarii* YAS34 (NF/YAS), or with both competitors NO9 and YAS34 (Triple).

Imaging of Antifungal Gene Expression

The transcriptional fusion *phlA-gfp* containing the promoter region of *phl* operon and the transcriptional fusion *hcnA-gfp* containing the promoter region of *hcn* were also used to image *phl* and *hcn* genes expression during dual and tripartite interactions. The LSCM observations corroborated qRT-PCR data, revealing a lower expression of *hcnA* gene in comparison to *phlD* gene (Figure 5).

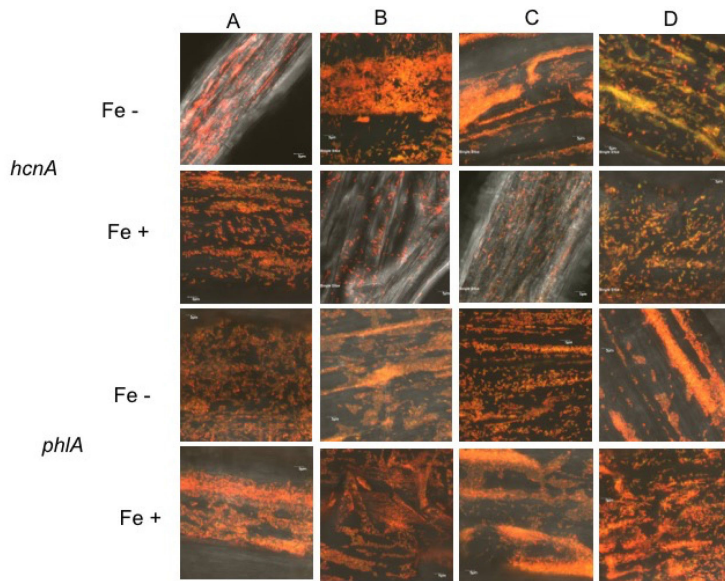


FIGURE 5 | *In planta hcnA and phlA* genes expression of *rfp* tagged *P. brassicacearum* NFM421 on *B. napus* roots visualized by confocal microscopy using green fluorescent protein *gfp*-based reporter constructs alone (A) and during interaction with *K. sacchari* (B) NO9 and *R. alarii* YAS34 (C) and with both (D) under iron limiting conditions (Fe-) and iron replete conditions (Fe+). Size bars represent 5 μ m.

Monitoring the proportion of each competing bacteria indicates enrichment of specific microbial populations that have evolved to colonize the rhizoplane. Co-localisation of competing bacteria allows determining if they are sharing the same micro-niche on the root surface or if they are inhabiting separate sites (Figure 6). As evidenced on Figure 6A, *P. brassicacearum* NFM421::*rfp* and *K. sacchari* NO9::*gfp* colonized the same sites on the rhizoplane (yellow patch due to mixed expression of *rfp* and *gfp*), while the sites colonized by *R. alarii* YAS34 are not co-localized with those of *P. brassicacearum* NFM421 (Figure 6B);

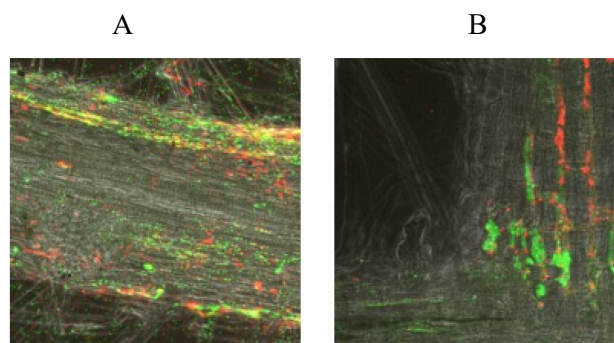


FIGURE 6 | *In planta* co-localization of *P. brassicacearum* NFM421 tagged with *rfp* (red) and *K. sacchari* NO9 tagged with *gfp* (green) (A); *P. brassicacearum* NFM421 tagged with *rfp* (red) and *R. alarii* YAS34 tagged with *gfp* (green) (B).

DISCUSSION

Pseudomonads play crucial roles in plant growth promotion and control of plant diseases, however other living organisms, including other bacteria, fungi and even plants might interfere with their biocontrol efficiency. Certain fluorescent pseudomonads produce antimicrobial secondary metabolites as hydrogen cyanide (HCN), and 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG). In this work, we assessed the expression of *phl* and *hcn* genes in *P. brassicacearum* in co-culture with other plant root-associated bacteria *K. sacchari* and *R. alarii*. Here, we demonstrated the modulation of antifungal activity by other microorganisms, depending on the presence of the competing bacteria, plant and iron availability. The host colonization by biocontrol agents is essential for biocontrol but not sufficient for plant protection against pathogens. Besides competing for the rhizosphere resources and for space on the roots, the biocontrol agent should be able to express antifungal genes and to produce the corresponding compounds. Among the genes that are modulated during interspecific bacterial interactions are often the genes involved in the production of antibiotics, as a defensive or offensive strategy in microbial interactions (Fong et al., 2001; Harrison et al., 2008; Garbeva and de Boer, 2009). The rhizosphere-associated bacteria are always encountered as mixed populations of different species in the environment, They have to deal with other microorganisms, the host and environmental cues. These associations are the result of a co-evolution process that leads to the establishment of strategies enabling the adaptation to specific ecological niches.

P. brassicacearum* outcompetes *K. sacchari* and *R. alarii

Our data show that *P. brassicacearum* NFM421 dominates *K. sacchari* NO9 and *R. alarii* YAS34 strains in both iron depleted and repleted conditions via a higher growth-rate and further outcompetes the latter bacteria. *P. brassicacearum* produces at least two types of siderophores, which may facilitate recovery of scarce amounts of iron to which it has access in aerobic environments and at least two antimicrobial compounds DAPG and HCN. These features likely afford a competitive advantage over other microorganisms in the rhizosphere. These observations are consistent with previous studies showing that batch cultures of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a defined medium produce a secreted factor(s) that is stimulated by iron-limitation, and inhibits *Agrobacterium tumefaciens* biofilms (Hibbing and Fuqua, 2013).

Surprisingly *R. alarii* YAS34 was more efficient *in planta* in competing with NFM421 strain under iron limiting conditions than under iron replete conditions where they reached up to 18 and 4% respectively, suggesting that YAS34 strain is presumably efficient in iron recovery and probably the growth rate of NFM421 strain is much higher at the expense of root exudates and under iron replete conditions.

***phlD* and *hcnA* genes expression is not exclusively controlled by iron**

Both competitors mostly down-regulated *phlD* gene whatever iron availability and *hcnA* gene under

iron limiting conditions when co-cultured with NFM421 strain in CAA medium suggesting that these competing bacterial species may produce specific signals that are perceived by *P. brassicacearum*, and that act directly or indirectly at transcriptional level.

In *P. brassicacearum*, the global activator GacA is required for the expression of the HCN biosynthetic genes *hcnABC* and DAPG biosynthetic genes *phlACBD* (Lalaouna et al., 2012). While *phlD* gene expression is not modulated by iron availability, *hcnA* gene expression is remarkably increased under iron limitation. Unlike *Pseudomonas protegens* CHAO (Blumer and Haas, 2000), the conserved FNR/ANR recognition sequence is lacking in the promoter region of *hcnABC* operon, and the expression of *hcnA* in *P. brassicacearum* is not abolished by iron depletion and surprisingly, it is even sevenfold increased under iron limiting conditions.

The eightfold drop response for *hcnA* is triggered under iron starvation during competition with NO9 and YAS34 strains, whether translates an interspecies struggle for the low amount of iron, or a higher antimicrobial activity of cyanide under iron limiting conditions, while *phlD* gene is dropped during interspecies interaction whatever iron availability.

Iron is a necessary nutrient for most bacteria and is one of the major limiting resources for which microorganisms compete. In addition to the indirect competition for iron involving siderophores, *Pseudomonas aeruginosa* has been shown to kill *Staphylococcus aureus* and use the released iron (Mashburn et al. 2005). Competitive behaviours between bacteria are partly controlled by iron availability (Andrews et al., 2003). Many mechanisms can be involved in bacterial exchange, such as secondary metabolites and quorum-sensing system quenching. Bacteria are known to communicate with one another and to modulate their gene expression through quorum-sensing (QS) signalling molecules (Nealson et al., 1970).

Proximity favours communication

During interspecies interaction *in planta*, *P. brassicacearum* antifungal genes are more modulated by *K. sacchari*, exhibiting a complete different behaviour than during co-culture in the absence of the plant, suggesting that whether the latter request for iron is higher than that of *Rhizobium* or its ability to uptake iron under limiting conditions is lower. Another hypothesis is that probably *K. sacchari* is more competitive and protects itself against the antimicrobial effect of DAPG and cyanide by dropping their production. It is worth noting that NO9 strain occupied the same sites than NFM421 strain on the rhizoplane as they were systematically co-localised. In the meantime, *R. alarii*, which did not show any significant impact on antifungal genes expression, was shown to inhabit niches on the roots where NFM421 strain was not found. Inhabiting separate niches may lead to lower interaction and exchange.

Conclusion

Antifungal genes expression is modulated under interspecies interaction, confirming that rhizosphere bacteria can compete with each other with a range of antibacterial agents, quorum-sensing and presumably unknown signalling molecules. The mechanisms by which a bacterial population interferes with gene expression on another population are not yet fully understood. Inter-kingdom and interspecies interactions alongside external factors may affect the success of introduced beneficial microorganisms. Delineating the mechanisms by which such interactions occur and evolve in the rhizosphere remains an important and exciting avenue of research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

WA conceived the experiments and coordinated the research. AL and SF performed the experiments. MB xxx, DL xxxx. AL, SF, TH and WA discussed the findings and interpreted the results. AL and WA wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

FUNDING

AL has a researcher fellowship from ANRT (Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie) (CIFRE N° 2011/1473)

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at:
<http://journal.frontiersin.org/articlexxxx>

REFERENCES

- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J. M., Fromin, N., Degraeve, S., et al. (2000). Description of *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50,9-18. doi: [10.1099/00207713-50-1-9](https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-9)
- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., and Heulin, T. (2004). Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root colonization strategy. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 872-9. doi: [10.1094/MPMI.2004.17.8.872](https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.8.872)
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., and Heulin, T. (2000). Colonization of sunflower roots by EPS-producing *Rhizobium* sp. and its effect on rhizosphere soil aggregation and plant nutrition. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3393-3398. doi: [10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000)
- Allaway, D., Schofield, N. A., Leonard, M. E., Gilardoni, L., Finan, T. M., and Poole, P. S. (2001). Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ. Microbiol.* 3, 397-406. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00205.x
- Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 2003; 27:215–237. [PubMed: 12829269]
- Arnon, D. I., and Hoagland, D. R. (1940). Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Sci.* 50, 463-485.
- Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santaella, C., Roncato, M. A., Christen, R., et al. (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 367-72. doi: [10.1099/ijs.0.000521-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.000521-0)
- Blumer, C., and D. Haas. (2000). Iron regulation of the hcnABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology* 146:2417-2424.
- Brazelton, J. N., Pfeufer, E. E., Sweat, T. A., Gardener, B. B. M., and Coenen C. (2008). 2,4-diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 349-1358. doi: [10.1094/MPMI-21-10-1349](https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1349)
- Combes-Meynet, E., Pothier, J. F., Moëgne-Loccoz, Y., and Prigent-Combaret, C. (2011). The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24(2), 271-84. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0148.
- Cook, R. J., and Baker, K. F. (1983). *The Nature and Practice of Biological Control of Plant*

Pathogens. (St. Paul, MN: APS Press).

- Fenton, A. M., Stephens, P. M., Crowley, J., O'Callaghan, M., and O'Gara, F. (1992). Exploitation of gene(s) involved in 2,4 diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3873-3878.
- Fong, K. P., Chung, W. O., Lamont, R. J., and Demuth, D. R. (2001). Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect Immun.* 69(12):7625-34. doi: 10.1128/IAI.69.12.7625-7634.2001
- Fromin, N., Achouak, W., Thiery, J. M., and Heulin, T. (2001). The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: influence of plant genotype. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37,21-29. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00849.x
- Garbeva, P., and de Boer, W. (2009). Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression. *Microb. Ecol.* 58(1), 36-46. doi: 10.1007/s00248-009-9502-3.
- Haas, D., and Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41,117-153. doi: [10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656)
- Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307-319. doi: [10.1038/nrmicro1129](https://doi.org/10.1038/nrmicro1129)
- Haichar, F. Z., Fochesato, S., and Achouak, W. (2013). Host-plant specific control of 2,4-diacetylphloro-glucinol production in the rhizosphere. *Agronomy* 3, 621-631. doi:10.3390/agronomy3040621
- Harrison, J. J., Turner, R. J., Joo, D. A., Stan, M. A., Chan, C. S., Allan N. D., et al. (2008). Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(8), 2870-81. doi: 10.1128/AAC.00203-08.
- Hussa, E. A., and Goodrich-Blair, H. (2013). It takes a village: ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 161-78. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155723
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., and Métraux, J. P. (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 851-858. doi: [10.1094/MPMI.2003.16.10.851](https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.10.851)
- Jousset, A., Lara, E., Wall, L. G., and Valverde C. (2006). Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7083-7090. doi: [10.1128/AEM.00557-06](https://doi.org/10.1128/AEM.00557-06)

- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., et al. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5, 4-13. doi: 10.1094/MPMI-5-004
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175–176
- Lalaouna, D., Fochesato, S., Sanchez, L., Schmitt-Kopplin, P., Haas, D., Heulin, T., et al. (2012) Regulatory RNAs control phenotypic switching in *Pseudomonas brassicacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78,1658-1645.
- Mehrabi, Z., McMillan, V. E., Clark, I. M., Canning, G., Hammond-Kosack, KE, Preston G, et al. *Pseudomonas* spp. diversity is negatively associated with suppression of the wheat take-all pathogen. *Sci. Rep.* 6, 29905. doi: 10.1038/srep29905. doi: 10.1038/srep34681
- Nealson, K. H., Platt, T. & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313 – 322.
- Omar, A. M. N., Richard, C., Weinhard, P., and Balandreau, J. (1989). Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. *Biol. Fertil. Soils* 7,158-163. doi: 10.1007/BF00292575
- Phillips, D. A., Fox T. C., King M. D., Bhuvaneshwari T. V., and Teuber L. R. (2004). Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiol.* 136, 2887-2894. doi: 10.1104/pp.104.044222
- Ramette, A., Moënne-Loccoz, Y., and Défago, G. (2003). Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 35-43. doi: 10.1016/S0168-6496(02)00454-3
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., and Thomashow, L.S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 881-887.
- Raaijmakers, J. M., and Weller, D. M. (1998). Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 144-152. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.2.144
- Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moënne-Loccoz, Y., and Défago, G. (2007). Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytol.* 173(4), 861-72. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01955.x

- Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., et al. (2000). Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J. Bacteriol.* 182, 1215-1225. doi: 10.1128/JB.182.5.1215-1225.2000
- Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J. M., Kovacevich, P.A., Murkerji, P., Weller, D. M., et al. (1991). Genetic analysis of the anti-fungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2928-2934. WOS:A1991GH55800025
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407. doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., and Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309-348. doi:[10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010)
- Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(5), 723-735. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4 Conclusion et perspectives

Synthèse des résultats obtenus

4.1 Sélection des souches bactériennes :

Nous avons sélectionné 7 souches bactériennes issues de 6 genres bactériens pour leurs effets phytobénéfiques connus ou potentiels.

