

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES</b> .....	<b>xiii</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1. Le maïs.....	1
1.1.1. La production de maïs .....	1
1.1.2. Les fertilisants .....	2
1.1.3. La pollution associée à la production de maïs.....	2
1.2. Les biofertilisants.....	4
1.2.1. L'activité microbologique de la rhizosphère.....	4
1.2.2. Les PGPB .....	5
1.2.3. Les endophytes.....	7
1.2.3.1. Azospirillum .....	11
1.2.3.2. Gluconacetobacter .....	13
1.2.4. L'efficacité des biofertilisants.....	15
1.2.5. La dispersion et persistance des biofertilisants .....	18
1.2.6. L'effet des biofertilisants sur la photosynthèse.....	23
1.2.6.1. Les systèmes photosynthétiques .....	26
1.2.6.2. Les phases de la photosynthèse .....	27
1.2.6.3. Les photosystèmes .....	27
1.2.6.4. Le photosystème II .....	29
1.2.6.5. Le cytochrome $b_6f$ et le PSI .....	33
1.2.6.7. Le gradient de protons .....	34
1.3. Les hypothèses et objectifs du mémoire.....	36

1.3.1. Les hypothèses .....	36
1.3.2. Les objectifs .....	37
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>MÉTHODES EXPÉRIMENTALES .....</b>	<b>39</b>
2.1 La plante modèle .....	39
2.2 Les endophytes modèles .....	39
2.3 La culture des endophytes .....	40
2.4 La transformation génétique des endophytes .....	41
2.5 L'extraction de l'ADN des endophytes en culture, dans le grain et dans les racines .....	44
2.6 La détection de l'ADN des endophytes par la PCR en temps réel .....	46
2.7 Le développement de la chambre de croissance de niveau de confinement 2 .....	47
2.8 Le test de germination des grains de maïs .....	49
2.9 L'évaluation du transport d'électrons dans le PSII .....	49
2.9.1 Les mesures d'induction de fluorescence .....	50
2.9.2 Les mesures de déclin de fluorescence .....	51
2.10 L'évaluation de l'effet des conditions d'inoculation des endophytes sur la biomasse et la colonisation des racines .....	52
2.11 L'évaluation de la persistance des endophytes .....	53
2.12 L'analyse statistique .....	54
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>55</b>
3.1. La caractérisation des endophytes modèles et du transformant .....	55
3.1.1. Le séquençage de l'ADNr 16S des endophytes .....	55
3.1.2. La culture des endophytes .....	55
3.1.3. La transformation génétique des endophytes .....	56
3.1.4. L'extraction des endophytes dans les racines et les grains de l'épi de maïs .....	58
3.1.5. La détection de l'ADN des endophytes par la PCR en temps réel .....	59
3.2. Les expérimentations en chambre de croissance .....	62
3.2.1. Les paramètres de croissance des plants de maïs .....	62
3.2.2 L'impact de l'inoculation de <i>G. azotocaptans</i> sur le photosystème II .....	64
3.2.2.1 L'induction de fluorescence .....	64

3.2.2.2 Le déclin de fluorescence .....	68
3.2.3 L'impact des conditions d'inoculation des endophytes sur la biomasse ...	69
3.2.4 L'impact des conditions d'inoculation des endophytes sur la colonisation des racines.....	71
3.2.5 L'évaluation de la persistance des endophytes.....	74
<b>CHAPITRE IV</b>	
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>76</b>
4.1 Le modèle expérimental.....	76
4.1.1 Le choix des endophytes modèles .....	76
4.1.2 La chambre de croissance de niveau de confinement 2.....	77
4.1.3 Le transformant.....	78
4.1.4 La PCR en temps réel .....	79
4.2 Les conditions d'inoculation des endophytes .....	81
4.3 L'étude de la photosynthèse.....	83
4.4 Le déplacement vertical et la persistance des endophytes .....	89
<b>CHAPITRE V</b>	
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>93</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>95</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
3.1	Résultats de fluorimétrie des endophytes natif et de <i>G. azotocaptans</i> transformé. ....	57
3.2	Comparaison des résultats d'extraction de l'ADN bactérien dans les racines et le grain par différentes trousses commerciales. ....	59
3.3	Amplitude (A) et temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) des trois phases de l'induction de fluorescence du PSII testé sur les feuilles de maïs entières 8 jours après l'inoculation du grain par <i>G. azotocaptans</i> natif. ....	66
3.4	Analyse quantitative des paramètres d'induction de fluorescence dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par <i>G. azotocaptans</i> natif. ....	67
3.5	Amplitude (A) et temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) des trois phases du déclin de fluorescence du PSII testé sur les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par <i>G. azotocaptans</i> natif. La somme des amplitudes est également représentée. ....	69

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation artistique de la photosynthèse dans une feuille présentée d'une manière simplifiée (tiré de Ricoud, 1997).....	24
1.2	Structure des chloroplastes. Adaptée de Garret et Grisham (2000).....	27
1.3	Représentation schématique de la structure de la membrane thylacoïde (David Joly, 2007). ....	29
1.4	Représentation schématique de la structure du photosystème II (David Joly, 2007).....	31
1.5	Schéma en Z du transport des électrons dans la membrane du thylacoïde (David Joly , 2007). ....	33
1.6	Représentation schématique de la structure du photosystème I (David Joly, 2007).....	34
1.7	Schéma en Z de la suite d'oxydoréduction des photosystèmes I et II. ....	35
2.1	Floraison du plant de maïs. ....	49
2.2	Les mesures d'induction de fluorescence ont été effectuées à la température pièce avec le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). ....	51
2.3	Barème de classification du nombre relatif de racines récoltées correspondant à 0,1,2,3 et 4 de gauche à droite. ....	53
3.1	Courbe standard d'A. lipoferum natif inoculé sur le grain de maïs.....	60
3.2	Courbe standard de G. azotocaptans natif inoculé sur la matrice végétale. Ici inoculé sur les racines.....	61
3.3	Exemple d'épis récoltés à la suite de la pollinisation des soies.....	62
3.4	Effet de la luminosité sur la hauteur du plant. ....	63
3.5	Tracé expérimental d'induction de fluorescence dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par G. azotocaptans natif.....	65

3.6	Comparaison des amplitudes des phases O-J, J-I et I-P dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par <i>G. azotocaptans</i> natif. ....	66
3.7	Comparaison des temps de demi-vie des phases O-J, J-I et I-P dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par <i>G. azotocaptans</i> natif.....	67
3.8	Cinétique du déclin de fluorescence chlorophyllienne du PSII effectuée sur les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par <i>G. azotocaptans</i> natif.....	68
3.9	Impact des conditions d'inoculation sur la médiane du nombre de feuilles de maïs après 8 jours de croissance. ....	70
3.10	Impact des conditions d'inoculation de <i>G. azotocaptans</i> natif et transformé sur la médiane du nombre relatif de racines après 8 jours de croissance.....	71
3.11	Variation du pourcentage de détection de l'ADN de <i>G. azotocaptans</i> dans les racines après 8 jours de croissance selon la méthode d'inoculation. ....	72
3.12	Quantification du nombre d'endophytes dans les racines de 8 jours en fonction des conditions d'inoculation.....	73
3.13	Proportion du nombre d'échantillons de racines de 8 jours positifs à la détection de l'ADN de <i>G. azotocaptans</i> en fonction des différentes conditions d'inoculation.....	74
3.14	Quantification de la présence d'endophytes dans les racines matures. ....	75

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIA	Acide indole-acétique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
COE	Complexe d'oxydation de l'eau
Ct	Cycle seuil
Ctrl	Contrôle
Cyt b <sub>6</sub> f	Cytochrome b <sub>6</sub> f
E	Efficacité
FI	Induction de fluorescence
F0	Niveau minimal de fluorescence ou Fluorescence à l'obscurité
Fm	Niveau maximal de fluorescence
Fv	Fluorescence variable, Fm – F0
Fd	Ferrédoxine
gfp	Green fluorescent protein
Gluc	<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i>
GM	Génétiquement modifié
GMM	Microorganisme génétiquement modifié
NADP <sup>+</sup>	Nicotine-amide dinucléotide
Nor	Normalisé
PGPB	Plant growth promoting bacteria
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
Pheo	Phéophytine, accepteur primaire du photosystème II
PC	Plastocyanine
PCR	Polymerase chain reaction
PQ	Plastoquinone (quinone oxydée)
PQH2	Plastoquinol ou plastoquinone (quinone réduite)

PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Tm	Température de dissociation
UFC	Unité formatrice de colonie



## LISTE DES SYMBOLES

$\alpha$	Alpha
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
$\text{D}_1$	Protéine de 32kDa du centre réactionnel du photosystème II
$\text{D}_2$	Protéine de 34kDa du centre réactionnel du photosystème II
$\pm$	écart-type
$\sim$	environ
g	Gramme
h	heure
LHC	Complexe antennaire de chlorophylle
$\mu$	Micro
ml	Millilitre
$\text{P}_{680}$	Chlorophylle photo-oxydable du centre réactionnel du photosystème II Donneur primaire d'électrons du photosystème II
$\text{P}_{680}^*$	$\text{P}_{680}$ excité
$\text{P}_{700}$	Chlorophylle photo-oxydable du centre réactionnel du photosystème I Donneur primaire d'électrons du photosystème I
$\text{Q}_A$	Quinone acceptrice primaire du photosystème II
$\text{Q}_B$	Quinone acceptrice secondaire du photosystème II
$\text{S}_0\text{-S}_4$	États redox du complexe de manganèse
$\text{T}_{1/2}$	Temps de demi-vie
$<$	Plus petit que
$>$	Plus grand que

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1. Le maïs

#### 1.1.1. La production de maïs

La production de maïs est d'une grande importance au Canada et ailleurs. Il représente la plus importante culture de céréale mondiale et est largement cultivé au Québec et en Ontario (Mehnaz et al. 2010). Selon Agriculture et Agroalimentaire Canada, le pays a produit 11 715 000 tonnes de maïs entre septembre 2010 et août 2011 dont 1 659 800 tonnes étaient destinées à l'exportation mondiale. Au Canada, le maïs récolté comble les besoins en semence dans les champs, est utilisé dans l'alimentation humaine et animale ainsi qu'au niveau industriel. En effet, en plus d'être comestible pour les humains et les animaux sous forme de grains ou d'ensilage, le maïs est une avenue intéressante pour l'industrie du bioéthanol (Mehnaz et Lazarovits, 2006).

Le bioéthanol, produit à partir de biomasse de blé, de canne à sucre, d'orge et plus particulièrement de maïs, est une source d'énergie facultative aux carburants fossiles qui gagne en popularité. En 2008, selon un rapport du centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ), on comptait 142 usines américaines productrices de bioéthanol ayant une capacité de production de plus de 30,5 milliards de litres par année. Des mesures incitatives gouvernementales leur permettraient d'atteindre une production de 132 milliards de litres d'ici 2017. Au Canada, on compte 15 usines ayant une production de 1,6 milliard de litres d'éthanol par année. Huit des 15 usines, dont celle située à Varennes au Québec, utilisent le maïs comme matière première (CRAAQ, 2008).

### 1.1.2. Les fertilisants

Pour une croissance optimale, le maïs doit utiliser les macro (ex. C, H, O, N, K, Ca, Mg, P, etc.) et micronutriments (ex. Cl, Fe, B, Mn, Zn, Cu, etc.) présents naturellement en quantité limitée dans le sol. L'épandage de fertilisants chimiques est une méthode rapide pour améliorer la disponibilité et la quantité de ces nutriments (Miransari, 2011). Dans un contexte d'agriculture intensive, les engrais chimiques comprenant les engrais azotés, potassiques et phosphatés sont nécessaires pour fournir aux plants des nutriments en quantité suffisante et optimiser le rendement des récoltes. Selon M. Jacques Diouf, directeur général de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), il semble impossible de se passer des engrais chimiques pour nourrir 6 milliards d'humains sur terre (et 9 milliards à l'horizon 2050).

Du point de vue de la rentabilité, il est reconnu qu'une grande partie des coûts de production de maïs-grain est l'utilisation des fertilisants chimiques (Mehnaz et Lazarovits, 2006). Selon un rapport de La Financière Agricole Québec (La Financière Agricole Québec, 2011), lors de la saison estivale 2009, on a estimé que les coûts de fertilisation (472,90 \$/hectare récolté) correspondaient à 24,9 % des coûts de production totaux du maïs (1 896,61 \$/hectare récolté). Comparativement, le coût d'épandage de pesticides est de 69,12 \$/hectare récolté et de semence est de 187,82 \$/hectare récolté.

Plus précisément, l'utilisation de 9-11 kg d'azote permet la production d'une tonne de maïs par hectare (Anuar et al. 1995), mais représente de 45 % à 48 % des coûts de fertilisation (Wilcox, 2005). Moins de 50 % des fertilisants en azote ajouté est utilisé par la plante (Halvorson et al. 2002) donc plus 50% se retrouve dans l'environnement.

### 1.1.3. La pollution associée à la production de maïs

L'utilisation massive d'engrais chimique détruit les microorganismes et les insectes non pathogènes qui protègent la plante rendant les récoltes plus susceptibles aux maladies (Mahdi et al. 2010). Elle débalance l'activité enzymatique des

microorganismes du sol et provoque une contamination des sols et des bassins d'eau, entre autres par les nitrates et les phosphates.

Des nutriments comme l'azote et le potassium ont une mobilité relative plus élevée que d'autres nutriments tels le phosphore, le calcium, le magnésium et les micronutriments, ce qui les rend plus disponibles pour les plantes, mais également plus vulnérables au lessivage par les eaux (Miransari, 2011). Ainsi, dans les champs, il peut arriver que seulement 22 % de l'engrais azoté ajouté soit utilisé par la culture (Schindler et Knightin, 1999). L'azote non utilisé se retrouve dans le sol, infiltre l'écosystème aquatique, se volatilise dans l'atmosphère et se dépose ailleurs (Carpenter et al. 1998). Ceci conduit à divers problèmes de pollution (Driscoll et al. 2003) comme la contamination des sols et des eaux souterraines (Montanez et al. 2012) et l'eutrophisation des lacs et rivières (Mehnaz et al. 2010).

Une moyenne de seulement 20 % de l'engrais ajouté sera disponible pour la plante dans la première année qui suit la fertilisation avec un nutriment moins mobile tel le phosphore (Maransari et Mackenzie, 2011). Le résiduel précipite et les phosphates ( $PO_4$ ) en excès se retrouvent aussi dans les cours d'eau, provoquent un déséquilibre des substances nutritives et du taux d'oxygène de l'eau qui se traduit par un développement excessif des algues, un développement d'espèces nuisibles et une déstabilisation de l'écosystème.

L'utilisation de quantité élevée de fertilisants peut donc avoir des effets environnementaux négatifs telle la contamination des sols, de l'eau et des zones naturelles en plus d'une influence sur l'activité enzymatique des microorganismes du sol, la structure et le pH du sol (Bohme et Bohme, 2006). D'autres effets néfastes sont aussi difficiles à prévoir (Pedraza, 2008).

Toutes ces réalités sont largement documentées, mais l'utilisation des engrais chimiques est actuellement inévitable pour suffire à la demande agricole mondiale qui ne cesse d'augmenter (Mahdi et al. 2010). La prévision d'une forte demande de maïs-

grain, la hausse des coûts de production et la pollution engendrée par l'utilisation des fertilisants chimiques sont les trois aspects à étudier pour évaluer un changement vers des pratiques agricoles plus économiques et écologiques: l'utilisation de biofertilisants.

## **1.2. Les biofertilisants**

### 1.2.1. L'activité microbiologique de la rhizosphère

La rhizosphère est la zone du sol située près des racines et caractérisée par une activité microbiologique intense. C'est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micro et macronutriments du sol présent en quantité limitée (Gholami et al. 2012). C'est également un environnement caractérisé par un volume très élevé de substances racinaires favorisant une grande population microbienne (Miransari, 2011). Cette population originaire des grains et du sol environnant (Goncerayston et Campbell, 1996; Marschner et al. 2001; Miethling et al. 2000) est habituellement distribuée à une distance de 50  $\mu\text{m}$  des racines de la plante, dont une concentration de plus de  $10^9$  à  $10^{12}$  microorganismes par gramme de sol niche dans les 10 premiers  $\mu\text{m}$  (Miransari, 2011). La microflore du sol est composée de différents types de microorganismes tels plusieurs genres bactériens fixateurs d'azote et des mycorhizes. Ceux-ci peuvent jouer un rôle de stimulation de croissance par l'apport d'éléments nutritifs et de protection des pathogènes environnants (Amarger, 2002).

Plus précisément, on compartimente la rhizosphère en trois grandes composantes qui interagissent ensemble: la rhizosphère sol, la rhizoplane et les racines (Barea et al. 2005). La rhizosphère sol est la zone du sol influencée par les racines due à la libération de substrats qui influence l'activité microbiologique (Barea et al. 2005). Ainsi, durant leur croissance, les racines libèrent activement ou passivement une gamme de composés organiques, surtout des hydrates de carbone tels que galactose, glucose, fucose, mannose, xylose et arabinose, des acides carboxyliques et des acides aminés (Chaboud, 1983). Deuxièmement, la rhizoplane est la surface des racines, incluant les particules du

sol qui y adhèrent (Barea et al. 2005). Plusieurs études ont démontré que les microorganismes du sol interagissent avec les racines des plantes et les constituants du sol à l'interface entre les racines et le sol (Barea et al. 2002a; Bowen et Rovira, 1999; Glick, 1995; Kennedy, 1998; Lynch, 1990; Linderman, 1992). Finalement, les racines font partie du système dû au fait que certains microorganismes, les endophytes, sont capables de coloniser leurs tissus (Bowen et Rovira, 1999; Kennedy, 1998) et influencer leur croissance.