Tableau 3.28 : Synthèse des effets phytobénéfiques potentiels de chaque souche étudiée.

	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	<i>P. brassicacearum</i> NFM11702	<i>E. radicans</i> NO9	<i>R. alarii</i> YAS34	<i>P. agglomerans</i> NO30	<i>P. caribensis</i> P71	<i>R. tataouinensis</i> TTB310
Stimulation de la croissance	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Production de phytohormones	✓	✓	✓		✓		
Capacité de biocontrôle	✓	✓					
Production de métabolites antifongiques	✓	✓					
Structuration du sol				✓		✓	
Solubilisation d'éléments minéraux			✓		✓	✓	✓
Fixation libre de l'azote atmosphérique			✓		✓		

Nous avons donc tout d'abord procédé à la validation de leur capacité de croissance *in vitro*. A l'issue de cette étape, la souche TTB310 a été écartée de l'étude. Des essais ont alors été réalisés en sol agricole non stérilisé à l'issue desquels nous avons pu observer le maintien des souches NFM421, 11702 et NO9 pendant 3 mois dans la rhizosphère du colza.

Nous avons ensuite testé la capacité des souches retenues à solubiliser le phosphate insoluble en conditions *in vitro*. Ces essais réalisés en conditions monoxéniques et en co-inoculation mettent en évidence principalement l'activité solubilisatrice des souches NO30, NO9 et P71 en inoculation simple. Cet effet est maintenu en co-inoculation avec NFM421 pour NO9 et P71 et a fortement diminué dans le cas du couple NFM421/NO30.

Nous avons par la suite souhaité mettre en évidence un éventuel antagonisme entre la souche NFM421 et les autres souches en co-inoculation *in vitro*, en l'absence et en présence d'une plantule de colza. Il nous est apparu que les souches 11702 et NO30, qui se maintiennent en présence de la souche NFM421 en co-inoculation sur milieu riche, disparaissent en présence de la souche NFM421 quand les exsudats racinaires du colza constituent la seule source de carbone et d'énergie.

4.2 Sélection des trois souches les plus performantes :

Au début de l'étude, nous avons écarté la souche TTB310 qui n'a pu croître en présence du colza en condition monoxénique. À l'issue des tests suivants, nous avons choisi d'écartier de l'étude les souches 11702 et NO30, incapables de se maintenir en présence de la souche NFM421 en utilisant les exsudats racinaires du colza comme seule source de carbone et d'énergie. Enfin, nous avons choisi d'écartier de l'étude la souche P71 qui, appartenant au genre *Paraburkholderia* risquait de ne pas obtenir d'autorisation de distribution pour expérimentation (ADE).

Ont donc été retenues pour la suite les souches NFM421, NO9 et YAS34, complémentaires du point de vue de leurs effets phytobénéfiques et compatibles en co-inoculation.

Tableau 3.29 : Synthèse des effets phytobénéfiques potentiels complémentaires des souches retenues.

	<i>P. brassicaearum</i> NFM421	<i>E. radicans</i> NO9	<i>R. alarii</i> YAS34
Stimulation de la croissance	✓	✓	✓
Capacité de biocontrôle	✓		
Production de métabolites antifongiques	✓		
Structuration du sol			✓
Solubilisation d'éléments minéraux		✓	

4.3 Test de l'inoculum en co-inoculation en sol agricole non stérilisé

Une première série de trois essais de co-inoculation a alors été réalisée en serre en sol agricole non stérilisé.

Ces essais ont tout d'abord permis de confirmer le maintien des souches utilisées pour l'inoculation au sein de la rhizosphère des plantules pendant les 35 jours qu'ont duré les essais. Il apparaît cependant que, selon la modalité étudiée, les souches ne se comportent pas de la même façon. En moyenne la souche NFM421 est retrouvée dans 99 % des modalités avec une concentration estimée à $1,6 \cdot 10^4$ CFU.mg⁻¹ de racine, la souche YAS34 dans 83 % des cas avec une concentration estimée à $6,7 \cdot 10^3$ CFU.mg⁻¹ de racine, et la souche NO9 n'est retrouvée que dans seulement 34 % des cas avec une concentration estimée à $4,5 \cdot 10^3$ CFU.mg⁻¹ de racine.

L'analyse des paramètres agronomiques a mis en évidence un effet significatif de la souche YAS34 sur l'accroissement de la biomasse aérienne et racinaire des plantules de colza dans la première série à un seuil $\alpha = 5$ %, même si cet effet n'a pas pu être mis en évidence dans les deux autres séries.

L'analyse de la composition minérale des échantillons réalisée par ICP-AES (séries 2 et 3) a mis en évidence une augmentation de la teneur en phosphore des parties aérienne de la série 2 et racinaire de la série 3, lors d'une inoculation par la souche YAS34. En outre, la modalité triple inoculation « NFM421/NO9/YAS34 » a stimulé la teneur en soufre dans les parties racinaires dans la troisième série.

L'analyse des résultats de toutes les séries, bien que la variabilité diminue au fil des essais, montre que la puissance de l'essai reste insuffisante pour nous garantir de pouvoir déceler une différence significative si elle existe (risque de deuxième espèce). En outre, les effets significatifs relevés n'ont pas pu être répétés dans les trois séries. Pour augmenter la puissance de l'essai, nous avons choisi de diminuer le nombre de modalités afin d'augmenter les effectifs par traitement au maximum de nos capacités de culture.

Ce dernier essai a permis de mettre en évidence une augmentation du ratio de « masse racinaire/masse partie aérienne ». Ce ratio, délicat à interpréter est, dans notre cas, la conséquence de la diminution (bien que non significative) de la masse de la partie racinaire notée sur cet essai.

4.4 Suivi de l'inoculum par métabarcoding du gène ADNr 16S

Afin de confirmer la présence de notre inoculum au sein de la rhizosphère et d'en évaluer l'impact sur le microbiote du sol agricole non stérilisé, une analyse par métabarcoding du gène ADNr 16S a été réalisée. Cette analyse nous a permis de confirmer le maintien de l'inoculum au sein de la rhizosphère et de mettre en évidence un effet de l'inoculation sur le microbiote du compartiment racinaire (rhizoplan). Grâce à la profondeur du séquençage obtenue, nous avons pu constater la quasi disparition d'une espèce, *Rhodococcus sp.* et, à l'inverse, une augmentation de près de 10 % du genre *Stenotrophomonas*. Il s'agit d'une tendance qui mériterait d'être confirmée en particulier en prenant en compte la résilience possible du phénomène.

4.5 Dialogue moléculaire entre *P. brassicaearum* et les autres souches testées

Le travail réalisé nous a permis de constater l'importance capitale de la compréhension du dialogue moléculaire qui a lieu au sein de la rhizosphère des plantes dans la mise en place des nouvelles pratiques culturales. Nous avons pu confirmer tout d'abord que la capacité de biocontrôle de *P. brassicaearum* NFM421 sur les champignons phytopathogènes *Microdochium nivale*, *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* repose exclusivement sur sa capacité à produire le DAPG. Par la suite, nous avons pu constater que, si la présence des autres souches composant l'inoculum n'a pas d'influence négative sur la capacité de *P. brassicaearum* NFM421 à coloniser le rhizoplan du colza, elle a, en revanche, un effet très important sur sa capacité à produire du DAPG et ce, malgré le fait que les souches compétitrices représentent moins de 20 % du microbiote sur le rhizoplan. De même, nous avons pu constater qu'en plus du dialogue moléculaire entre les souches bactériennes du rhizoplan, un facteur extérieur, tel que la disponibilité du fer dans le milieu de culture peut avoir des conséquences très significatives sur la capacité phytobénéfique de la souche NFM421 en coinoculation. Une étude approfondie portant notamment sur la capacité de la souche NFM421 à produire et à recruter des sidérophores pourrait nous apporter un élément de réponse qui nous permettrait de comprendre les écarts de production du DAPG en présence de la souche *K. sacchari* NO9.

4.6 Conditions suboptimales et notion de facteur limitant

La pérennité d'une exploitation agricole réside en sa capacité à obtenir en fin d'exercice annuel une marge nette suffisante pour permettre la rémunération de l'exploitant, l'exercice de l'année suivante et les investissements nécessaires à l'amélioration continue de cet exercice. Cette marge est la part restante, une fois retranché au prix de la vente de la production (incluant les diverses aides reçues), le coût de production qui prend en compte les frais liés aux intrants, à l'entretien des équipements, à la rémunération des personnel etc. (Berrodier, 2012)⁸. Les variations climatiques, l'irrégularité des pressions parasitaires et pathogènes exercées sur les cultures, ainsi que la fluctuation des prix à la vente des productions agricoles, nécessitent une veille permanente afin de limiter au maximum le coût de production. Un exemple de ces fluctuations est donné pour le colza dans la figure 3.59.

⁸ Berrodier, M (2012). Résultats économiques du réseau TTSI Comparaison avec le labour. Colloque de restitution du 28 septembre 2010 à Ondes, ARVALIS – Institut du végétal disponible à <http://www.mp.chambagri.fr/IMG/pdf/11-Economie.pdf>

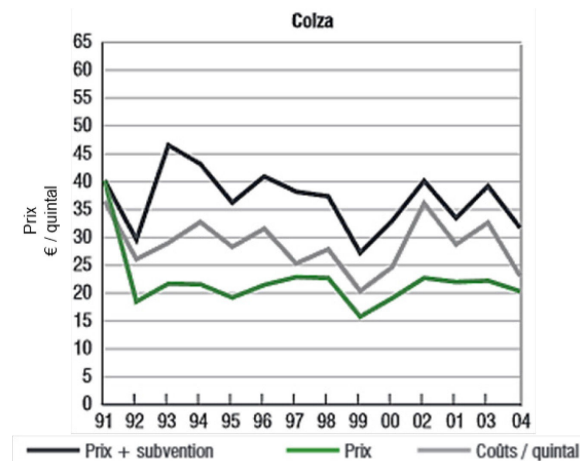


Figure 3.49 : Evolution des prix de production (avec et sans subvention) et des coûts unitaires du colza entre 1991 et 2004. (D'après Desbois et Legris, 2007⁹).

Il apparaît qu'entre 1991 et 2004, le coût de production est supérieur au prix du colza sur le marché. Seules les subventions accordées aux agriculteurs leur ont permis de dégager une marge. Cette marge est donc le fruit d'un compromis réalisé entre le rendement (quintaux par hectare) et le coût de production nécessaire pour y parvenir. Ce compromis place donc obligatoirement les cultures dans des conditions suboptimales ; des conditions optimales seraient trop onéreuses pour un gain de rendement trop faible pour générer un bénéfice. Dans l'optique de l'amélioration des pratiques culturales, la diminution programmée des intrants tendra probablement à éloigner davantage les conditions de culture de cet optimum. Ce sont donc dans ces conditions que les inoculums microbiens (biointrants) pourraient exprimer leur effet.

Afin de nous placer dans de telles conditions, plusieurs conditions limitantes sont possibles. Dans nos régions, l'un des premiers facteurs limitants est, après l'alimentation hydrique, la nutrition des plantes et plus précisément la nutrition azotée. Compte tenu des analyses réalisées sur notre sol de référence, nous avons choisi de limiter la nutrition de la plante par irrigation avec une solution nutritive diluée à 0,5X. Mais nos expériences ayant été conduites sur un pas de temps court (quelques semaines), il se peut que ce stress n'ait pas été suffisamment impactant, ne permettant pas de mettre en évidence un effet de l'inoculum qui aurait pu être mis en évidence quand un ou des facteur(s) limitant(s) s'expriment.

D'autres sources de stress sont habituellement rencontrées dans nos régions. Du fait de la polyvalence d'activité phytobénéfique de l'inoculum, nous aurions pu choisir de tester l'effet de notre inoculum, plus particulièrement l'effet de *R. alamii* YAS34, dans un contexte de stress hydrique. En effet, de par sa production d'EPS et son effet potentiel sur la micro-structuration du sol (Alami *et al.*, 2000), l'alimentation hydrique du colza aurait pu représenter un objectif nous permettant de valider l'effet de nos souches sur la plante. Cependant, d'après les constatations réalisées sur le terrain, le colza ne semble se montrer sensible à la sécheresse qu'à la germination et

⁹ Desbois, D. et Legris, B. (2007) L'agriculture française et l'Europe – L'agriculture, nouveaux défis – édition 2007, Insee : Institut national de la statistique et des études économiques disponible à http://www.insee.fr/fr/ffc/docs_ffc/ref/agrifra07f.pdf

après floraison dans sa phase de formation du grain. Selon le site « terresinovia.fr¹⁰ », en cas de stress hydrique, une irrigation réalisée autour de la formation des siliques pourrait faire gagner en rendement (environ 8 qx/ha) et en teneur en huile (1,5 à 2 points d'huile de plus). Ce type de stress est incompatible avec le dispositif expérimental que nous avons choisi, en raison de la durée des cultures nécessaires pour pouvoir apprécier son effet qualitatif et quantitatif sur le rendement (environ 11 mois, figure 3.60).