Les interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes dans la rhizosphère sont déterminantes pour la santé des plantes et la fertilité des sols (Gholami et al. 2012). Il est reconnu que ces interactions sont dépendantes des racines vivantes ou du matériel végétal mort disponible, mais également de l'agronomie et de l'écologie (Barea et al. 2005). Les microorganismes du sol sont d'une grande importance dans le cycle des nutriments et dans l'entretien de la santé et de la qualité du sol (Jeffries et al. 2003). Ils sont impliqués dans les activités fondamentales qui assurent la stabilité et la productivité du système agricole et de l'écosystème naturel (Barea et al. 2005).

Les microorganismes provenant de cette rhizosphère peuvent, lorsqu'ajoutés aux graines, à la surface des végétaux ou au sol, coloniser la plante et favoriser sa croissance en augmentant la disponibilité des nutriments (Vessey, 2003). Ainsi, ils agissent comme fertilisants biologiques, appelés biofertilisants. Lorsqu'ils sont d'origine bactérienne et ont un effet positif sur la plante, on peut aussi les caractériser en tant que « plant growth promoting bacteria » (PGPB) (Bashan et Holguin, 1998).

### 1.2.2. Les PGPB

Il est reconnu que la croissance du plant de maïs est influencée par son environnement. On y distingue la phyllosphère, constituée de la partie externe et interne des plantes qui est en contact avec l'air incluant la tige, les feuilles, les fruits et les fleurs, de la rhizosphère qui, telle que définie précédemment, constitue les microorganismes provenant des graines et du sol environnant et vivant à proximité des racines

des plantes (Grayston et Campbell, 1996; Marschner et al. 2001; Miethling et al. 2000). Les PGPB sont des bactéries du sol, de la rhizosphère, de la rhizoplane, de la phyllosphère ou endophytes qui, sous certaines conditions, sont bénéfiques pour les plantes (Bashan et de-Bashan, 2005). Elles sont communément utilisées pour augmenter le rendement de diverses cultures (Bashan et al. 2008). Elles appartiennent à plusieurs genres incluant *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Gluconacetobacter* (Pedraza, 2008).

Les PGPB sont divisées en deux groupes pouvant stimuler la croissance des plantes de façon directe et indirecte. Le premier groupe influence directement le métabolisme de la plante en fournissant les substances qui sont habituellement en quantité limitée dans le sol. On y regroupe les bactéries capables de solubiliser les phosphates insolubles, d'augmenter la production des phytohormones et de fixer l'azote atmosphérique (Amarger, 2002; Bashan et al. 2008). Elles peuvent aussi augmenter la tolérance des plantes à divers stress tels les pesticides et le stress hydrique y compris la sécheresse (Cohen et al. 2009). Les PGPB qui ont la capacité de fixer l'azote peuvent, à l'aide de la nitrogénase, catalyser la réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en ammoniac (Pedraza, 2008). Un genre important, le *Rhizobium*, peut également induire la formation de nodules qui sont des microhabitats associés à la surface racinaire des légumineuses et permissifs à la fixation d'azote (Amarger, 2002). Entre 50 et 100 kg d'azote par hectare de champs de légumes peuvent être ainsi fixé (Mahdi et al. 2010). La contribution globale des microorganismes fixateurs d'azote présents dans le système terrestre et marin est estimée entre 200 et 300 millions de tonnes d'azote fixé par année (Galloway et al. 1995; Karl et al. 2002). Cette fixation biologique offre une source non polluante d'azote et pourrait améliorer la production agricole tout en diminuant l'utilisation des fertilisants synthétiques (Roesch et al. 2008).

Le deuxième groupe bactérien, nommé biocontrôle-PGPB, ne stimule pas directement le métabolisme de la plante. Par contre, il influence indirectement la croissance de celle-ci par la prévention des effets causés par des phytopathogènes tels des bactéries, des mycètes, des nématodes et des virus (Bashan et al. 2008).

Un sous-groupe des PGPB, les PGPR (plant-growth-promoting-rhizobacteria) ou rhizobactéries sont des bactéries bénéfiques de la rhizosphère capables de coloniser le milieu racinaire (Kloepper et al. 1991; Kloepper, 1994). Par définition, elles doivent, en plus de coloniser les racines et favoriser la croissance des plantes, avoir la capacité de survivre et se multiplier dans les nodules en compétition avec la flore normale. Du moins, elles doivent coloniser le temps nécessaire pour exprimer leurs propriétés de protection et de stimulation (Kloepper, 1994).

Les PGPR partagent la rhizosphère avec d'autres organismes, les champignons mycorhiziens arbusculaires communément appelés mycorhizes et ensemble, ils représentent les deux principaux groupes de microorganismes bénéfiques qui colonisent la rhizosphère (Russo et al. 2005). Ces champignons peuvent sécréter des substances qui ont un effet sélectif sur la communauté microbienne (Marschner et Timonen, 2005). Ainsi, leur colonisation peut influencer, le taux de croissance et l'organisation bactérienne en modifiant, entre autres, le nombre de bactéries aérobiques dans la rhizosphère (Barea et al. 2002*b*). L'inverse est également vrai. À titre d'exemple, la relation symbiotique entre *Azospirillum* et les champignons mycorhiziens permet une amélioration de l'établissement de la bactérie dans la rhizosphère tout en favorisant la formation des mycorhizes (Barea et al. 2002*b*).

Ainsi, mis à part les fonctions d'ancrage au sol et prise de nutriments, le système racinaire des plantes médie beaucoup d'interactions avec les microorganismes comme les rhizobia, les mycorhizes, les endophytes, les PGPR et PGPB ainsi que les bactéries pathogènes (Dudeja et al. 2012).

### 1.2.3. Les endophytes

Les bactéries associées aux plantes et isolées de la rhizoplane et de la phylloplane sont connues sous le terme épiphytes (Andrews et Harris, 2000) tandis que celles isolées



de l'intérieur des tissus, qui y habitent sans nuire à leur hôte sont appelées endophytes (Azevedo et al. 2000; Petrini et al. 1989).

En général, les bactéries endophytes proviennent de communautés bactériennes épiphytes, de la rhizosphère ou de la phyllosphère aussi bien que des graines ou de matériels de propagation infestés (Hallmann et al. 1997). La densité de population des endophytes est très variable et dépend de l'espèce bactérienne, du génotype de l'hôte, de son stade de développement et des conditions environnementales (Dudeja et al. 2012). On les retrouve chez la plupart des espèces végétales, généralement en moindre quantité que les pathogènes, soit de façon latente ou colonisant activement, localement ou de façon généralisée les tissus des végétaux (Hallmann et al. 1997).

Les endophytes ne résident pas dans les cellules des plantes et/ou ne sont pas entourés d'une membrane; ils colonisent l'intérieur de leur hôte en grande quantité ou non, sans causer de dommages, sans susciter des symptômes de maladies, sans induire d'hypersensibilité ou de fortes réactions de défenses (Hallmann et al. 1997, Reinhold-Hurek et Hurek, 2011). Une étude de Chi et al. (2005) a démontré que l'espace intercellulaire des cellules corticales ainsi que les cellules lysées sont les principaux sites de colonisation par les endophytes, avec des densités cellulaires localement élevées, allant jusqu'à  $10^{10}$  cellules/cm<sup>3</sup>. Une étude effectuée avec *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolée dans la sève semble nuancer cette hypothèse (Reis et al. 2000) en déterminant que les cellules du xylème peuvent également être envahies, mais souvent dans des densités plus faibles.

Afin de coloniser le tissu végétal et ne pas être reconnu à titre de pathogène, tous les endophytes doivent être compatibles avec la plante hôte (Dudeja et al. 2012). Historiquement, les bactéries endophytes ont été considérées comme des phytopathogènes peu virulents. Sur un plan évolutif, les endophytes semblent être intermédiaires entre les bactéries saprophytes et les phytopathogènes. On ne saurait que spéculer à savoir si les endophytes évoluent vers la pathogénicité ou s'ils sont plus

hautement évolués que les phytopathogènes du fait qu'ils conservent un abri protecteur et une source d'éléments nutritifs en ne tuant pas leur hôte (Hallmann et al. 1997).

Les PGPB endophytes stimulent la croissance des plantes en les aidant à acquérir des nutriments par, entre autres, la fixation d'azote, la solubilisation des phosphates, la chélation du fer et par la production de régulateurs de croissance ou phytohormones, comme les auxines, les cytokines et les gibbérellines (Compant et al. 2010; Dudeja et al. 2012; Weyens et al. 2009). Plusieurs de ces endophytes ont un effet indirect sur la croissance de la plante. On leur a attribué un rôle dans l'induction des mécanismes de défense de l'hôte ainsi qu'un rôle de protection contre les pathogènes. C'est par la sécrétion de substances antifongiques et antibactériennes ou par la compétition pour la colonisation des sites et l'utilisation des nutriments que les endophytes protègent l'hôte (Compant et al. 2010; Dudeja et al. 2012; Weyens et al. 2009).

Un intérêt croissant est démontré envers l'inoculation des plantes avec ce type de microorganismes au bénéfice de la production (Barea et al. 2005). Au niveau agricole, certains endophytes peuvent accélérer l'émergence des semis, promouvoir l'établissement de la plante sous des conditions défavorables et ainsi améliorer la croissance de la plante (Dudeja et al. 2012). À titre d'exemple, l'inoculation d'*Azospirillum* permet d'augmenter l'état et la survie des grains de cactus dans les zones de désert (Bashan et al. 1999).

Expérimentalement, afin de prouver qu'ils colonisent l'intérieur du tissu analysé, les endophytes sont isolés suite à la stérilisation de la surface de l'échantillon de plante (Dudeja et al. 2012). Malgré le fait que plusieurs définitions ont été proposées pour les bactéries endophytes, si on considère les limitations expérimentales, on peut les définir comme les bactéries extraites de l'intérieur de tissus végétaux dont la surface a été désinfectée sans dommage visible (Hallmann et al. 1997). Cette définition inclut les symbiotes bactériens aussi bien que les bactéries non pathogènes qui colonisent l'intérieur des plantes (Hallmann et al. 1997).

Plusieurs recherches ont été effectuées afin d'étudier le caractère endophytique bactérien lors de la colonisation des tissus végétaux. Tout d'abord, les endophytes ont été rapportés en association avec plusieurs plantes autant les monocotyles que les dicotylédones incluant le maïs (Muthukumarasamy et al. 2002; Reinhold-Hurek et Hurek 1998). Par exemple, le caractère endophytique de *Burkholderia* est retrouvé dans les nodules des racines d'acacia (Hoque et al. 2011), les nodules de mimosa pudica (Pandey et al. 2005) et les racines de soja (Kuklinsky-Sobral et al. 2004). Une de ses espèces *B. cepacia* colonise les nodules et l'apoplasme des racines d'arachide (Ibanez et al. 2009; Kishore et al. 2005).

La comparaison de la population externe et interne du maïs et du coton a révélé que la plupart des bactéries de l'intérieur des racines sont aussi présentes dans la rhizosphère. Ceci suggère que beaucoup de bactéries du sol ont des propriétés invasives dans la plante (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). D'autres recherches sur le terrain semblent démontrer que la migration verticale durant la croissance de la plante est restreinte à la zone qui contient les racines des plants inoculés (Amarger, 2002). À titre d'exemple, deux bactéries communes de la rhizosphère *Rhizobium* et *Azospirillum* ne réussissent pas à s'établir sur les feuilles, mais ont la capacité de coloniser les racines (Lindow et Brandl, 2003). Par contre, même si le déplacement de certains endophytes semble limité aux racines, d'autres études ont conclu que le déplacement vertical vers d'autres tissus est possible. Ainsi, la colonisation des tissus de la plante a été rapportée pour plusieurs bactéries Gram négatives diazotrophes, incluant *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* dans la canne à sucre et *Azoarcus* sp. dans l'herbe de Kallar et le riz (Balsanelli et al. 2010). *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp et *Azoarcus* spp, peuvent infecter l'intérieur des plants de graminées sans causer des symptômes de maladies, mais ne survivent pas dans le sol (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). *Pseudomonas chlororaphis* peut être retrouvé dans la racine, mais également à l'intérieur du maïs, du blé et du brocoli (Gagliardi et al. 2001; Nairn et Chanway, 1999; Snyder et al. 1999). *B. cepacia* peut coloniser les racines et la tige de haricot (Lee et al. 2005). Deux espèces, *A. lipoferum* et *A. brasilense* ont été isolées des racines et des tiges de plant de riz et de canne à sucre (James et al. 2000; Ladha et al. 1982; Reis et al.

2000). *G. diazotrophicus* peut coloniser les racines, les feuilles et les tiges de maïs (Tian et al. 2009). *Herbaspirillum* et *Azorhizobium caulinodans* peuvent également coloniser le xylème de la canne à sucre (James et al. 1997) et du plant de riz respectivement (Gopaldaswamy et al. 2000). Une autre étude faite avec des échantillons de maïs au Brésil a également démontré que plusieurs endophytes dominants, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella* et *Raoultella*, colonisent les racines et la tige (Roesch et al. 2008). Enfin, le genre *Azospirillum* a été retrouvé dans la rhizosphère, dans les racines et la tige de maïs au Brésil (Roesch et al. 2008) et a été trouvé en association avec les plants de maïs dans plusieurs autres études à l'aide de méthodes dépendantes de la mise en culture (Baldani et al. 1986 *a* et *b*; Baldani et Dobereiner, 1980; Palus et al. 1996) ainsi que par des méthodes indépendantes de la mise en culture (Chelius et Triplett, 2001).

#### 1.2.3.1. *Azospirillum*

*Azospirillum*, genre bactérien de la famille des Spirillaceae, est utilisée en agriculture depuis plus de 25 ans dans plusieurs pays et est couramment isolée de la rhizosphère d'une grande variété d'herbes et de céréales (Amarger, 2002; Mahdi et al. 2010). Les espèces d'*Azospirillum* sont des bactéries aérobiques et hétérotrophes qui colonisent en grande quantité la rhizosphère des graminées (Kennedy et al. 2004; Kennedy et Tchan, 1992). Certaines espèces d'*Azospirillum* y survivent sur une longue période et peuvent même persister dans le sol en l'absence de la plante (Oliveira et al. 2004). *Azospirillum* a la capacité de pénétrer le système racinaire et croître à titre d'endophyte dans les crevasses intercellulaires (Sumner, 1990).

Les espèces d'*Azospirillum* sont également considérées faisant partie des PGPR (Bashan, 1999; Lucy et al. 2004; Okon, 1994; Zahir et al. 2004). Elles sont des bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques (Hayat et al. 2010) et peuvent fixer entre 20 à 40 kg d'azote par hectare de champs (Mahdi et al. 2010). Des expériences en serre ont démontré que leur inoculation augmente significativement la teneur en azote des feuilles de canne à sucre (Muthukumarasamy et al. 1999). Une expérience effectuée avec le blé

utilisant des techniques de traçage de l'azote a également démontré que 7 à 12 % de l'azote fixé provenait de la fixation d'azote biologique par *A. lipoferum* et *A. brasilense* (Malik et al. 2002).

Les *Azospirillum* peuvent également produire des composés antifongiques et antibactériens, des régulateurs de croissance et des sidérophores (Pandey et Kumar, 1989). Elles peuvent stimuler la croissance des plantes, plus précisément les racines, via plusieurs mécanismes incluant la production de phytohormones telles que l'acide abscissique, l'acide indole-3 acétique (AIA) de la famille des auxines et les gibbérellines (Cohen et al. 2009). Ces phytohormones influencent le taux de respiration des racines de l'hôte, le métabolisme et la prolifération des racines d'où l'amélioration de la consommation d'eau et des minéraux par la plante inoculée (Okon et Itzigsohn, 1995).

Des études en serre et en champs ont permis de déterminer que la bactérie a des effets bénéfiques sur le rendement de la production de blé (El Mohandes, 1999; Hegazi et al. 1998; Ganguly et al. 1999). Les plants de blé traités avec *A. brasilense* Sp245 exposent des racines plus courtes, une formation des poils racinaires augmentée et une biomasse aérienne accrue (Isawa et al. 2010). Cependant, une souche mutante qui ne peut pas produire d'AIA n'a pas favorisé la croissance de l'hôte (Spaepen et al. 2008). Ceci suggère que l'effet sur la croissance des plantes est dû à l'AIA produite par *A. brasilense* Sp245. Chez la tomate, *A. brasilense* Sp7 et *Azospirillum* sp. BNM-65 présentent également des effets positifs sur la biomasse des pousses et des racines, cependant, une augmentation du développement de maladies bactériennes a été observée (Romero et al. 2003). *Azospirillum* sp. B510, isolée de tige stérilisée de plant de riz poussé en champs, a été sélectionnée à titre d'inoculant endophyte bénéfique pour la production de riz au Japon (Isawa et al. 2010). En effet, lorsqu'inoculé en serre ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>), B510 a augmenté significativement la croissance de la biomasse c'est-à-dire des feuilles et des pousses des plants de riz (Isawa et al. 2010). Dans une étude en serre sur le riz, l'inoculation d'*Azospirillum lipoferum* a augmenté le rendement du plant à plus de 6,7 g par plant (Mirza et al. 2000) et l'inoculation des grains de maïs avec la

souche *Azospirillum lipoferum* CRT1 a induit des changements dans la longueur de ses racines (El Zembrany et al. 2007).

Une autre étude d'*A. lipoferum* avec des plants de maïs a démontré que la présence de la bactérie réduit le stress hydrique et peut même éviter la sécheresse (Cohen et al. 2009). Elle a un potentiel pour la dégradation de contaminants organiques et on lui attribue le mérite de provoquer une augmentation de la récolte de 5 à 30 % (Amarger, 2002; Lin et al. 2011). Au Brésil, les tests sur le terrain effectués avec *A. lipoferum* indiquent que la bactérie peut apporter une contribution importante à la culture du maïs. Ils ont estimé que si son utilisation pouvait permettre de réduire de 50 % la quantité de fertilisants azotés ajoutée lors de l'épandage de produits chimiques, ceci correspondrait à une réduction de 52 kg d'azote par hectare de champ pour 14,1 millions d'hectares (Hungria et al. 2010).