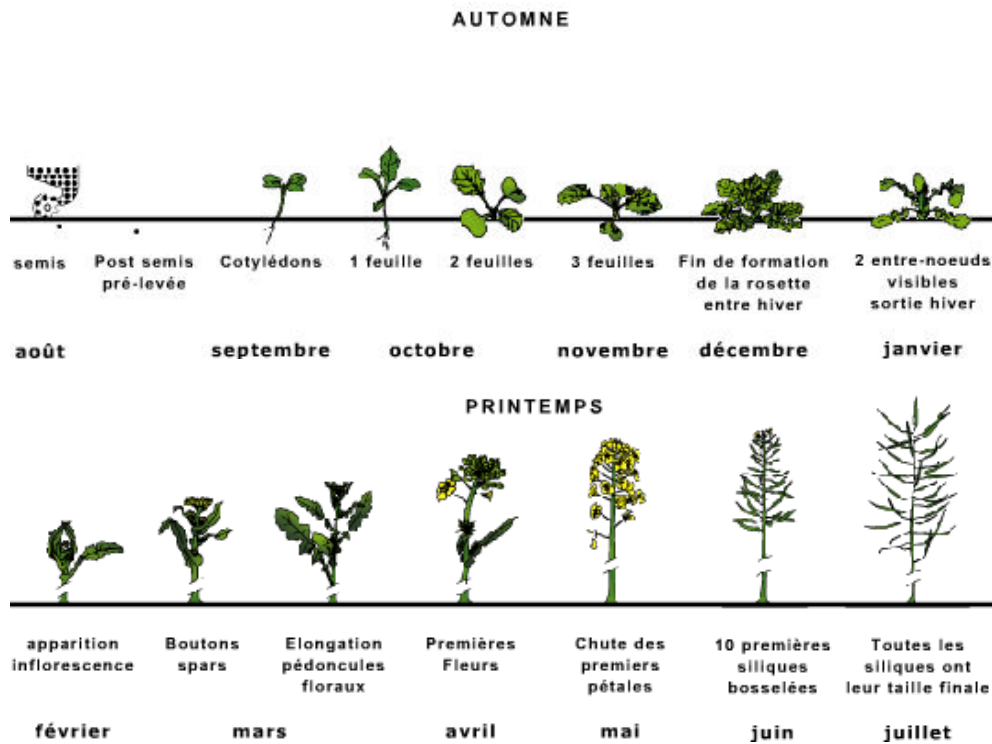


Figure 3.50 : Cycle de développement du colza (D'après PROLEA¹¹).

Enfin le troisième type de facteur limitant la croissance des plantes est l'ensemble des facteurs biotiques (pathogènes, agresseurs) et abiotiques affectant la santé des plantes. Nous aurions pu tester ainsi la capacité de notre inoculum, particulièrement de *P. brassicacearum* NFM421, à stimuler les défenses des plantes. Il semble que le pathogène le plus préjudiciable économiquement pour le colza est *Sclerotinia sclerotiorum* causant des pertes pouvant aller jusqu'à 10 qx/ha. La lutte biologique contre ce pathogène prend tout son sens puisqu'il n'existe aucune variété résistante à ce jour contre ce champignon. Son contrôle n'est possible que par l'usage de produits phytopharmaceutiques. Cependant l'attaque de ce pathogène intervient à floraison, la chute des pétales étant le facteur déclenchant l'infestation. De même que précédemment, il aurait fallu redimensionner nos conditions expérimentales pour pouvoir procéder à ces tests en diminuant leur nombre pour les allonger dans la durée.

¹⁰ <http://www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/irrigation/print.pdf?print=1> et <http://www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/accidents-climatiques/manque-exces-deau/print.pdf?print=1>

¹¹ <http://www.prolea.com/index.php?id=1477>

De la notion de « terroir » vers une approche réciproque et complémentaire

Les plantes exercent une puissante influence physique, chimique et biologique sur le sol autour des racines (rhizosphère) permettant la sélection de certaines communautés microbiennes au détriment d'autres (Tkacz *et al.*, 2015). Le microbiote ainsi formé se nourrit de la très forte richesse des exsudats racinaires et, en contre partie, confère à la plante un environnement favorable nécessaire à son bien-être pouvant même aller, nous l'avons vu précédemment, jusqu'à stimuler directement ou indirectement la croissance de celle-ci. Le deuxième facteur influençant la structure de ces communautés est le type de sol sur lequel l'hôte végétal s'est installé (Berg and Smalla, 2009). En effet, le sol héberge les espèces microbiennes capables de coloniser les plantes, et en particulier leurs racines. Un certain nombre de paramètres ont pu être identifiés comme ayant une influence sur la diversité microbienne comme le pH (Fierer and Jackson, 2006) ou encore l'âge du sol (Tarlora *et al.*, 2008, plus de détails sur la datation des sols cf. Trumbore, 2000).

Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi une stratégie visant à proposer au colza un inoculum composé d'espèces bactériennes sélectionnées pour leurs propriétés phytobénéfiques, mais qui n'avaient pas été isolées de la rhizosphère du colza et encore moins du sol dans lequel les expériences ont été réalisées. Ce travail pourrait se voir compléter par une approche réciproque visant à caractériser le microbiote naturellement associé au colza en culture afin d'en sélectionner les souches candidates les plus intéressantes agronomiquement et, dans le cadre d'une approche similaire à ce travail de thèse, en augmenter leur proportion sur le rhizoplan et dans la rhizosphère.

Le colza étant cultivé dans de nombreuses régions de par le monde, il paraît difficile de pouvoir désigner une zone géographique comme étant représentative du terroir colza. En France par exemple, le colza est majoritairement cultivé sur la moitié nord du territoire. La partie « A » de la figure 3.61 nous permet d'apprécier la diversité de composition des sols français ainsi qu'en partie « B », les assolements colza en France en 2013.

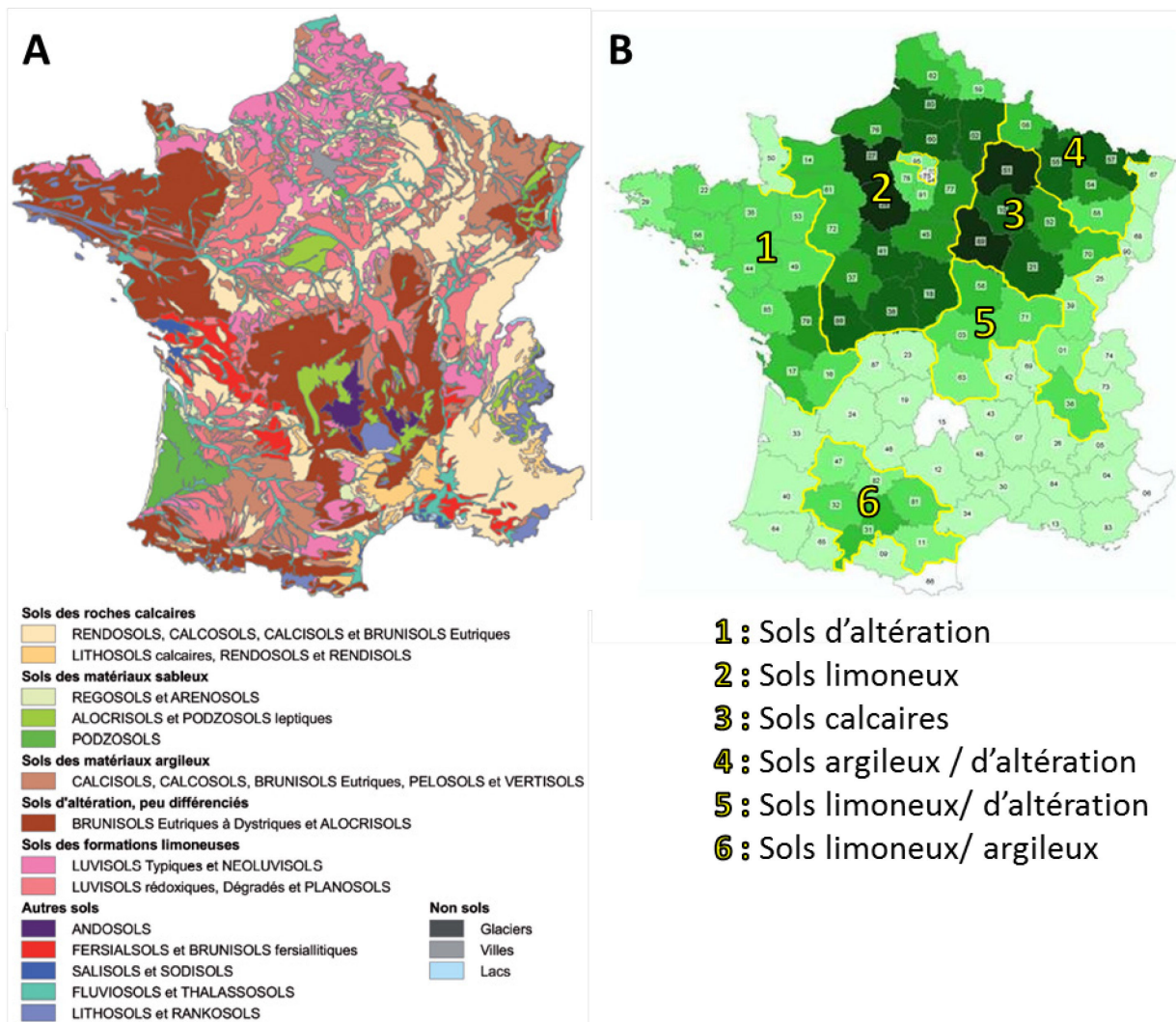


Figure 3.51 : A) Carte de répartition des sols de France (d'après Gis Sol¹²). B) Carte des assolements colza en France en 2013 (d'après Cetiom¹³).

Si nous essayons d'associer un type de sol aux différentes zones de cultures françaises, 6 zones distinctes semblent ressortir. Nous pourrions alors considérer ces zones comme potentiellement représentatives de la diversité pédo-climatique associée au colza en France et procéder à un échantillonnage du sol en vue de réaliser une analyse du microbiote par métabarcoding de l'ADNr 16S. Du fait de la spécificité de structure du génotype du colza et de son court historique de sélection, il se pourrait que sa capacité génétique à recruter des microorganismes bénéfiques soit amoindrie face à ses ancêtres. Un travail analogue réalisé sur le chou (*B. oleracea*) et la navette (*B. rapa*) pourrait compléter cette étude afin de donner une image la plus large possible du microbiote potentiellement associé à cette espèce.

Il restera alors à identifier parmi ces souches celles dont le potentiel phytobénéfique est connu ou supposé. Une étude bibliographique des données recueillies ainsi que la mise au point de différents tests de criblages (analogues à ceux présentés dans cette étude) pourrait permettre de comprendre

¹² <http://www.gissol.fr/donnees/cartes/les-sols-dominants-de-france-metropolitaine-1491>

¹³ <http://www.terre-net.fr/observatoire-technique-culturelle/strategie-technique-culturelle/article/maintien-des-surfaces-a-un-haut-niveau-et-redistribution-regionale-217-96669.html>

l'intérêt pour la plante des souches les plus fréquemment retrouvées et envisager de composer un inoculum à partir de celles-ci pour augmenter la taille de leur population au sein de la rhizosphère et à la surface des racines (rhizoplan).

BIBLIOGRAPHIE

5 Bibliographie

- Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Martel, M. H., Heulin, T. (1999). *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 (2) : 787–794.
- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., Heulin, T. (2004). Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Molecular plant-microbe interactions* : 17 (8) : 872 – 879.
- Achouak, W., Conrod, S., Robert, S., Heulin, T. (2003). Phase variable effects of *Pseudomonas brassicacearum* on *Arabidopsis thaliana* root architecture, p 359 – 363 dans Tikhonovich, I., Lugtenberg, B., Provorov, N., (eds.), *Biology and molecular plant-microbe interactions*, vol 4 International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN.
- Achouak, W., Heulin, T., Villemin, G., Balandreau J. (1994) Root colonization by symplasmata-forming *Enterobacter agglomerans*. *Federation of European microbiological societies Microbiology Ecology* 13 (4) : 287 – 294.
- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R., Gardan, L. (2000). *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 (1) : 9 – 18.
- Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163 (2) : 173-181.
- Ahmad, M., Zahir, A.Z., Asghar, H N., Asghar, M. (2011). Inducing salt tolerance in mung bean through co-inoculation with rhizobia and plant-growthpromoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology* 57 (7) : 578-589.
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T. (2000). Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied and environmental microbiology* 66 (8) : 3393 – 3398.
- Alami, Y., de Baynast, R., Heulin, T., Heyraud, A., Milas, M., Villain, A. (1998). Polysaccharide, microorganism and method for obtaining same, composition containing it and application (EPS de la souche *Rhizobium alamii* YAS34). Brevet CNRS-ARD FR 2759377. Brevet européen en 1999 (EP 0960132).
- Alavi, P., Starcher, M.R., Zachow C., Müller, H., Berg, G. (2013). Root-microbe systems : the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405. *Frontiers in plant science* 4 : 141.
- Almerio, J., Prigent-Combaret, C., Muller, D., Moënné-Loccoz, Y. (2013). Effect of clay mineralogy on iron bioavailability and rhizosphere transcription of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in biocontrol *Pseudomonas protegens*. *Molecular plant-microbe interactions* 26 (5) : 566 – 574.