En France, la compagnie Liphatech a commercialisé *A. lipoferum* à titre de fertilisant pour le maïs sous le nom de AzoGreen-m (Jacoud et al. 1999). AzoGreen-m se présente sous forme de poudre dans un seau de 21 kilos contenant les bactéries et un support organique. Selon la compagnie, Azogreen est introduit dans le sol au moment du semis grâce au système de microgranulation que l'on trouve sur la plupart des semoirs, et dans ces conditions, la souche sélectionnée montre un résultat significatif de doublement du volume racinaire.

#### 1.2.3.2. *Gluconacetobacter*

*Gluconacetobacter diazotrophicus*, anciennement *Acetobacter diazotrophicus*, est une espèce de la famille des Acetobacteraceae reconnue pour sa capacité de fixation d'azote atmosphérique au niveau de la canne à sucre (Sevilla et al. 2001). Elle peut fixer jusqu'à 150 kg d'azote par hectare de canne à sucre par année (Boddey et al. 1991). Cette bactérie vit dans l'espace intercellulaire des racines, de la tige et des feuilles et elle peut fournir le plant selon ses besoins en azote (Boddey et al. 1991). Une étude faite en Inde a déterminé que la population de *G. diazotrophicus* a été reportée entre  $10^6$  à  $10^7$

cellules par gramme de tissus frais de canne à sucre (Muthukumarasamy et al. 1999). Sa nature endophytique dans les racines, les tiges et les parties aériennes de la canne à sucre a été confirmée au Brésil (Reis et al. 2000).

*G. diazotrophicus*, retrouvée en grande quantité dans les racines et tiges de canne à sucre (Stephan et al. 1991) a également été isolée de la rhizosphère de maïs au Brésil (Roesch et al. 2008). C'était la seule espèce fixatrice d'azote connue du genre *Gluconacetobacter* jusqu'à ce que Jimenez-Salgado et al. (1997) isolent deux autres bactéries productrices d'acide indole-acétique (AIA) et fixatrices d'azote de la rhizosphère de plant de café, *Gluconacetobacter johannae* et *Gluconacetobacter azotocaptans* (Fuentes-Ramirez et al. 2001).

Ce n'est que récemment que Mehnaz et Lazarovits (2006) ont isolé *G. azotocaptans* de la rhizosphère d'une variété de maïs d'Ontario. La bactérie est naturellement adaptée aux conditions de croissance du maïs et sa découverte permettait de supposer qu'elle devait avoir un rôle important dans la croissance des plants (Mehnaz et Lazarovits, 2006). Leur étude a permis d'observer ses effets bénéfiques et démontrer que son utilisation avec le maïs est prometteuse. *G. azotocaptans* peut, selon la variété de maïs utilisée, augmenter significativement le poids des racines et de la pousse. La bactérie peut fixer l'azote atmosphérique, produire de l'AIA, possède une activité antifongique et peut également solubiliser les phosphates. La bactérie pourrait être un candidat potentiel à titre de biofertilisant (Mehnaz et Lazarovits, 2006). Toutefois, peu de recherche sur cette espèce a été effectuée avec le maïs et l'information disponible provient de leur étude.

Au Canada, d'autres cultures pourraient bénéficier de l'utilisation de *Gluconacetobacter*. En effet, un brevet a été déposé à l'Office de la propriété intellectuelle du Canada concernant l'invention d'un inoculant contenant *Gluconacetobacter*. Cet inoculant serait destiné à améliorer la production de culture à haute teneur en sucre telle la betterave tout en réduisant l'utilisation d'engrais azoté

(demande de brevet #CA 2735269). Deux avantages associés à l'utilisation d'un biofertilisant efficace.

#### 1.2.4. L'efficacité des biofertilisants

Les premières cultures qui ont bénéficié de l'inoculation de bactéries sont des cultures maraîchères (Amarger, 2002). Des bactéries associées à la rhizosphère qui peuvent fixer l'azote et solubiliser les phosphates ont été utilisées comme inoculum pour des cultures tels le maïs, le blé, le riz, et la canne à sucre (Dobereiner, 1997; Schilling et al. 1998). Aujourd'hui, des millions d'hectares de champs de différentes variétés de légumes sont inoculés avec plusieurs genres et espèces de *Rhizobium* chaque année dans le monde entier (Catroux et al. 2001). Malgré le fait que *Rhizobium* ne peut s'associer qu'à des espèces spécifiques de plantes, son utilisation a tout de même permis d'introduire des plants de légumineuses en dehors de leur pays d'origine. En effet, en moins de 50 ans, grâce à son inoculation, on a réussi à étendre la production de soya, originaire de la Chine, dans le monde entier (Amarger, 2002).

Actuellement, au Québec, il est possible de se procurer des biofertilisants dans plusieurs centres horticoles. À titre d'exemple, l'ajout de champignons mycorhiziens est recommandé lors de la transplantation d'arbre et arbustes. Ceux-ci, cités précédemment, sont l'autre groupe majeur d'organisme qui entretient une relation mutualiste avec les plantes. Ils établissent une symbiose avec les racines de la plupart des espèces végétales. Les champignons mycorhiziens du sol colonisent le cortex des racines et développent un mycélium externe qui sert de pont entre les racines et le sol les entourant (Barea et al. 2005). La symbiose peut être retrouvée dans la plupart des écosystèmes pour améliorer l'état des plantes et la qualité du sol (Barea et al. 2005).

Il faut également considérer que le biofertilisant inoculé peut être un endophyte. Pour coloniser l'intérieur de la plante et influencer son développement, la structure dynamique qu'est la microflore endophyte dépend de plusieurs facteurs abiotiques et



biotiques. Par exemple, tous les paramètres perturbant le statut nutritionnel des plantes peuvent affecter leur communauté (Hallmann et al. 1997).

Que ce soit un endophyte, un PGPR ou un PGPB, plusieurs facteurs sont à considérer concernant la colonisation adéquate des racines par les microorganismes introduits. Par exemple, l'efficacité d'attachement aux surfaces, la capacité d'utilisation des nutriments excrétés par les racines, la résistance au stress environnemental et la compétition avec la flore indigène ont une importance (Amarger, 2002). Toute population de bactéries ajoutée au niveau de la plante se retrouve dans cet environnement hostile et possède trois phases de croissance. Tout d'abord, à la suite de l'inoculation, on observe une diminution rapide du nombre de microorganismes. Cette diminution marquée semble associée à un manque d'adaptation des microorganismes aux nouveaux stress environnementaux (Selbitschka et al. 2006). La prédation, les bactériophages et les inhibiteurs de croissance font partie de ces nombreux stress (Van Veen et al. 1997). Une étude effectuée avec une bactérie GM *Sinorhizobium meliloti* (luc+) a démontré une densité de population dix fois moindre suivant l'inoculation (Schwieger et al. 2000). Avec les années, on observe une stabilisation de la population bactérienne incluant des fluctuations saisonnières. Un déclin associé au labourage et à l'extraction des plants est ensuite observé.

L'échec d'efficacité de l'inoculation ou un faible taux de survie de l'inoculum peut, entre autres, être dû à un inoculum de faible qualité, à une mauvaise persistance à la suite de l'inoculation ou à une compétition infructueuse avec la population indigène (Amarger, 2002). Lors d'une étude avec un GMM, il a été déterminé que la survie de la souche peut être augmentée si celle-ci est adaptée aux conditions environnementales avant l'inoculation (Gu et Mazzola, 2001). Cette adaptation favorise la compétition avec la flore indigène. Sinon,  $10^6$  cellules par gramme de sol doivent être inoculées pour espérer une survie de  $10^3$  cellules par gramme.

L'espèce de plante colonisée et le type de sol influencent l'interaction entre la rhizosphère et son environnement (Marschner et al. 2001). Plus précisément, les

caractéristiques du sol et sa composition peuvent influencer la survie du nouvel organisme. La densité du sol à la suite de la compaction, la capacité de rétention d'eau par le sol, les composés organiques peuvent également modifier la population microbienne et l'activité enzymatique. Par exemple, un pourcentage élevé de  $\text{CaCO}_3$  et une composition trop fine ou trop grossière du sable ont démontré avoir un impact négatif sur la viabilité d'*Azospirillum brasilense* (Bashan et al. 1995; Van Veen et al. 1997) tandis que la quantité de limon, de phosphore, de potassium, la conductivité du sol, le pH et le ratio C/N n'ont pas d'effet apparent sur sa viabilité (Bashan et al. 1995).

La méthode utilisée pour introduire l'inoculum, incluant l'utilisation possible de matériel transporteur comme l'argile, tout comme le stade physiologique de l'inoculum affectent sa survie dans le sol et sa dispersion dans la phyllosphère (de Leij et al. 1994; de Leij et al. 1995; Bjorklof, 2002). À titre d'exemple, *Pseudomonas putida* s'établit avec une plus grande densité cellulaire quand la bactérie est introduite enrobée sur le grain de maïs ou de haricot (Molina et al. 2000). Les GMM qui enrobent les semences s'établissent également dans la rhizosphère avec une plus grande densité cellulaire (approximativement  $10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de sol) (Hirkala et Germida, 2004).