- Araújo, W. L., Maccheroni, W. Jr., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O., Azevedo, J. L. (2001).** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian journal of microbiology* 47 (3) : 229 – 236.
- Armagnac (D'), B. (2010, 11 janvier).** Des experts redoutent une pénurie de phosphates d'ici à la fin du siècle. Repéré à http://www.lemonde.fr/planete/article/2010/01/11/des-experts-redoutent-une-penurie-de-phosphates-d-ici-a-la-fin-du-siecle_1290058_3244.html.
- Arshad, M. and Frankenberger, W.T. (1991).** Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil* 133 (1) : 1-8.
- Asis, C.A. Jr. and Adachi, K. (2004).** Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Letters in applied microbiology* 38 (1) : 19 – 23.
- Aznar, A. and Dellagi, A. (2015).** New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*, Vol. 66 (11) : 3001–3010.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57 : 233–266.
- Bangera, M.G. & Thomashow, L.S. (1999).** Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology* 181 (10) : 3155 – 3163.
- Barazani, O. and Friedman, J. (1999).** Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* 25 (10) : 2397- 2406.
- Barrat, J. A., Gillet, P., Lécuyer, C., Sheppard, S. M., Lesourd, M. (1998)** Formation of carbonates in the Tatahouine meteorite. *Science* 280 (5362) : 412 – 414.
- Beare, J. L., Gregory, E. R., Campbell, J. A. (1959).** The effects of different varieties of rapeseed oil on weight gain, and of golden rapeseed oil on reproduction, of the rat. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (10) : 1191 – 1195.
- Benzerara, K., Barakat, M., Menguy, N., Guyot, F., De Luca, G., Audrain, C., Heulin, T. (2004a).** Experimental colonization and alteration of orthopyroxene by the pleomorphic bacteria *RamLibacter tataouinensis*. *Geomicrobiology Journal* 21 : 341 – 349.
- Benzerara, K., Menguy, N., Guyot, F., Dominici, C., Gillet, P. (2003).** Nanobacteria-like calcite single crystals at the surface of the Tataouine meteorite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13) : 7438 – 7442.
- Benzerara, K., Nicolas Menguy, N., Guyot, F., Skouria, F., De Luca, G., Barakat, M., Heulin, T. (2004b).** Biologically controlled precipitation of calcium phosphate by *RamLibacter tataouinensis*. *Earth and Planetary Science Letters* 228 (3 – 4) : 439 – 449.

- Berg, G.** (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology* 84(1) : 11 – 18.
- Berg, G. and Smalla, K.** (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology* 68 (1): 1 – 13.
- Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A.** (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental microbiology* 7 (11) : 1673 – 1685.
- Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santaella, C., Roncato, M. A., Christen, R., Heulin, T., Achouak, W.** (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *International journal of systemic and evolutionary microbiology* 59 (2) : 367 – 372.
- Bertrand, J. C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P.** (2011). *Ecologie microbienne : Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Pau, France : Presses universitaires de Pau et des pays de l'Adour.
- Blumer, C. & Haas, D.** (2000). Iron regulation of the hcnABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology* 146 (10) : 2417 – 2424.
- Bonaterra, A., Mari, M., Casalini, L., Montesinos, E.** (2003) Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International journal of food microbiology* 84 (1) : 93 – 104.
- Bonneuil, C., Thomas, F.** (2009) Gènes, pouvoirs et profits: recherche publique et régimes de production des savoirs de Mendel aux OGM. (1^{ère} ed., p246 – 255). Versailles, France : INRA (Quae).
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., De Vos, P.** (2013) Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and applied microbiology* 36 (5) : 309 – 319.
- Brandt, U., Hiessl, S., Schuldes, J., Thürmer, A., Wübbeler, J.H., Daniel, R., Steinbüchel, A.** (2014). Genome-guided insights into the versatile metabolic capabilities of the mercaptosuccinate-utilizing β -proteobacterium *Variovorax paradoxus* strain B4. *Environmental Microbiology* 16 (11) : 3370 – 3386.

- Brésin, A., Rinaudo, M., Heyraud, A., Santaella, C., De Baynast, R., Heulin, T. (2008).** Production industrielle d'un polysaccharide bactérien luttant contre le stress hydrique. Techniques de l'Ingénieur IN104, novembre 2008.
- Brock, A. K., Berger, B., Mewis, I., Ruppel, S. (2013)** Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on growth, glucosinolate profile, and immune responses of *Arabidopsis thaliana*. *Microbial Ecology* 65 (3) : 661 – 670.
- Bronstein, J.L. (2001).** The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters* 4 (3) : 277 – 287.
- Brundtland, G.H. (1987).** Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future (Annexe au rapport A/42/427). Organisation des Nations Unies.
- Cabidoche, Y.M., Guillaume, P., Hartmann, C., Ruy, S., Blanchart, E., Albrecht, A., Mahieu, M., Achouak, W., Heulin, T., Villemin, G., Watteau, F., Bellier, G. (2000).** Déterminants biologiques du système poral des vertisols cultivés des Petites Antilles. Conséquences sur la disponibilité de l'eau des sols pour les plantes. *Étude et Gestion des Sols* 7 (4) : 329 – 352.
- Carpentier, M. (2013)** Sole colza : Maintien des surfaces à un haut niveau et redistribution régionale. Repéré à : <http://www.terre-net.fr/observatoire-technique-culturelle/strategie-technique-culturelle/article/maintien-des-surfaces-a-un-haut-niveau-et-redistribution-regionale-217-96669.html>
- Carvalho (de), C. C. C. R. and Fonseca (da), M. M. R. (2005).** The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 : 715 – 726.
- Chabeaud, P., de Groot, A., Bitter, W., Tommassen, J., Heulin, T., Achouak, W. (2001)** Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *Journal of bacteriology* 183 (6) : 2117 – 2120.
- Chen, L., Dodd, I.C., Theobald, J.C., Belimov, A.A., Davies, W.J. (2013).** The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *Journal of Experimental Botany* 64 (6) : 1565 – 1573.
- Coudurier, B., Georget, M., Guyomard, H., Huyghe, C., Jean-Louis Peyraud (sous la direction de) (2013).** Vers des agricultures à hautes performances. Volume 4. Analyse des voies de progrès en agriculture conventionnelle par orientation productive. Inra. 484 pages.
- Dangl, J. L., Jones, J. D. G. (2001)** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411 (6839) : 826 – 833.
- Delvasto, P., Ballester, A., Muñoz J.A., González, F., Blázquez, M.L., Igual, J.M., Valverde, A., García-Balboa, C. (2009)** Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium *Burkholderia caribensis* FeGL03. *Minerals Engineering* 22 (1) : 1 – 9.
- Doré, C. et Varoquaux, F. (2006).** Le colza. Dans histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées (1^{ère} ed., p. 255 – 280). Paris, France : INRA (Savoir-faire).

- Duan, J., Yi, T., Lu, Z., Shen, D., Feng, Y. (2007). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 forms multicellular symplasmata via cell aggregation. *Federation of European microbiological societies Microbiology Letters* 270 (2) : 220 – 226.
- Fardeau, J.C., Morel, C., Boniface, R. (1988) Pourquoi choisir la méthode Olsen pour estimer le phosphore "assimilable" des sols ? *Agronomie, ADP Sciences* 8 (7) : 577 – 584.
- Fierer, N., Jackson, R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (3) : 626 – 631.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. X., Barea, J.M. (2010). Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 45 (3), 209 – 217.
- Gerke, J. (2015) Phytate (Inositol Hexakisphosphate) in Soil and Phosphate Acquisition from Inositol Phosphates by Higher Plants. A Review. *Plants (Basel)* 4 (2) : 253 – 266.
- Gherardi, G., Creti, R., Pompilio, A., Di Bonaventura, G. (2015). An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 81 (3) : 219 – 226.
- Gillet, P., Barrat, J.A., Heulin, T., Achouak, W., Lesourd, M., Guyot, F., Benzerara, K. (2000) Bacteria in the Tatahouine meteorite: nanometric-scale life in rocks. *Earth and planetary science letters* 175 (3-4) : 161 – 167.
- Goethals, K., Vereecke, D., Jaziri, M., Van Montagu, M., Holsters, M. (2001). Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annual Review of Phytopathology* 39 : 27 – 52.
- Goldstein, A.H, Rogers, R.D., Mead, G. (1993) Mining by microbe – Separating phosphate from ores via bioprocessing. *Nature Biotechnology* 13 : 773 – 778.
- Goldstein, A.H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphate by Gram-negative bacteria. In: *Phosphate in microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, A. Torriani Gorini; E. Yagil and S. Silver (Eds.), 197-203, Washington.
- Goldstein A.H. (1995) Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria, dans *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver, Eds., pp. 197–203, ASM Press, Washington, DC, USA.
- Gomez-Acevedo, S., Rico-Arce, L., Delgado-Salinas, A., Magallón, S., Eguiarte, L.E. (2010). Neotropical mutualism between *Acacia* and *Pseudomyrmex*: Phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56 (1) : 393–408.
- Gunasinghe, R.N., Ikiriwatte, C.J., Karunaratne, A.M. (2004). The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium sp* to control banana pathogens. *Journal of horticultural science and biotechnology* 79 (6) : 1002 – 1006.
- Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L.J., Poole, P.S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil* 245 (1) : 83 – 93.

- Haichar, F.Z., Roncato M.A., Achouak, W. (2012). Stable isotope probing of bacterial community structure and gene expression in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *FEMS microbiology ecology* 81 (2) : 291 – 302.
- Haichar, F.Z., Santaella, C., Heulin, T., Achouak, W. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* 77 : 69 – 80.
- Han, J.I., Choi, H.K., Lee, S.W., Orwin, P.M., Kim, J., LaRoe, S.L., Kim, T., O'Neil, J., Leadbetter, J.R., Lee, S.Y., Hur, C.G., Spain, J.C., Ovchinnikova, G., Goodwin, L., Han, C. (2011). Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110. *Journal of Bacteriology* 193 (5) : 1183 – 1190.
- Herath, S., Lewis, C., Nisbet, M. (2013). Increasing awareness of *Rhodococcus equi* pulmonary infection in the immunocompetent adult: a rare infection with poor prognosis. *The New-Zealand medical journal* 126 (1387) : 165-174.
- Herring, J.R., Fantel, R.J. (1993). Phosphate rock demand into the next century: Impact on world food supply. *Natural Resources Research* 2 (3) : 226 – 246.
- Heulin, T., Barakat, M., Christen, R., Lesourd, M., Sutra, L., De Luca, G., Achouak, W. (2003). *RamLibacter tataouinensis gen. nov., sp.nov.*, and *RamLibacter henchirensis sp. nov.*, cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (2) : 589–594.
- Hiltner L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brachte, *Arb dt Landwges* 98 : 59-78.
- Hsieh, T. F., Huang, H. C., Erickson, R. S. (2005). Biological Control of Bacterial Wilt of Bean Using a Bacterial Endophyte, *Pantoea agglomerans*. *Journal of phytopathology* 153 (10) : 608 – 614.
- Illmer, P., and Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates – Solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27 (3) : 257 – 263.
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y. (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science* 64 (1) : 48 – 59.
- Jaradata, M. R., Rueggerb, M., Bowlingb, A., Butlerb, H., Cutlera, A. J (2014) A comprehensive transcriptome analysis of silique development and dehiscence in *Arabidopsis* and *Brassica* integrating genotypic, interspecies and developmental comparisons *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 5 (4) 302 – 320.
- Job, D. (2002) Plant biotechnology in agriculture. *Biochimie* 84 (11) 1105 – 1110.
- Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G., Rajkumar, S. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology* 160 (4) : 778 – 788.
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444 (7117) : 232 – 329.

- Josefsson, E., Munck, L. (1972) Influence of glucosinolates and a tentative high-molecular detrimental Factor on the nutritional value of rapeseed meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 23 (7) 861 – 869.
- Kämpfer, P., Ruppel, S., Remus, R. (2005) *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Systematic and applied microbiology* 28 (3) : 213 – 221.
- Kay, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology* 187 (5) : 351 – 360.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar M.S., Naqvi, S.M.S, Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of agriculture and biological sciences* 1 (1) : 48 – 58.
- Khan, M.S., Zaidi, A, Wani, P.A. (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development* 27 (1) : 29-43.
- Kibbe, W.A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research* 35 (Webserver issue) : W43-6.
- Klarzynski, O., Fritig, B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324 (10) : 953 – 963.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286 : 885-886.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7 (2) : 39-44.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. 2nd, Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166 (1) : 175-176.
- Kuiper, I., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. (2001). Selection of a Plant-Bacterium Pair as a Novel Tool for Rhizostimulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 14 (10) : 1197-1205.
- Lacroix, A. (1931). Sur la chute récente (27 juin 1931) d'une météorite asidérite dans l'extrême Sud Tunisien. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 193 : 305 – 309.
- Lalaouna, D., Fochesato, S., Sanchez, L., Schmitt-Kopplin, P., Haas, D., Heulin, T., Achouak, W. (2012). Phenotypic switching in *Pseudomonas brassicacearum* involves GacS- and GacA-dependent Rsm small RNAs. *Applied and environmental microbiology* 78 (6) : 1658 – 1665.
- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C., Haas, D. (1998). Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology* 180 (12) : 3187 – 3196.

- Leadbetter, J.R. and Greenberg, E.P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* 182 (24) : 6921 – 6926.
- Lebuhn, M., Heulin, T., Hartmann, A. (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* 22 (4) : 325 – 334.
- Lichtenthaler, H.K. (1998). The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New-York Academy of Sciences* 30 (851) : 187-198.
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404 (6779) : 766 – 770.
- Lindsay, W. L., and Schwab, A. P. (1982). The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition*, 5 (4-7) : 821 – 840.
- Liu, Z.H., Cao, Y.M., Zhou, Q.W., Guo, K., Ge, F., Hou, J.Y., Hu, S.Y., Yuan, S., Dai, Y.J. (2013). Acrylamide biodegradation ability and plant growth-promoting properties of *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969. *Biodegradation* 24 (6) : 855–864.
- Loria, R., Kers, J., Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual review of phytopathology* 44 : 469 – 487.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63 : 541–56.
- Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V. (2002) Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81 (1-4) : 373–383.
- Markets and Markets** (2014). *Agricultural Inoculants Market by Type (PGPMs, Bio-Control Agents, & Plant Resistance Stimulants), Source (Bacterial & Fungal), Mode of Application, Crop Type, & Geography - Global Trends & Forecasts to 2019*. Markets and markets, Dallas, Texas, USA.
- Marschner, P., Crowley, D., Rengel, Z.** (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (5) : 883 – 894.
- Matthysse, A.G., Stretton, S., Dandie, C., McClure, N.C., Goodman, A.E.** (1996) Construction of GFP vectors for use in Gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 145 (1) : 87 – 94.
- Mayo, R., Mosco, S., Schmidhuber, J., Choptiany, J., Batello, C., Campanhola C.** (2015) World fertilizer trends and outlook to 2018, FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations. Repéré à <http://www.lafranceagricole.fr/var/gfa/storage/fichiers-pdf/Docs/2014/FAO-engrais.pdf>
- Meadows, D., Jorgen, R., Meadows, D.** Limits to growth : the 30-years update, White River Junction, Vermont, USA, Chelsea Green Publishing Compagny, 2004, 338 p.

- Meyer, S.L., Halbrecht, J.M., Carta, L.K., Skantar, A.M., Liu, T., Abdelnabby, H.M., Vinyard, B.T. (2009).** Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to plant-parasitic and bacterial-feeding nematodes. *Journal of nematology* 41 (4) : 274 – 280.
- Mollier, P. (2014)** Sélection classique ou participative, plusieurs stratégies pour les blés bios : 3. Variétés populations : privilégier l'adaptabilité. Repéré à <http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Systemes-agricoles/Tous-les-dossiers/Selection-classique-ou-participative-plusieurs-strategies-pour-les-bles-bios/Varietes-populations-privilegier-l-adaptabilite/%28key%29/1>.
- Nadeau, J. H. (1989)** Maps of linkage and synteny homologies between mouse and man. *Trends in Genetics* 5 (3) :82 – 86.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B. F., Dangl, J. L. (2003).** Recognition and response in the plant immune system. *Annual review of genetics* 37: 579 – 609.
- Oberhänsli, T., Dfago, G., Haas, D. (1991).** Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of general microbiology* 137 (10) : 2273 – 2279.
- Omar, A.M.N. (1987).** Fixation d'azote dans la rhizosphère du riz : sélection d'une souche in vitro et effet de son inoculation dans trois rizières d'Egypte. Thèse de Doctorat, Université de Nancy.
- Omar, A.M.N., Richard, C., Weinhard, P., Balandreau, J. (1989).** Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. *Biology and Fertility of Soils* 7 (2) : 158-163.
- Omar, A.M.N., Weinhard, P., Heulin, T., Alaa El Din, M.N., Balandreau, J. (1987).** Inoculation du riz par des bactéries fixatrices d'azote. Sélection in vitro des génotypes à associer au champs. *Compte Rendus de l'Academis des Sciences – Série III – Life Sciences* 305 : 247 – 250.
- Oren, A., Garrity, G.M. (2015).** List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation List no. 164. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (7), 2017 – 2025.
- Osmond, C.B., Austin, M.P., Berry, J.A., Billings, W.D., Boyer, J.S., Dacey, J.W.H., Nobel, P.S., Smith, S.D., Winner, W.E., (1987).** Stress physiology and the distribution of plants. *BioScience* 37 (1) : 38-48.
- Papas, A., Ingalls, J. R., Campbell L. D. (1979).** Studies on the effects of rapeseed meal on thyroid status of cattle, glucosinolate and iodine content of milk and other parameters. *The journal of nutrition* 109 (7) : 1129 – 1139.
- Paracer, S., Ahmadjian, V. (2000).** Symbiosis: an introduction to biological associations. Oxford University Press, 291 p.
- Parra-Cota, F.I., Peña-Cabriales, J.J., de Los Santos-Villalobos, S., Martínez-Gallardo, N.A., Délano-Frier, J.P. (2014).** *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. *PLoS One* 9 (2) : e88094.

- Parkin, I. A. P., Lydiate, D. J., Trick, M. (2002). Assessing the level of collinearity between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* for *A. thaliana* chromosome 5. *Genome* 45 (2) : 356 – 366.
- Passarge, E., Horsthemke, B., Farber, R.A. (1999). Incorrect use of the term synteny. *Nature genetics* 23 (4) : 387.
- Philippeau, G., (1984). Puissance d'une expérience : nombre de répétitions nécessaires pour comparer deux ou plusieurs traitements. Paris : Institut Technique des Céréales et des Fourrages, 20p. ISBN : 2-86-492-009-3.
- Phillips, D.A., Fox, T.C., King, M.D., Bhuvaneswari, T.V., Teuber, L.R. (2004). Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant physiology* 136 (1) : 2887 – 2894.
- Pierik, R., Tholen, T., Poorter, H., Visser, E. J. W., Voeseek, L. A. C. J. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science* 11 (4) : 176 – 183.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5 (5) : 308 – 316.
- Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17 : 362 – 370.
- Premono, E. M., Moawad, M. A., Vlek, P. L. G. (1996) Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas Putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian journal of crop science* 11 : 13 – 23.
- Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P. T., Mondin, M., Azevedo, J. L., Pizzirani-Kleiner, A. A. (2012) Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and environmental microbiology* 78 (21) : 7511 – 7518.
- Ramette, A., Frapolli, M., Defago, M., Moënne-Loccoz, G. (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16 (6) : 525-535.
- Richardson, D.M., Allsopp, N., D'Antonio, C.M., Milton, S.J., Rejmanek, M. (2000). Plant invasions : the role of mutualisms. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 75 (1) : 65-93.
- Ringeval, B., Hinsinger, P., Pellerin, S. (2015) Le phosphore : une ressource limitée et un enjeu planétaire pour l'agriculture du 21ème siècle. Repéré à <http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Systemes-agricoles/Toutes-les-actualites/Le-phosphore-une-ressource-limitee-et-un-enjeu-planetaire-pour-l-agriculture-du-21eme-siecle>
- Rocquelin, G., Cluzan, R., Boccon, D. (1968). L'huile de colza riche en acide érucique et l'huile de colza sans acide érucique : valeur nutritionnelle et effets physiologiques chez le rat. I. – Effets sur la croissance, l'efficacité alimentaire et l'état de différents organes. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* 8 (3) : 395 – 406.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17 (4-5) : 319–339.

- Rosa (La), R., Nogales, J., Rojo, F. (2015) The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology* 17 (9) : 3362 – 3378.
- Ross, I.L., Alami, Y., Harvey, P.R., Achouak, W., Ryder, M.H. (2000). Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related pseudomonads isolated from wheat field soils in South Australia. *Applied and environmental microbiology* 66 (4) : 1609 – 1616.
- Ruppel, S., Hecht-Buchholz, C., Remus, R., Ortmann, U., Schmelzer, R. (1992) Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil* 145 (2) 261 – 273.
- Ruppel, S., Rühlmann, J., Merbach, W. (2006). Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. *Plant and soil* 286 (1-2) : 21 – 35.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van der Lelie, D., Dow, M.J. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7 : 514 – 525.
- Sageret, A. (1826). Considérations sur la production des hybrides, des variantes et des variétés en général et sur celles de la famille des Cucurbitacées en particulier. *Annales des Sciences naturelles* 1 (8) : 294 – 314.
- Santaella, C., Schue, M., Berge, O., Heulin, T., Achouak, W. (2008) The exopolysaccharide of *Rhizobium sp.* YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environmental Microbiology* 10 (8) : 2150 – 2163.
- Satola, B., Wübbeler, J.H., Steinbüchel, A. (2013). Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 : 541 – 560.
- Satsuma, K. (2010). Mineralisation of the herbicide linuron by *Variovorax sp.* strain RA8 isolated from Japanese river sediment using an ecosystem model (microcosm). *Pest Management Science* 66 (8) : 847 – 852.
- Sawana, A., Adeolu, M., Gupta, R.S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in genetics* 5 : 429.
- Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., Reimann, C., Notz, R., Défago, G., Haas, D., Keel, C. (2000). Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *Journal of bacteriology* 182 (5) : 1215 – 1225.
- Scholz-Seidel, C., Ruppel, S. (1992). Nitrogenase- and phytohormone activities of *Pantoea agglomerans* in culture and their reflection in combination with wheat plants. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 147 (5) : 319 – 328.

- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138 : 32.
- Sharma, B.S., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2 : 587.
- Shreiner, M., Krumbein, A., Ruppel, S. (2009) Interaction between Plants and Bacteria: Glucosinolates and Phyllospheric Colonization of Cruciferous Vegetables by *Enterobacter radicincitans* DSM 16656. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 17 (3) : 124 – 135.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *Federation of European microbiological societies Microbiology Reviews* 24 (4) : 487-506.
- Stes, E., Francis, I., Pertry, I., Dolzblasz, A., Depuydt, S., Vereecke, D. (2013). The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians*. *Federation of European Microbiology Societies microbiology letters* 342 (2) : 187-194.
- Stes, E., Vandeputte, O.M., El Jaziri, M., Holsters, M., Vereecke, D. (2011). A Successful Bacterial Coup d'État : How *Rhodococcus fascians* Redirects Plant Development. *The Annual Review of Phytopathology* 49 : 69-86.
- Stevenson, F.J., Cole, M.A. (1986) *Cycles of Soil Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur Micronutrients*. Wiley New York.
- Tarlera, S., Jangid, K., Ivester, A.H., Whitman, W.B., Williams, M.A. (2008). Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *FEMS microbiology ecology* 64 (1) : 129 – 140.
- Thomasson, H. J., Boldingh, J. (1955). The biological value of oils and fats. II. The growth-retarding substance in rapeseed oil. *The journal of nutrition* 56 (4) : 469 – 477.
- Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A., Poole, P.S. (2015). Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *The ISME journal* 9 (11) : 2349 – 2359.
- Trumbore, S. (2000). Age of soil organic matter and soil respiration: radiocarbon constraints on belowground C dynamics. *Ecological Applications* 10 (2) : 399 – 411.
- Vallad, G. E., Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science Society of America* 44 : 1920 – 1934.
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Achouak, W., Heulin, T. (2001). Structural analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71. *Carbohydrate research* 334 (2) : 127 – 133.
- Vázquez-Boland, J.A., Giguère, S., Hapeshi, A., MacArthur, I., Anastasi, E., Valero-Rello, A. (2013). *Rhodococcus equi*: the many facets of a pathogenic actinomycete. *Veterinary Microbiology* 167 (1-2) : 9 – 33.

Vig, A.C. and Dev, G. (1984) Phosphorus adsorption characteristics of some acid and alkaline soils. *Journal of the Indian Society of Soil. Science* 32 (2) : 235 – 239.

Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132 (1) : 44 – 51.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of microbiology* 176 (5) : 386 – 390.

Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., Berg, G. (2002). *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 : 1937 – 1944.

Yadav, B.K. and Verma A. (2012). Phosphate Solubilization and Mobilization in Soil Through Microorganisms Under Arid Ecosystems, *The Functioning of Ecosystems*, Prof. Mahamane Ali (Eds.),

Zhang, H., Kim, M.S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S., Paré, P.W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226 (4) : 839 – 851.

ANNEXES

6 Annexes

6.1 Annexe 1 : Liste mise à jour des substances dont on envisage la substitution : Journal officiel de l'Union Européenne, règlement d'exécution (UE) 2015/408 de la commission du 11 mars 2015

1-méthylcyclopropène, aclonifène, amitrole, bifenthrine, bromadiolone, bromuconazole, carbendazime, chlorotoluron (stéréochimie non définie), composés de cuivre (variantes de l'hydroxyde de cuivre, de l'oxychlorure de cuivre, de l'oxyde cuivreux, de la bouillie bordelaise et du sulfate de cuivre tribasique), cyproconazole, cyprodinil, diclofop, difénacoum, difénoconazole, diflufénican, diméthoate, dimoxystrobine, diquat, époxiconazole, esfenvalérate, éthoprophos, étoufenprox, étoxazole, amoxadone, fénamiphos, oxyde de fenbutatine, fipronil, fludioxonil, flufénacet, flumioxazine, fluométuron, fluopicolide, fluquinconazole, glufosinate, haloxyfop-P, imazamox, imazosulfuron, isoproturon, isopyrazam, lambda-cyhalothrine, lénacile, linuron, lufénuron, mécoprop, métalaxyl, métam, metconazole, méthomyl, métribuzine, metsulfuron-méthyle, molinate, myclobutanil, nicosulfuron, oxadiargyl, oxadiazon, oxamyl, oxyfluorène, paclobutrazol, pendiméthaline, pirimicarbe, prochloraz, profoxydime, propiconazole, propoxycarbazone, prosulfuron, quinoxifène, quizalofop-P (variante quizalofop-P-tefuryl), sulcotrione, tébuconazole, tébufenpyrad, tépraloxymid, thiaclopride, triallate, triasulfuron, triazoxide, warfarine, zirame

6.2 Annexe 2 : Fiche technique des milieux utilisés

- **Coïc-Lessaint :**

HNO₃ : 4,21 mM ; (NH₄)₂HPO₄ : 0,90 mM ; KNO₃ : 4,49 mM ; Ca(NO₃)₂ : 0,97 mM ; Mg(NO₃)₂ 6H₂O : 0,35 mM ; C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ 2H₂O : 26,86 µM ; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O : 0,04 µM ; H₃BO₃ : 24,26 µM ; MnSO₄ H₂O : 11,83 µM ; ZnSO₄ 7H₂O : 3,47 µM ; CuSO₄ 5H₂O : 1,00 µM.

- **Hoagland 0,5X liquide :**

MgSO₄ 7H₂O : 0,99 mM ; Ca(NO₃)₂ 4H₂O : 2,00 mM ; KNO₃ : 3,24 mM ; NH₄H₂PO₄ : 0,49 mM ; EDDHA-NaFe : 12,89 µM ; H₃BO₃ : 23,14 µM ; MnCl₂ 4H₂O : 4,57 µM ; ZnSO₄ 7H₂O : 0,43 µM ; CuSO₄ 5H₂O : 0,15 µM ; Na₂MoO₄ 2H₂O : 0,51 µM.

Hoagland 0,5X agar mou : Hoagland 0,5X ; agar (Sigma, Sigma-Aldrich, USA) 3,5 g.L⁻¹

Hoagland 0,5X gélifié : Hoagland 0,5X ; Gelzan™ CM (Sigma, Sigma-Aldrich, USA) 8 g.L⁻¹

- **TSB/10ème : Bacto™ Tryptic Soy Broth (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) : 3 g.L⁻¹**

Peptone de caséine (digestion pancréatique) : 1,7 g.L⁻¹ ; peptone de soja (digestion papaïque) 0,3 g.L⁻¹ ; Dextrose : 0,25 g.L⁻¹ ; NaCl : 0,5 g.L⁻¹ ; K₂HPO₄ : 0,25 g.L⁻¹.

- **TSA/10ème : Bacto™ Tryptic Soy agar (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) : 3 g.L⁻¹**

Peptone de caséine (digestion pancréatique) : 1,7 g.L⁻¹ ; peptone de soja (digestion papaïque) 0,3 g.L⁻¹ ; Dextrose : 0,25 g.L⁻¹ ; NaCl : 0,5 g.L⁻¹ ; K₂HPO₄ : 0,25 g.L⁻¹ ; agar (Sigma): 15 g.L⁻¹ .