De plus, les pesticides ou les herbicides, comme le glyphosate ou la combinaison du bromoxynil et du prosulfuron utilisés en agriculture pourrait réduire la survie des microorganismes du sol (Joergensen et Emmerling, 2006; Kutuzova et al. 2006; Malyt et al. 2006; Pampulha et Oliveira, 2006; Ratcliff et al. 2006; Singh et Datta, 2005). La réponse varie entre les études et les microorganismes.

Ainsi, l'introduction d'une nouvelle population ne suffit pas afin d'observer les effets désirés. Le maintien de cette population en quantité optimale active et pendant toute la croissance des plants sont autant de défis que propose l'utilisation des biofertilisants (Amarger, 2002). Cette solution alternative pourrait donc être intéressante dans la mesure où, elle diminuerait la quantité de produits chimiques utilisée et elle augmenterait la fertilité des sols et le rendement des récoltes (Wu et al. 2005). L'utilisation des biofertilisants à long terme est économique, pro-environnement, plus

efficace, plus productif et accessible aux petits producteurs que les fertilisants chimiques (Venkataraman et Shanmugasundaram, 1992), mais deux facteurs limitent leur efficacité, la survie et la persistance de la population introduite.

#### 1.2.5. La dispersion et persistance des biofertilisants

Le terme OGM ou organisme génétiquement modifié fait référence à un organisme dont le matériel génétique a été modifié par l'introduction d'un ou de plusieurs gènes étrangers afin de lui conférer une caractéristique nouvelle ou améliorée qui sera transmissible à la descendance (Office québécois de la langue française). L'organisme en question peut référer à une plante dont on a modifié le génome, mais également à un microorganisme génétiquement modifié (« GMM » ou genetically modified microorganism).

L'utilisation d'OGM dans l'agriculture est particulièrement répandue chez les plantes. Par souci de performance des récoltes, des lignées de pommes de terre, de soya, de canola et de maïs génétiquement modifié ont déjà été développées et approuvées au Canada. Citons, par exemple, la lignée de maïs résistante à la sécheresse MON 87460 des compagnies Monsanto et BASF et les lignées de maïs dans lesquelles on a pu introduire le gène toxique de *Bacillus thuringiensis* (Bt), biopesticide utilisé depuis maintenant plus de 60 ans pour le contrôle des dommages causés aux plantes par les insectes (Meadows et al. 1992; Udayasuriyan et al. 1995).

En parallèle avec le développement et l'utilisation de produits agricoles issus de biotechnologie, un nombre croissant de microorganismes du sol sont mis en marché. De nouveaux GMM sont développés afin de permettre, entre autres, une plus grande expression de leur propriété bénéfique, une augmentation de leur survie et de leur persistance. Tout en favorisant la croissance de l'hôte, de nouveaux inoculums microbiens génétiquement modifiés respectueux de l'environnement peuvent être utilisés pour la protection des plantes envers les maladies (Barea et al. 2005). De

nouveaux gènes peuvent également être introduits pour faciliter l'acquisition efficace des nutriments ou permettre une plus grande adaptation aux stress environnementaux.

La vitesse et la distance de dispersion ainsi que la persistance à long terme des produits recombinants font partie des questionnements en lien avec l'utilisation des GMM (Dighton et al. 1997). Par exemple, pour plusieurs souches de *Rhizobium*, l'utilisation de gènes marqueurs a été utile pour étudier leur survie, leur persistance et leur dispersion dans l'environnement ainsi que pour évaluer la sécurité associée à l'augmentation délibérée de ce type de bactérie dans nos champs (Amarger, 2002). Ces gènes marqueurs permettent la reconnaissance des transformants, entre autres, par la production d'une protéine fluorescente (gfp), par la capacité d'utilisation d'un sucre tel le lactose ou par la résistance à un antibiotique.

Ainsi, Selbitschka et al. (2006) ont observé une dispersion aérienne de 3 mètres en 14 semaines suite à l'application liquide d'un *Sinorhizobium meliloti* strains L1 et L33 génétiquement modifié (GM) à la surface du sol. Ripp et al. (2001) ont déterminé que la vitesse de dispersion d'un GM *Pseudomonas fluorescens* peut atteindre 30 millimètres par jour. D'autres chercheurs ont pu évaluer une persistance du GM *Pseudomonas putida* WCS358r allant entre 60 et 120 jours à  $10^2$  UFC par gramme de sol après les semences (Viebahn et al. 2003) jusqu'à une persistance de 15 ans pour le transgène *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CT0370 à une concentration de  $10^4$  à  $10^5$  UFC par gramme de sol (Hirsch, 2004). La population de GM *Pseudomonas fluorescens* peut persister à une concentration de  $10^6$  UFC par gramme de racines pendant la croissance des plants et après 200 jours à la suite de la récolte malgré la décomposition de la majorité des racines (de Leij et al. 1995; Pitkajarvi et al. 2003). Pour le GM *Pseudomonas chlororaphis* 3732RN-L11, le ratio C/N du sol a tendance à permettre une persistance plus longue (Gagliardi et al. 2001). Une faible persistance pourrait être due à l'énergie supplémentaire demandée par l'introduction du matériel génétique limitant la compétition avec la bactérie indigène (Sayler et Ripp, 2000). Cette compétition est un facteur important à considérer. Par exemple, lorsque la concentration de la population indigène est plus élevée, moins de 1,4 % des nodules sur les racines de pois sont formés

par GM *S. melitoti* comparativement à 90 % lorsque cette population est plus faible (Corich et al. 2000; Hirsh, 2004).

Grâce aux transgènes, plusieurs chercheurs ont pu également étudier la dispersion des GMM. Ils ont pu déterminer que la dispersion horizontale est associée principalement aux pratiques agricoles, à la topographie et à la flore du sol (Amarger, 2002; Hirsch et Spokes, 1994). En effet, le trafic en champs peut être responsable de la diminution de la dispersion par la compaction du sol et la destruction des macropores (Dighton et al. 1997). La libération des GMM dans un sol mal drainé et plat peut avoir une petite opportunité de dispersion, mais une pente de seulement 10 % est suffisante pour observer une augmentation significative de cette dispersion (Dighton et al. 1997). Une dispersion horizontale de 20 mètres en 12 h a déjà été observée par un GM *E. coli* lorsque la pente était descendante (Rahe et al. 1978). De plus, la dispersion par les vertébrés ou invertébrés est mineure comparativement au sarclage mécanique (Hirsch et Spokes, 1994). Tout de moins, quelques bactéries ingérées colonisent l'intestin des animaux et sont propagées horizontalement de cette manière (Bjorklof, 2002; Dighton et al. 1997; Hoffmann et al. 1999).

Par contre, la présence des invertébrés est un facteur d'importance dans la dispersion verticale. En effet, il est connu que le mouvement des vers sur une longue distance (mètres) permet une grande surface de dispersion des microorganismes du sol (Dighton et al. 1997). À titre d'exemple, le mouvement vertical des bactéries *Rhizobium japonicum* et *Pseudomonas putida* dans l'eau de percolation est augmenté par la présence du vers de terre *Lumbricus rubellus*. La dispersion observée est de plus de 15 à 20 centimètres (Doube et al. 1994). Les collemboles, important vecteur de migration verticale pour les GMM, transportent les bactéries dans leur système digestif et leur tégument sur une distance de 10 à 100 centimètres (Dighton et al. 1997). La rhizosphère, les courants d'eau et les propriétés du sol, incluant sa texture physique telles la proportion relative de sable, de limon, d'argile et de matières organiques, et sa capacité d'absorption influencent également le transport des microorganismes (Amarger, 2002;

Dighton et al. 1997). Les études avec des GMM ont permis de démontrer qu'une dispersion verticale jusqu'à 2,5 mètres peut être observée (Troxler et al. 1998).

Lorsque le GMM introduit est un endophyte, la dispersion verticale entre les racines et les tissus aériens est favorisée. En champs, les endophytes peuvent être portés par les grains, transmis verticalement ou par des vecteurs. Souvent, ils proviennent du sol et coloniseront tout d'abord la rhizoplane (Compant et al. 2010; Hardoim et al. 2008; Van der Lelie et al. 2009). Puisque le sol représente un bassin très riche de bactéries où les racines sont particulièrement vulnérables à l'invasion, les endophytes dérivés du sol ou de la rhizosphère sont importants dans la plante (Dudeja et al. 2012). Sans la percolation de l'eau, la dissémination à travers le sol pourrait être limitée à la colonisation de la rhizosphère (de Leij et al. 1995; Trevors et al. 1990).

Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant l'entrée de ces endophytes dans le tissu végétal, mais les cellules de la coiffe, enveloppe protectrice des racines des végétaux, pourraient être le site d'entrée le plus probable de l'organisme bactérien dans les racines (Pedraza, 2008). En champs, le site pour la pénétration active des endophytes dans les racines semble être le point d'émergence des racines latérales et la zone de différenciation et d'allongement à proximité de l'extrémité des racines. Les tissus légèrement perturbés ou non complètement différenciés peuvent faciliter la pénétration (Reinhold-Hurek et Hurek, 2011). C'est la colonisation des tissus vasculaires qui est susceptible de permettre la diffusion systémique dans les pousses (Compant et al. 2005; Compant et al. 2010; James et al. 2002).

Les problématiques principales associées à la persistance et à la dispersion de ces produits transgéniques dans l'environnement sont la colonisation d'hôtes non ciblés et/ou le transfert de gènes non désiré. En effet, tout comme pour la population indigène, les gènes ajoutés par différentes méthodes transgéniques peuvent être transférés d'espèce en espèce (Bjorklof, 2002) et peuvent persister dans l'environnement après que l'organisme introduit ait disparu (Hirkala et Germida, 2004). Une proportion considérable de transfert de gènes dans le sol est due à la conjugaison et plusieurs études ont démontré

l'habileté du plasmide à être transféré autant vers le nouvel organisme introduit qu'aux bactéries indigènes dans le sol (Snow et al. 2005). La formation de biofilms aide la survie des cellules contre la dessiccation et génère un endroit adapté pour la proximité cellulaire et le transfert de gènes (Timms-Wilson et Smalla, 2006). Une étude avec une population établie de GM *Pseudomonas fluorescens* a déterminé que le transfert de gènes vers les bactéries des feuilles émergentes d'un champ adjacent est possible (Lilley et al. 1997). Ainsi, la communauté de bactéries retrouvée sur les feuilles est tout autant à surveiller que les bactéries du sol lors des études sur le transfert génétique.

L'insertion de gènes marqueurs dans le génome bactérien facilite les études concernant le déplacement des GMM dans nos champs, mais est également utiles lors du développement de GMM à persistance contrôlée. À titre d'exemple, une bactérie génétiquement modifiée a été transformée pour exprimer un gène suicide en l'absence de l'acide aminé proline provenant des racines de maïs. Cette stratégie de confinement permet la survie du transformant exclusivement à proximité du plant (Van Dillewijn et al. 2001) et pourrait permettre de limiter la colonisation d'hôtes non ciblés.

Les techniques moléculaires utilisées en écologie microbienne permettent également l'amélioration continue des souches d'intérêt, GM ou non, par la compréhension de l'écosystème du sol (Barea et al. 2005) et par l'identification des gènes impliqués dans le processus de colonisation de la plante (Amarger, 2002).

Les GMM sont actuellement sur le marché américain et européen. En septembre 1997, l'Agence de protection environnementale des États-Unis (« Environmental Protection Agency ») a approuvé la commercialisation de *Sinorhizobium meliloti* RMBPC-2 (Dormal PLUSTM (PC-2), Urbana Laboratories, USA), un fertilisant qui lorsqu'inoculé au grain de luzerne augmente la fixation d'azote et l'utilisation des nutriments (Catroux et al. 2001). Certaines souches sélectionnées de PGPR sont également utilisées comme semences (Dobbelaere et al. 2001; Lucy et al. 2004, Vessey, 2003; Sahin et al. 2004; Zahir et al. 2004). Certaines d'entre elles sont génétiquement

modifiées (Morrisey et al. 2002) et conformes à la réglementation européenne (Nutri, 1994).

La demande de rendement agricole de plus en plus élevée pourrait augmenter les probabilités de développement du marché des GMM au Canada. La recherche d'une augmentation de productivité a permis d'étudier l'impact de l'inoculation des PGPB GMM ou non sur la biomasse, mais les effets de l'inoculation de ces bactéries sur le rendement photosynthétique ont été moins explorés.

#### 1.2.6. L'effet des biofertilisants sur la photosynthèse

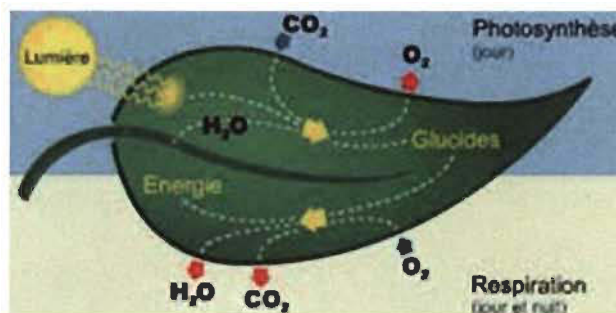
Sous des conditions de culture biologique, l'inoculation des semences de haricots avec la souche de PGPR *Bacillus mycoides* S7 a augmenté le rendement des grains de 41,40 % (Stefan et al. 2013). L'augmentation du rendement peut être attribuée à une absorption efficace des nutriments et de l'eau, mais également aux activités photosynthétiques plus élevées (Baset Mia et al. 2010b). Ces effets pourraient être expliqués par la capacité de la souche S7 à synthétiser de l'AIA qui induit la prolifération des racines (Spaepen et al. 2007). Lors de l'étude de Stefan et al. 2013, ils ont pu observer une augmentation significative des taux de photosynthèse après 20 jours à la suite de l'inoculation par la souche *Bacillus mycoides* S7, après 28 jours à la suite de l'inoculation par *Bacillus pumilus* S4 et après 42 jours à la suite de l'inoculation des deux bactéries seules et combinées (Stefan et al. 2013). Une augmentation du taux de photosynthèse observée à la suite de l'inoculation par des PGPR a également été rapportée par d'autres auteurs (Han et Lee. 2005; Gurska et al. 2009; Zhang et al. 1997).

La photosynthèse (voir Figure 1.1 en page 24) est un phénomène qui, en plus de transformer la plus grande source d'énergie existante, permet la biosynthèse de molécules indispensables à la survie du monde vivant. L'énergie solaire inépuisable est captée sous forme lumineuse et transformée en énergie chimique par les organismes photosynthétiques tels les végétaux, les algues ainsi que certaines bactéries et cyanobactéries afin de synthétiser des molécules biologiques qui sont la base de la



chaîne alimentaire (Balows et al. 1992; Bryant, 1994; Taiz et Zeiger, 1998; Van den Hoek et al. 1996).

Cette conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique se résume ainsi :



**Figure 1.1** Représentation artistique de la photosynthèse dans une feuille présentée d'une manière simplifiée (tiré de Ricoud, 1997). On peut y observer l'utilisation du CO<sub>2</sub> ainsi que le dégagement d'oxygène.

Ultimement, la photosynthèse permet la fixation du carbone et la production d'un précurseur pour la formation du glucose et autres composés organiques, le glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P). C'est par des réactions successives appelées cycle de Calvin que ces composés peuvent être formés. C'est la phase lumineuse qui fournit au cycle de Calvin le NADPH et l'ATP nécessaire à son fonctionnement. En effet, trois molécules d'ATP et deux molécules de NADPH doivent être utilisées pour fixer une seule molécule de dioxyde de carbone. La fixation du carbone sur une molécule de ribulose-1,5-biphosphate (RuBP) est catalysée par l'enzyme la plus abondante sur terre, la rubisco (Dhingra et al. 2004).

La théorie sur la régulation de la relation symbiotique entre les plantes et les rhizobiums fixateurs d'azote et/ou les mycorhizes suppose d'abord que les produits de la photosynthèse sont une ressource limitée pour le plant (Kaschuk et al. 2010). La fixation d'azote biologique peut répondre à la demande azotée pour le plant de légumes, mais utilise jusqu'à 14 % de son carbone produit par la photosynthèse (Kaschuk et al. 2009a). Récemment, il a été démontré par Kaschuk et al. 2009b, que la dépense en carbone

provenant de cette relation symbiotique est compensée par l'augmentation du taux photosynthétique des feuilles. *Rhizobium* et les champignons symbiotiques améliorent de 28 % et 14 % respectivement le taux photosynthétique de la plante inoculée, mais cette augmentation de l'absorption des nutriments (N et P) par ses symbiotes n'explique pas complètement l'augmentation du taux photosynthétique de la plante (Kaschuk et al. 2009 b). Une hypothèse générale est que les rhizobiums et les mycorhizes symbiotiques affectent la photosynthèse de la plante en entier en améliorant sa nutrition et sa croissance. Conséquemment, la surface totale des feuilles est augmentée, mais le taux photosynthétique par unité d'aire de la feuille peut également être augmenté (Kaschuk et al. 2009 b).

De plus, la littérature connue semble suggérer une relation entre la photosynthèse et la production d'AIA, phytohormone produite par certaines bactéries, mais les résultats actuels ne semblent pas suffirent à expliquer clairement cette relation. Une première étude effectuée en 1973 indiquait que l'AIA provoque une stimulation de la photosynthèse en augmentant la photophosphorylation et la fixation de CO<sub>2</sub> (Tamas et al. 1973). À l'inverse, Erkan et Bangerth (1980) qui ont étudié la tomate et le poivron indiquaient que l'AIA réduisait plutôt la photosynthèse. Une étude subséquente avec des tomates hydroponiques indiquait que le traitement des racines par l'AIA n'a pas d'effet sur le taux photosynthétique (Dong et Arteca, 1982). C'est seulement en 1987, qu'un article de Brenner appuyait l'étude de Tamas et al. en indiquant que l'AIA aurait un effet sur l'ouverture des stomates et cet effet d'ouverture pourrait permettre une hausse du rendement de la photosynthèse. Une étude récente effectuée avec le cumin noir semble également démontrer un effet entre le traitement des feuilles avec le 4-Cl-AIA et le taux photosynthétique net (Shoukat Hussain Shah, 2011).