- **PVK : milieu Pikovskaya :**

Glucose : 55,50 mM ; (NH₄)₂SO₄ : 3,78 mM ; NaCl : 3,42 mM ; MgSO₄ 7H₂O : 0,83 mM ; KCl : 2,68 mM ; Ca₃(PO₄)₂ : 80,59 mM ; Bacto™ Yeast Extract (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) : 0,5 g.L⁻¹ ; agar : 15 g.L⁻¹. MnSO₄ : traces ; FeSO₄ : traces.

- **CAA : milieu casamino acids**

Bacto™ Casamino acids technical (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) : 5 g.L⁻¹ ; KH₂PO₄ : 36,74 mM ; MgSO₄ 7H₂O : 2,07 mM

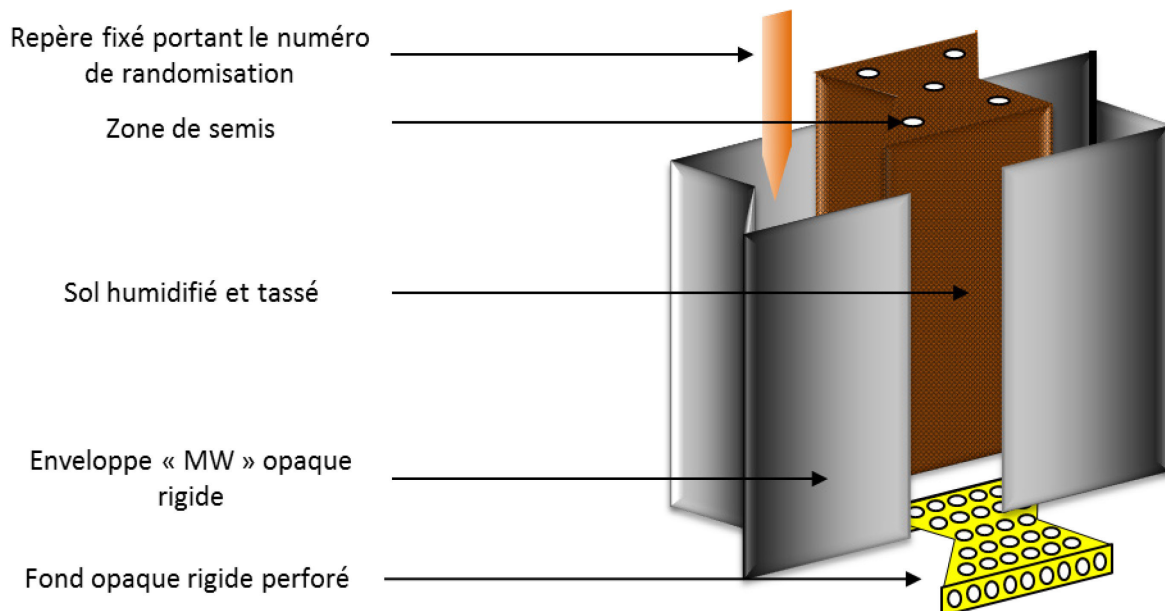
- **LB : milieu Luria broth**

NaCl : 85,55 mM ; Bacto™ Yeast Extract (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) : 5 g.L⁻¹ ; Bacto™ Tryptone (BD) : 10 g.L⁻¹.

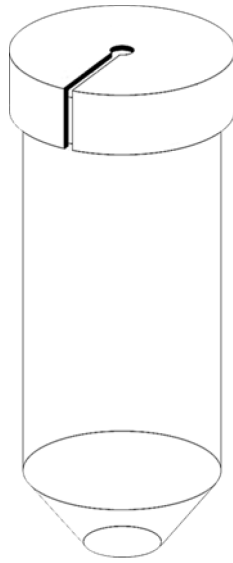
- **LA : milieu Luria agar**

NaCl : 85,55 mM ; Bacto™ Yeast Extract (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) : 5 g.L⁻¹ ; Bacto™ Tryptone (BD) : 10 g.L⁻¹ ; agar (Sigma) : 15 g.L⁻¹.

6.3 Annexe 3 : Dispositif de culture pour les essais en sol agricole non stérile (pots MW).



6.4 Annexe 4 : schémas d'un tube de collecte du sol adhérent



6.5 Annexe 5 : Analyse pédologique du sol agricole non stérile utilisé

Caractéristiques de votre parcelle															
Volume de sol exploitable		Degré d'activité du sol				Aptitude du sol à stocker les éléments				Granulométrie (g/kg)			Risque de battance		
Cailloux du sol < 15 %		Calcaire Total	280	G/KG	Capacité d'échange cationique				Sable grossier	129	T.Elevé				
Profondeur du sol 60-90 cm		Calcaire Actif	121	G/KG	152 MEQ/KG				Sable fin	142	Elevé				
		MO(C*1,72)	43,8	G/KG	Tx saturation				Limon grossier	91	Moyen				
		PH eau	8,19	.	> 100 .				Limon fin	124	Faible				
TF	F	N	E	TE	TF	F	N	E	TE	TF	F	N	E	TE	
										ARGILO LIMO-NEUX CALCAIRE			Nul		

Etat de fertilité de votre parcelle															
Elément	M.O.	PH EAU	P2O5 JH	P2O5 OLSEN	P.F. P2O5	C.SOL P2O5	K2O	MGO	K/MG	CAO	BORE	CU EDTA	ZN EDTA	MN EDTA	FER EDTA
Vos résultats	43,8	8,19	0,256	0,016	64	0,70	0,125	0,179	0,70	12,99	0,18	4,1	3,5	19,4	8,2
Unité	G/KG	.	G/KG	G/KG	G/100	MG/KG	G/KG	G/KG	.	G/KG	MG/KG	MG/KG	MG/KG	MG/KG	MG/KG
Teneurs souhaitables	25,6 33,3	6,95 7,41	0,152 0,228	0,076 0,114		2,00 3,18	0,203 0,280	0,154 0,231	1,00 2,50	4,50 6,17	0,37 0,55	2,3 3,4	3,0 4,5	7,0 11,6	26,4 39,6
Phosphore Dy.	0,036		G/KG							Activité enz.	5,0				
Pouv.Fix. K2O	59		G/100							Biomasse micr.	66		MG/KG		
Conc. Sol K2O	14,3		MG/KG							Azote Ramses	24,5		MG/KG		
Azote Total	2,43		G/KG							Blanc Ramses	2,6		MG/KG		

6.6 Annexe 6 : Macro-instruction attribuant un numéro aléatoire unique non répétitif de 1 à 8 à chaque modalité afin de leur attribuer une place au sein d'un bloc.

```

Sub Randomisation()
'
' Randomisation Macro
'
' Touche de raccourci du clavier : Option+Cmd+y
' Sub Aleatoire()
  Dim plage As Range, cel As Range, alea As Double

  Set plage = Range("O3:O10")
  plage.Value = ""
  If plage.Count > 8 Then Exit Sub
  Randomize

  For Each cel In plage
1    alea = WorksheetFunction.RandBetween(1, 8)
    If Application.CountIf(plage, alea) Then GoTo 1 Else cel = alea
  Next
End Sub

```

6.7 Annexe 7 : Analyse détaillée de l'effet bloc sur les paramètres mesurés.

Le paramètre bloc a été intégré au modèle d'interprétation statistique comme l'une des composantes de la variation observée. A ce titre, il est important d'en réaliser une étude plus approfondie afin de mettre en évidence un éventuel comportement atypique nuisant à la pertinence des résultats obtenus. D'un point de vue global, la localisation des groupes homogènes formés par l'analyse statistique au sein du dispositif expérimental ne permet pas d'apprécier un effet particulier qui aurait une influence nette et répétable sur les paramètres mesurés (Figure 1). Ce qui aurait pu être expliqué par un effet de l'enceinte de culture ou un biais expérimental.

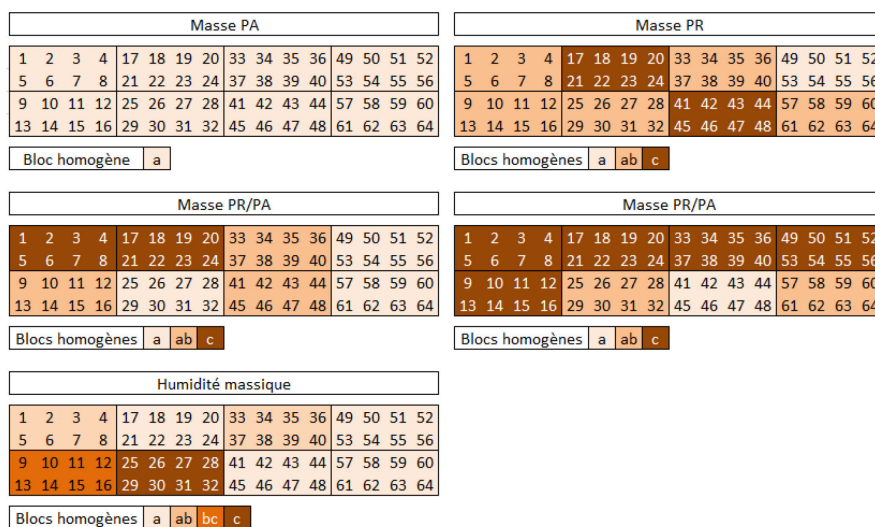
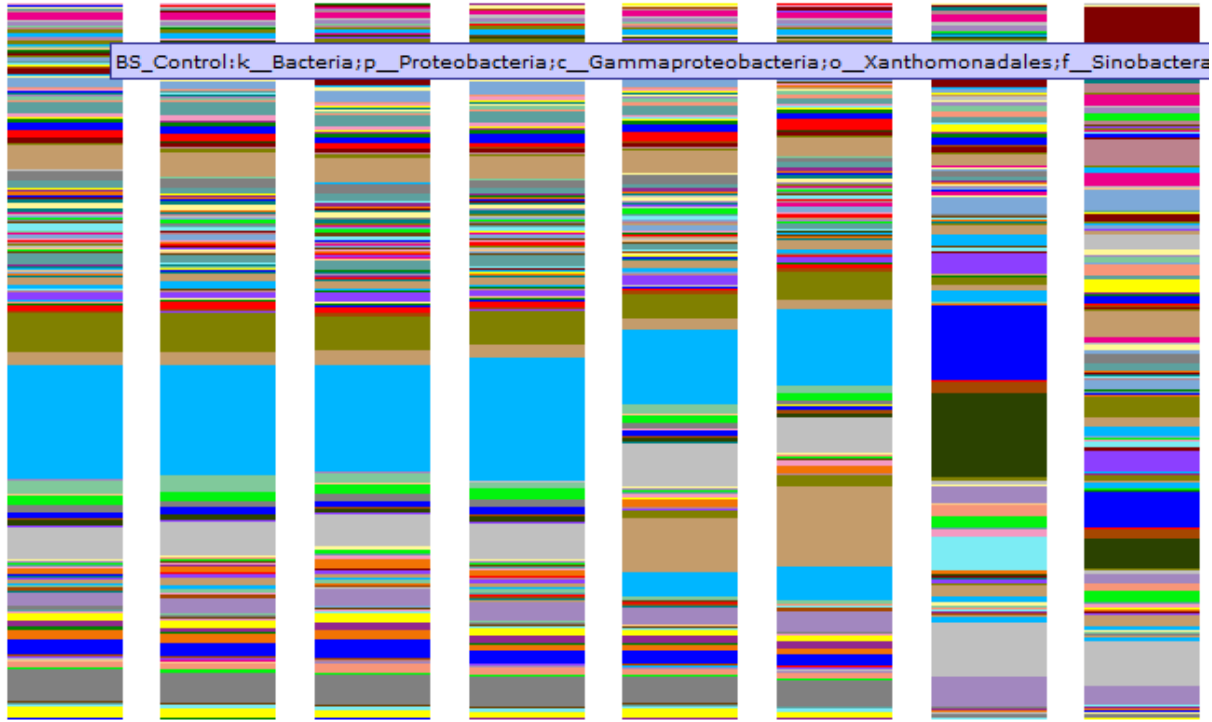


Figure annexe 1 : Répartition géographique schématisée au sein de l'enceinte de culture des groupes homogènes formés à l'issue de l'analyse statistique des données selon le paramètre étudié.

6.8 Annexe 8 : détail des données obtenues à l'issue de l'analyse des échantillons par métabarcoding du gène ADNr 16S

BS_Control : sol nu non inoculé, BS_Innoculated : sol nu inoculé, NRAS_Control : sol non rhizosphérique non inoculé, NRAS_Innoculated : sol non rhizosphérique inoculé, RAS_Control : sol adhérent non inoculé, RAS_Innoculated : sol adhérent inoculé, Root_Control : racine non inoculée, Root_Innoculated : racine inoculée



Legend		Total		BS_Control	BS_Innoculated	NRAS_Control	NRAS_Innoculated	RAS_Control	RAS_Innoculated	Root_Control	Root_Innoculated
count	%	count	%	%	%	%	%	%	%	%	%
k__Bacteria;p__c__o__f__g__	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;Other;Other;Other	99	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	8	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	125	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	915	0.9%	1.3%	1.3%	1.0%	1.0%	1.2%	0.9%	1.1%	0.1%	0.1%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	324	0.3%	0.4%	0.5%	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%	0.4%	0.0%	0.1%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	125	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	158	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	3394	3.3%	4.3%	4.3%	4.1%	4.3%	3.8%	3.7%	0.6%	0.6%	0.6%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	250	0.2%	0.3%	0.4%	0.4%	0.3%	0.2%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	749	0.7%	0.9%	0.9%	1.3%	0.9%	0.8%	0.8%	0.0%	0.1%	0.1%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	53	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	101	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	8	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	77	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	15	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	44	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	36	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	97	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	16	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	45	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	30	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	103	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%	0.1%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	13	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	1624	1.6%	2.2%	2.0%	2.7%	1.7%	1.8%	1.6%	0.2%	0.1%	0.1%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	837	0.8%	1.3%	1.1%	1.1%	0.9%	0.8%	0.8%	0.1%	0.1%	0.4%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	172	0.2%	0.3%	0.3%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	800	0.8%	1.0%	0.9%	1.2%	1.0%	1.1%	1.0%	0.2%	0.1%	0.1%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	821	0.8%	0.9%	0.9%	1.2%	1.1%	0.9%	0.8%	0.1%	0.3%	0.3%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	99	0.1%	0.1%	0.1%	0.3%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	175	0.2%	0.3%	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	20	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	92	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	211	0.2%	0.4%	0.2%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.2%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	25	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	25	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	53	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	12	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	2594	2.6%	1.8%	2.1%	2.3%	2.7%	2.5%	2.8%	4.1%	2.6%	2.6%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;o__f__g__	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Burkholderiaceae__Other	2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Burkholderiaceae__g	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__Other	768	0.8%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.4%	0.5%	1.2%	2.8%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Acidothromonas	50	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.5%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Delta	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Hydrogenosphaera	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Legibothrix	22	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Methylobium	458	0.5%	0.1%	0.1%	0.0%	0.2%	0.2%	0.1%	1.2%	2.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Polomonas	119	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.6%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Polomonas	36	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Rubrivivax	242	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.4%	0.3%	0.2%	0.0%	0.2%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Rubrivivax	70	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Varioxvax	601	0.6%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	1.0%	3.6%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Comamonadaceae__g_Xylophilus	20	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Oxalobacteraceae__Other	219	0.2%	0.3%	0.2%	0.3%	0.3%	0.1%	0.1%	0.4%	0.2%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Oxalobacteraceae__g	27	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Oxalobacteraceae__g_Cupriavidus	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Oxalobacteraceae__g_Herminimonas	5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Oxalobacteraceae__g_Janthinobacterium	91	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.4%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Burkholderiales_f__Oxalobacteraceae__g_Massilia	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Ellin6067_f__g	246	0.2%	0.3%	0.3%	0.2%	0.4%	0.3%	0.3%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__IS44_f__g	15	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__MND1_f__g	266	0.3%	0.2%	0.5%	0.3%	0.4%	0.3%	0.2%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Methylophilales_f__Methylophilaceae__Other	15	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Methylophilales_f__Methylophilaceae__g_Methylosteners	7	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Nitrosomonadales_f__Nitrosomonadaceae__Other	5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Nitrosomonadales_f__Nitrosomonadaceae__g	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Nitrosomonadales_f__Nitrosomonadaceae__g_Nitrososphaera	13	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Proteobacteriales_f__Proteobacteriaceae__g	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Rhodocyclales_f__Rhodocyclaceae__g	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Rhodocyclales_f__Rhodocyclaceae__g_Ultimeobacterium	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__SC-184_f__g	168	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__Other__Other	152	0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Betaproteobacteria_o__f__g	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Bdellovibrionales_f__Bdellovibrionaceae__g_Bdellovibrio	2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__FAC87_f__g	5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__MIZ46_f__g	61	0.1%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__g	193	0.2%	0.1%	0.1%	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__g	475	0.5%	0.5%	0.3%	0.7%	0.6%	0.5%	0.5%	0.2%	0.4%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__g_0319-6020_g	9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Cystobacteraceae__Other	100	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Cystobacteraceae__g	30	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Cystobacteraceae__g_Cystobacter	8	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Cystobacteraceae__g_Cystobacter	4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Cystobacteraceae__g	172	0.2%	0.1%	0.1%	0.3%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Hallangiaceae__g_Hallangium	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Myxococcaceae__Other	6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Myxococcaceae__g	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Myxococcaceae__g_Anaromyxobacter	10	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Nannocystaceae__g	6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Nannocystaceae__g_Ceratiococcus	6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Nannocystaceae__g_Myxococcus	6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Nannocystaceae__g	6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Nannocystaceae__g_Nannocystis	2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Nannocystaceae__g_Plesiocystis	15	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__O87_f__g	12	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Polyangiaceae__Other	52	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.2%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Polyangiaceae__g	26	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Polyangiaceae__g_Atherobacter	5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Myxococcales_f__Polyangiaceae__g_Soraniqum	4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__NB1-Other__Other	5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__NB1-f__g	8	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__NB1-f__MMD4_g	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__NB1-f__NB1-g	4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__PB19-f__g	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Spiracillales_f__g	16	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Syntrophobacteriales_f__Syntrophobacteraceae__Other	9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__Syntrophobacteriales_f__Syntrophobacteraceae__g	627	0.6%	0.6%	0.7%	0.5%	0.7%	1.0%	0.8%	0.2%	0.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__[Entotheonellales]f__[Entotheonellaceae]__Other	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__[Entotheonellales]f__[Entotheonellaceae]__g	311	0.3%	0.5%	0.4%	0.3%	0.5%	0.3%	0.4%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Deltaproteobacteria_o__[Entotheonellales]f__[Entotheonellaceae]__g_Candidatus_Enthotheonella	9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Other__Other	225	0.2%	0.4%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.4%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Alteromonadales__Other__Other	6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Alteromonadales_f__211ds20_g	19	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Alteromonadales_f__Alteromonadaceae__Other	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Alteromonadales_f__Alteromonadaceae__g_Celhybio	4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Enterobacteriales_f__Enterobacteriaceae__Other	21	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Enterobacteriales_f__Enterobacteriaceae__g_Gluconobacter	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__HTCC2188_f__HTCC2059_g	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Legionellales__Other__Other	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Legionellales_f__Coxiellaceae__g	6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Legionellales_f__Coxiellaceae__g_Aquicella	2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Legionellales_f__Coxiellaceae__g_Rickettsiella	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Legionellales_f__Legionellaceae__Other	14	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Legionellales_f__Legionellaceae__g	5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Pseudomonadales_f__Moraxellaceae__g_Acinetobacter	12	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Pseudomonadales_f__Pseudomonadaceae__Other	4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Pseudomonadales_f__Pseudomonadaceae__g_Pseudomonas	176	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	1.1%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Thiorichales_f__Piscirickettsiaceae__g	27	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales__Other__Other	11	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__g	1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Sinobacteraceae__Other	164	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Sinobacteraceae__g	563	0.6%	0.7%	0.5%	0.5%	0.7%	0.6%	0.4%	0.6%	0.6%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Sinobacteraceae__g_Hydrocarboniphaga	2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Sinobacteraceae__g_Steroidobacter	387	0.4%	0.2%	0.4%	0.4%	0.4%	0.3%	0.3%	0.6%	0.4%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Xanthomonadaceae__Other	875	0.9%	0.9%	0.9%	0.6%	0.4%	0.7%	0.9%	1.0%	1.5%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Xanthomonadaceae__g	21	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Xanthomonadaceae__g_Arenimonas	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
k_Bacteria_p__Proteobacteria_o__Gammmaproteobacteria_o__Xanthomonadales_f__Xanthomonadaceae__g_Doldeonella	12	0.0%	0.0%	0.							

INDEX DES ILLUSTRATIONS

7 Index des illustrations

7.1 Figures

Figure	Légende
1.1	Distribution géographique des sites expérimentaux appartenant au réseau DEPHY distingués selon la filière de production. (Source : agriculture.gouv.fr/DEPHY-EXPE)
1.2	Diagramme de « U » (1935) représentant la théorie de Woo Jang-choon (dit « Nagaharu U ») selon laquelle les espèces <i>B. carinata</i> , <i>B. juncea</i> et <i>B. napus</i> sont issues du croisement naturel de <i>B. nigra</i> , <i>B. rapa</i> et <i>B. oleracea</i> .
1.3	Affiches de propagande diffusées par le gouvernement des Etats-Unis en 1943 visant à collecter les corps gras domestiques pour pallier à la pénurie liée à la Seconde Guerre Mondiale
1.4	Évolution de la part de semences des associations variétales lignées hybrides (CHL), des lignées pures (L) et des lignées hybrides restaurées (HR) utilisées en France entre 2006 et 2011 (d'après Coudurier et al, 2013).
1.5	Évolution du potentiel de rendement du colza avant son inscription au catalogue officiel entre 1955 et 2000 (d'après Coudurier et al, 2013).
1.6	Classement des pays producteurs de colza dans le monde en 2013, France (4,3.106 tonnes).
1.7	Principales productions agricoles en France en 2013
1.8	Carte d'assolement des cultures de colza en France en 2013. (D'après Carpentier, M, 2013. à Terre-net Média).
1.9	Évolution du rendement de la production de colza en France en hectogrammes par hectare entre 1961 (1,5 t/ha) et 2013 (3 t/ha).
1.10	Évolution de la production mondiale de colza en million de tonnes entre 1961 (3,5.106 tonnes) et 2013 (72,6.106 tonnes).
1.11	Répartition géographique de la production de colza dans le monde en 2013 (D'après FAOSTAT, 2015).
1.12	Évolution du rendement de la production de colza dans le monde en hectogrammes par hectare entre 1961 (0,5 t/ha) et 2013 (20 t/ha).
1.13	(a) Homology segment : chromosome segment marked by at least one gene that has been mapped in two or more species. (b) synteny conservation : two or more pairs of homologous genes on the same chromosome in two or more species ; the markers need not occur in the same order. (c) linkage conservation : conservation not only of synteny but also of gene order. (D'après Nadeau, 1989)
2.1	Coupe transversale schématique du dispositif expérimental : (0) milieu Pikovskaya-agar, (1) colonie bactérienne, (2) halo de solubilisation, (A) milieu témoin sans bactérie, (B) milieu avec colonie dont le halo n'a pas été mesuré, (C) milieu avec colonie dont le halo ayant atteint le fond de la boîte a été mesuré.
2.2	Abaque prédictif estimant le nombre de répétitions en fonction de la différence vraie souhaitée et du coefficient de variation des données mesurées.
3.1	Variation phénotypique de la souche <i>P. brassicacearum</i> NFM421. (a) colonies âgées de 7 jours cultivées sur le milieu PAF (Difco Laboratories, USA) mettant en évidence une zone (PII) correspondant aux cellules variantes. (b) morphologie des deux types de colonies. (c et d) Une activité protéase extracellulaire et lipase présente chez les colonies non variantes (PI) et absente sur les cellules variantes a pu être révélée au moyen de cultures sur boîte de Petri réalisées en milieu gélosé « Tryptic Soy Broth » (Difco Laboratories, USA) dilué dix fois contenant 1% de lait écrémé (c) ou 1% de tributyrine et 0,8% de gomme arabique (d). La souche a été cultivée à 30 °C (d'après Chabeaud et al., 2001).
3.2	Effet du changement de phase de NFM421 sur l'architecture des racines (a) et colonisation racinaire (b) de plantules d' <i>A. thaliana</i> Col-0 âgées de trois semaines. (a-1) : contrôle; (a-2) plantules colonisées par les cellules non variante; (a-3) plantules colonisées par les cellules variantes. Observation réalisées en microscopie confocale (CSLM) sur des cellules marquées à la GFP non variantes (b-1) ou variantes (b-2 et b-3) colonisant les racines d' <i>A. thaliana</i> (d'après Achouak et al., 2003).
3.3	Représentation schématique de l'unité répétée de l'exopolysaccharide YAS34 (d'après Alami et al. (1998) Brevet CNRS-ARD FR 2759377, EP 0960132, WO 9835993)67
3.4	Micrographies réalisées en microscopie électronique à balayage d'E. agglomérans NO30 incubées 24 h sur des racines de riz (1) et 8 h sur milieu LB illustrant la formation de symplasmata (SY), B = bactérie. (D'après Achouak et al., 1994).
3.5	Arbre phylogénique du genre <i>Burkholderia</i> basé sur l'ARN ribosomique 16S de 97 membres du genre. Le numéro d'accèsion de la séquence de l'ARN 16S a été indiqué entre parenthèses. D'après Sawana et al., 2014. Encadré en rouge <i>B. cepacia</i> , en vert <i>B. caribensis</i> .
3.6	Structure de l'exopolysaccharide produit par <i>P. caribensis</i> P71. Il s'agit d'un enchainement de molécules de D-glucose (D-Glc), 6-déoxy-L-talose (L-6dTal), acide 3-déoxy-D-manno-octa-2-ulosonique (Kdo) et un groupe O-acétyle pour un ratio molaire de 2:1:1:1. (D'après Vanhaverbeke et al., 2001).
3.7	Coupe d'un kyste de <i>RamLibacter tataouinensis</i> observée en MET. Diamètre de la cellule : 0,8 µm.

3.8	Micrographie réalisée en microscopie à contraste de phase de <i>RamLibacter tataouinensis</i> TTB310 poussant en milieu liquide TSB/10ème culture de 3 jours à 30°C. Ce cliché illustre la présence d'individus (1) sous forme sphérique (kyste), (2) de bâtonnets et (3) d'agrégats de kystes. La micrographie a été prise avec un microscope confocal à balayage laser Olympus Fluoview. Echelle : 4 µm. D'après Heulin <i>et al.</i> , 2003.
3.9	Représentation schématique du dispositif expérimental standardisé de culture des plantules de colza en présence des souches bactériennes candidates.
3.10	Représentation schématique du dispositif expérimental standardisé de culture des plantules de colza en vue de la détection de colonies secondaires des souches candidates sur la racine par microscopie optique à épifluorescence.
3.11	(A) observation réalisée par microscopie optique à épifluorescence (couleurs artificielles) sur une portion de racine portant un poil absorbant d'une plantule d' <i>A. thaliana</i> illustrant l'absence de cellules fluorescentes de <i>R. tataouinensis</i> TTB310, la couleur verte diffuse observée étant l'autofluorescence de la racine causée par une observation prolongée. (B) Présence de cellules à l'état libre détachées de la bande d'inoculation lors du prélèvement d'un échantillon racinaire. On peut observer les deux formes de la souche TTB310 : kyste (a) et bâtonnet (b).
3.12	(A) Observation réalisée par microscopie optique à épifluorescence (couleurs artificielles) sur une portion de racine d'une plantule d' <i>A. thaliana</i> illustrant la présence de symplasmata de <i>P. agglomerans</i> NO30 (a). (B) Observation réalisée dans les mêmes conditions sur une portion de racine d'une plantule de <i>B. napus</i> illustrant la présence de symplasmata (b).
3.13	Disposition de l'essai au sein dans le phytotron. Chaque modalité est représentée une fois par bloc. Une modalité « bordure » a été ajoutée pour combler la place libre au sein de chaque bloc. Eau : témoin négatif, <i>P. brassicacearum</i> NFM421, <i>P. brassicacearum</i> 11702, <i>E. radincincans</i> NO9, <i>P. agglomerans</i> NO30, <i>P. caribensis</i> P71, <i>R. alamii</i> YAS34.
3.14	Différence de structuration du sol entre le témoin négatif (A) ou en présence de l'inoculum de <i>P. caribensis</i> P71 (B). Le sol prend une texture argileuse collante et très compacte, très difficile à désagréger.
3.15	Représentation schématique des mécanismes de solubilisation du P dans le sol par les microorganismes solubilisateur des phosphates (Sherma <i>et al.</i> , 2013).
3.16	Scans des boîtes de Petri contenant le milieu Pikovskaya agar (PVK) avant (1) ou après lavage des colonies (2).
3.17	Suivi de la croissance des souches bactériennes en co-inoculation avec NFM421 par estimation de la concentration en CFU.mL ⁻¹ en fonction du temps. (A) souche NFM421 et <i>E. radincincans</i> NO9, (B) NFM421 et <i>P. agglomerans</i> NO30, (C) souche NFM421 et <i>B. caribensis</i> P71 et (D) souche NFM421 et <i>R. alamii</i> YAS34.
3.18	Photographie des milieux de cultures utilisés mettant en évidence une variation de leur coloration en fonction du partenaire bactérien employé.
3.19	Localisation des zones échantillonnées sur boîte de Petri.
3.20	Observation au microscope optique à épifluorescence colorisées artificiellement des zones A, B et C après excitation de la mKate2 du compétiteur (1) ou de la GFP de la souche NFM421 (2).
3.21	Superposition artificielle des clichés réalisés au niveau de la zone C pour le couple <i>P. brassicacearum</i> NFM421 (GFP) / <i>P. agglomerans</i> NO30 (mKate2).
3.22	Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les expérimentations de co-inoculation du colza.
3.23	Schéma illustrant le plan du dispositif expérimental composé des 9 blocs ordonnés selon les deux axes du plan portant chacun toutes les modalités.
3.24	Photographie du dispositif en 9 blocs en cours de culture
3.25	Plans de randomisation appliqués aux essais 1, 2 et 3. Chaque modalité est présente au sein de chacun des 8 blocs. D'un bloc à l'autre, les modalités ont été réarrangées aléatoirement. (NF = <i>P. brassicacearum</i> NFM421, NO9 = <i>E. radincincans</i> , YAS34 = <i>R. alamii</i>).
3.26	Chronologie des 3 répétitions de l'essai en sol agricole non stérilisé.
3.27	Représentation graphique de l'analyse en composantes principales des données des séries 1 (carré bleu), 2 (triangle rouge) et 3 (triangle inversé jaune) organisées selon le facteur modalité et bloc
3.28	Synthèse des données mesurées à l'issue des trois séries d'expérimentation. Les valeurs des moyennes ont été inscrites dans le cadre au dessus de chaque modalité. Le tableau sous les boîtes à moustaches donne les groupes homogènes formés au moyen d'un test de type ANOVA (ANalysis Of VAriance).
3.29	Teneurs en phosphore et en soufre mesurées par modalité dans la partie aérienne des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.
3.30	Teneurs en phosphore et en soufre mesurées par modalité dans la partie racinaire des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.
3.31	Teneurs en phosphore et en soufre mesurées par bloc dans la partie aérienne des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.

3.32	Teneurs en phosphore et en soufre mesurées par bloc dans la partie racinaire des échantillons des séries 2 et 3. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.
3.33	Plan de répartition des modalités testées au sein des 8 blocs et organisation dans l'enceinte de culture. Modalités jaunes : inoculées par une suspension des souches NFM421, NO9 et YAS34 à 108 cfu.mL ⁻¹ chacun. Modalités grisées : témoins non inoculés.
3.34	Chronologie de l'essai graduée en jours depuis la première inoculation (J0).
3.35	Plan de répartition des modalités testées par pyroséquençage au sein des blocs et organisation géographique dans l'enceinte de culture. Les modalités encadrées de rouge ont été maintenues sans plantule pour établir le profil microbiologique d'un sol nu, celles en bleu pour les profils « sol adhérent », « rhizoplan » et « sol non rhizosphérique ».
3.36	Représentation graphique de l'humidité massique du sol. A : évolution de l'humidité en % en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. B : évolution de l'humidité en % en fonction du bloc. Les encoches sur les boîtes à moustaches désignent l'intervalle de confiance. C et D : groupes homogènes formés pas le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.
3.37	Représentation graphique des masses des parties aériennes. A : évolution de la masse en milligrammes de la partie aérienne des plantules en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. B : évolution de la masse de la partie aérienne des plantules en fonction du bloc (mg) ; C et D : groupes homogènes formés par le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.
3.38	Représentation graphique des masses des parties racinaires. A : évolution de la masse en milligrammes de la partie racinaire des plantules en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. B : évolution de la masse des racines des plantules en fonction du bloc (mg). C et D : groupes homogènes formés pas le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.
3.39	Représentation graphique du rapport de masse des parties racinaires sur aériennes. A : évolution du rapport de la masse racinaire sur la masse de la partie aérienne en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. B : évolution du ratio « masse racinaire sur masse aérienne » en fonction du bloc (mg). C et D : groupes homogènes formés pas le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.
3.40	Représentation graphique du rapport de la masse de sol adhérent sur la masse de la partie racinaire. A : évolution du rapport de la « masse de sol adhérent sur la masse de la partie racinaire » en fonction de la condition d'inoculation I : inoculé par les trois souches NFM421, NO9 et YAS34, NI : non inoculé. B : évolution de la masse de sol adhérent sur la masse de la partie racinaire en fonction du bloc. C et D : groupes homogènes formés pas le test ANOVA et indices de significativité des différences observées pour un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.
3.41	Teneurs en phosphore et en soufre mesurées par modalité dans les parties aériennes et racinaires des échantillons. Les groupes homogènes donnés sont ceux formés par un test du type ANOVA à deux facteurs (modalité et bloc) pour une erreur α de 5 ou 10 %.
3.42	Schéma récapitulatif le mode d'obtention des échantillons des 4 compartiments analysés par metabarcoding du 16S (ou pyroséquençage).
3.43	Représentation schématique de la diversité du microbiote des échantillons prélevés avec ou sans inoculation par les souches NFM421, NO9 et YAS34. Chaque couleur représente une classe bactérienne distincte, l'aire de la couleur est fonction de son abondance au sein de l'échantillon. Détail des données en Annexe 8.
3.44	Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment sol nu
3.45	Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment sol non rhizosphérique
3.46	Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment sol adhérent
3.47	Variations du microbiote en présence de l'inoculum dans le compartiment racinaire
3.48	structure de la molécule du DAPG
3.49	Evolution des prix de production (avec et sans subvention) et des coûts unitaires du colza entre 1991 et 2004. (D'après Desbois et Legris, 2007 disponible à 2).
3.50	Cycle de développement du colza (D'après PROLEA, disponible à 4).
3.51	A) Carte de répartition des sols de France (d'après Gis Sol disponible à 5). B) Carte des assolements colza en France en 2013 (d'après Cetiom disponible à 6).

7.2 Tableaux

Tableau

1.1	Principales productions en tonnes dans le monde en 2013 (Sources : FAOSTAT).
1.2	Liste de quelques inoculants utilisant des microorganismes PGPR, commercialisés dans le monde (Berg, 2009).
2.1	Résumé des statistiques descriptives des données des trois séries d'expérimentation en sol. « \bar{x} » : moyenne, « s » : écart type, « CV% » : coefficient de variation, « PA » : partie aérienne, « PR » : partie racinaire, « SA » : sol adhérent aux racines.
2.2	Estimation de la puissance des séries 2 et 3 de l'essai en sol. PA désigne parties aériennes, PR désigne parties racinaires.
3.1	Effet de l'état d'hydratation du sol et de l'inoculation du tournesol par <i>Rhizobium alamii</i> YAS34 sur les paramètres de croissance du tournesol et la production de sol adhérent dans deux expérimentations distinctes. (Abréviations : NI : non inoculé, NWS : absence de stress hydrique, Inoc : inoculé, WS : stress hydrique, RT : racines, RAS : sol adhérent, NS : non significatif). (D'après Alami <i>et al.</i> , 2000).
3.2	Estimation a posteriori de la concentration bactérienne du sol inoculé.
3.3	Résumé des observations réalisées sur les 3 premiers blocs : « Signal fluo. » désigne les modalités pour lesquelles la présence des souches candidates (marquées à l'aide d'une protéine fluorescente) a pu être détectée, « - » désigne une observation négative, « nd » désigne l'absence de donnée.
3.4	Résumé des observations réalisées sur les 3 blocs suivants : « Signal fluo. » désigne les modalités pour lesquelles la présence des souches candidates (marquées à l'aide d'une protéine fluorescente) a pu être détectée, « - » désigne une observation négative, « nd » désigne l'absence de donnée.
3.5	Résumé des observations réalisées sur les 3 blocs suivants : « Signal fluo. » désigne les modalités pour lesquelles la présence des souches candidates (marquées à l'aide d'une protéine fluorescente) a pu être détectée, « - » désigne une observation négative, « nd » désigne l'absence de donnée.
3.6	Liste des index de solubilisation calculés à partir de la moyenne des 5 spots selon la formule précédemment présentée. « nd » désigne l'absence de donnée, le halo n'ayant pas atteint le fond de la boîte de Petri.
3.7	Concentrations moyennes des populations bactériennes estimées par le comptage des colonies fluorescentes présentes sur les étalements des broyats racinaires de 3 plantules de colza par prélèvement. Les concentrations sont données en CFU.mL ⁻¹ . « - » désigne une donnée non pertinente, « nd » désigne l'absence de donnée (les trois individus de cette modalité n'ont pas poussé au sein des trois blocs étudiés).
3.8	Localisation des souches sur les racines de colza (culture en tube avec le sable de rivière). Imagerie réalisée sur les échantillons du bloc 5 pour le couple <i>P. brassicacearum</i> NFM421/E. <i>radicincitans</i> NO9 (A) sur les zones apicales et basales de la racine par microscopie optique confocale. Clichés suivants, imagerie réalisée sur le même bloc sur les zones apicales, centrales et basales de la racine par microscopie optique à épifluorescence pour les couples souche NFM421/ souche 11702 (B), souche NFM421/P. <i>caribensis</i> P71 (C) et souche NFM421/R. <i>alamii</i> YAS34 (D). « nd » désigne l'absence de candidats fluorescents observables sur l'échantillon.
3.9	Localisation des souches sur les racines de colza (culture en tube avec le sable de rivière). Imagerie réalisée sur les échantillons du bloc 7 sur les zones apicales, centrales et basales de la racine par microscopie optique à épifluorescence pour les couples souche NFM421/E. <i>radicincitans</i> NO9 (A), souche NFM421/ souche 11702 (B) et souche NFM421/R. <i>alamii</i> YAS34 (D).
3.10	Localisation des souches sur les racines de colza (culture en tube avec le sable de rivière). Imagerie réalisée sur les échantillons du bloc 8 sur les zones apicales, centrales et basales de la racine par microscopie optique à épifluorescence pour les couples souche NFM421/ souche 11702 (B), souche NFM421/R. <i>alamii</i> YAS34 (D) et souche NFM421/P. <i>agglomerans</i> NO30 (E).
3.11	Résumé des différentes étapes de criblage réalisées et bilan des résultats positifs (✓) ou négatifs (✗) par souche testée.
3.12	Résumé des effets phytobénéfiques complémentaires potentiels des souches sélectionnées pour la suite de l'étude.
3.13	Liste des protéines fluorescentes utilisées pour le marquage et la distinction des souches candidates.
3.14	Chacune des répétitions possède 8 blocs indépendants contenant chacun toutes les modalités. Cette figure donne le pourcentage total des modalités par répétition dans lesquelles ont pu être identifiées les souches Inoculées.
3.15	Taille des populations « totales » et de celle des souches inoculées. La concentration donnée est la concentration moyenne des 8 répétitions de chaque modalité. « Totale » représente la mesure du microbiote cultivable mesuré dans ces conditions. « nd » désigne une absence de donnée.
3.16	Fréquence moyenne d'apparition des candidats par répétition et concentration moyenne des candidats par répétition.

3.17	Résumé des statistiques descriptives des données des trois séries d'expérimentation en sol. « \bar{x} » : moyenne, « s » : écart type, « CV% » : coefficient de variation, « PA » : partie aérienne, « PR » : partie racinaire, « SA » : sol adhérent aux racines.
3.18	Estimation des effectifs minimums « Rép. Min » permettant, compte tenu des variations mesurées, d'obtenir une puissance suffisante pour répondre à la question posée. Les valeurs compatibles avec le dispositif expérimental sont encadrées en vert.
3.19	Effectifs maximaux par paramètre agronomique d'intérêt mesuré, une fois exclus les échantillons réservés à l'expérimentation visant à déterminer le profil microbiologique des échantillons par pyroséquençage.
3.20	Calcul du coefficient de variation des données de l'essai par paramètre agronomique d'intérêt mesuré. (écart-type « s », moyenne « \bar{x} », coefficient de variation « CV »).
3.21	Détermination de l'effectif minimal significatif calculé en tenant compte des coefficients de variation de l'essai pour un α de 5 et 10 %, un β fixé à 10 % et un Δ allant de 10 à 30 %. Les signes « - » désignent un effectif supérieur à 40 qui dépasse le pouvoir de prédiction de l'abaque.
3.22	Détermination de l'effectif minimal significatif calculé pour chacun des 4 essais en tenant compte des coefficients de variation de l'essai pour un α de 5%, un β fixé à 10 % et un Δ de 30%. Les signes « - » désignent un effectif supérieur à 40 qui dépasse le pouvoir de prédiction de l'abaque.
3.23	Détermination de l'effectif minimal significatif calculé en tenant compte des coefficients de variation de l'essai pour un α de 5%, un β fixé à 10% et un Δ à 30%. Les signes « - » désignent un effectif supérieur à 40 qui dépasse le pouvoir de prédiction de l'abaque.
3.24	Taxonomie résumée des souches candidates de l'étude
3.25	Variation des proportions des OTUs appartenant aux genres auxquels appartiennent les souches inoculées, selon le compartiment et la condition d'inoculation (mélange des souches NFM421, NO9 et YAS34).
3.26	Nombre de séquences d'ADNr 16S identifiées par pyroséquençage par échantillon et par compartiment. Les signes « - » correspondent à une absence de séquence au sein de l'échantillon.
3.27	Pourcentage total de séquences appartenant à l'espèce <i>Rhodococcus</i> sp. selon le compartiment observé.
3.28	Synthèse des effets phytobénéfiques potentiels de chaque souche étudiée.
3.29	Synthèse des effets phytobénéfiques potentiels complémentaires des souches retenues.