Afin d'éclaircir le fonctionnement des systèmes photosynthétiques, le transport d'électrons dans les photosystèmes sera détaillé.

### 1.2.6.1. Les systèmes photosynthétiques

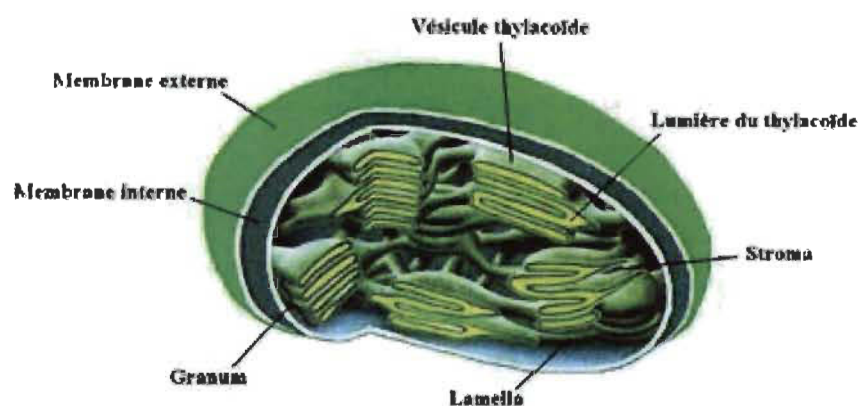
Malgré la diversité des organismes photosynthétiques, on a remarqué que la photosynthèse s'effectue toujours au niveau des membranes. Les membranes photosynthétiques des eucaryotes sont localisées dans des organites spécifiques aux cellules végétales, les chloroplastes. Ceux-ci contiennent des pigments appelés chlorophylle qui sont responsables de la couleur verte des feuilles.

Lors de l'étude de Stefan et al. 2013, après 42 et 59 jours à la suite de l'inoculation des grains, les souches de PGPR *Bacillus pumilus* S4 et *Bacillus mycoides* S7 ont augmenté de façon significative la teneur en chlorophylle (Stefan et al. 2013). Aucune différence significative de la teneur en chlorophylle n'a été observée pendant la phase végétative du plant c'est-à-dire après 20 et 28 jours après l'inoculation des grains (Stefan et al. 2013). Leurs résultats ont démontré que la hausse de la teneur en chlorophylle significativement plus élevée dans les feuilles des plants de haricots inoculés avec les souches S4 et S7 est détectable seulement pendant la floraison précoce et tardive et non pas pendant le stade végétatif. Des études antérieures suggèrent que l'activité accrue de photosynthèse est la conséquence d'une incorporation d'azote plus élevée qui a contribué à la formation de la chlorophylle (Baset Mia et al. 2010a).

Les pigments chlorophylliens responsables de la photosynthèse sont contenus dans les chloroplastes. Ceux-ci sont constitués de trois membranes. Deux membranes lipoprotéiques, une externe et l'autre interne, sont liées et forment l'enveloppe de l'organite. Une troisième membrane constitue en fait un système membranaire interne continu à l'intérieur du chloroplaste. On l'appelle membrane thylacoïde. Cette membrane est unique à cet organite particulier et est constituée de plusieurs replis formant des vésicules aplaties appelées vésicules thylacoïdes. On nomme lamellae les structures qui les relient entre elles. Les vésicules s'empilent en structure ordonnée sous forme de granas. Le système de membrane qu'est le chloroplaste est compartimenté en trois sections (voir Figure 1.2 en page 27): l'espace intermembranaire qui est délimité par la membrane externe et interne, l'espace intrathylacoïdien ou lumière du thylacoïde

qui est simplement l'intérieur de la vésicule thylacoïde ainsi que le stroma, délimité par la membrane interne, constitue un fluide où reposent toutes les structures.

C'est plus précisément au niveau de la membrane thylacoïdienne que se situent les complexes protéiques ainsi que les pigments photosynthétiques (chlorophylle, caroténoïde et phycobilines) responsables de la photosynthèse.



**Figure 1.2** Structure des chloroplastes. Adaptée de Garret et Grisham (2000).

#### 1.2.6.2. Les phases de la photosynthèse

La photosynthèse comprend deux phases. Premièrement, l'énergie solaire est transformée en énergie chimique, le NADPH et l'ATP, dans le système photochimique. Ces phases dites lumineuses ou phases photochimiques ont lieu dans la membrane du thylacoïde du chloroplaste. L'énergie chimique produite peut ensuite être utilisée pour la formation des hexoses, via la fixation de  $\text{CO}_2$  à une molécule de ribulose-1,5-biphosphate ainsi que par une série de réactions enzymatiques réalisées dans le stroma. C'est brièvement la phase obscure ou phase biochimique.

#### 1.2.6.3. Les photosystèmes

Beaucoup de stress environnementaux influencent la productivité des cultures et nuisent au système de transport des électrons conduisant à la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}^{-2}$ , et

$\text{OH}^-$ , qui peuvent s'accumuler et endommager l'appareil photosynthétique (Heidari et Golpayegani, 2012).

Deux chaînes de transport d'électrons font partie de cet appareil photosynthétique: le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII) (voir Figure 1.3 en page 29). Les photosystèmes sont essentiellement l'association de protéines et de pigments. Leur rôle est brièvement de transporter les électrons provenant d'une molécule d'eau vers une molécule de  $\text{NADP}^+$ . Les réactions photosynthétiques du PSII se produisent avant celle du PSI, leur numérotation signifiant simplement l'ordre de leur découverte.

Le principe de transfert des électrons dans les chaînes de transport PSII et PSI est qu'une molécule (X) excitée par un photon ( $X^*$ ) émet un électron et permet ainsi la réduction d'un accepteur (A). L'accepteur d'électron (A) passe ainsi de l'état oxydé (A) à un état réduit ( $A^-$ ). La molécule (X) qui a cédé un électron se retrouve ainsi positive ( $X^+$ ). Afin de revenir à son état initial (X), elle capte un électron provenant d'un donneur réduit ( $D^-$ ) qui devient alors oxydé (D).

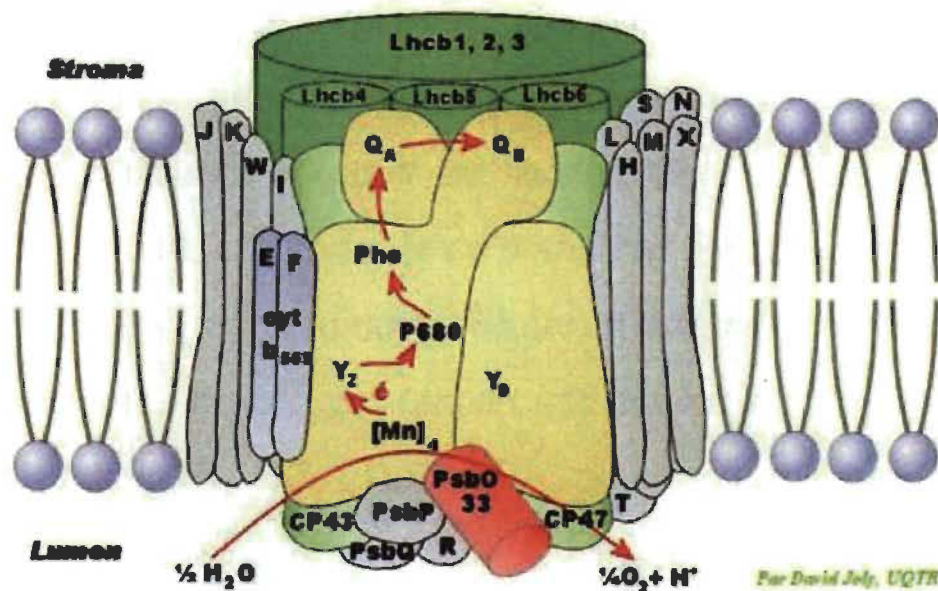
Brièvement, c'est ainsi que le PSII achemine les électrons, par l'intermédiaire d'une plastoquinone (PQ), de la molécule d'eau vers un complexe protéique nommé le cytochrome  $b_6f$  (cyt  $b_6f$ ). Ainsi, une molécule de plastocyanine (PC) présente dans le PSI peut capter les électrons en provenance du cytochrome  $b_6f$  et les transférer vers la ferrédoxine et ultimement le  $\text{NADP}^+$ . Le cyt  $b_6f$  étant ainsi l'intermédiaire entre le PSII et PSI (voir Figure 1.3 en page 29).



Le centre réactionnel du PSII comprend environ 17 protéines transmembranaires, 3 protéines extrinsèques et près de 80 cofacteurs (Ferreira et al. 2004; Kamiya et Shen, 2003; Loll et al. 2005). Il est constitué d'un hétérodimère protéique D1 (produit du gène *psbA*) et D2 (produit du gène *psbD*). Il contient également deux molécules de chlorophylle a, nommées le P<sub>680</sub>, situé à l'interface des protéines D1 et D2 côté lumen du thylacoïde. Il doit son nom au fait qu'il absorbe la lumière à 680nm.

Le COE comprend 3 protéines extrinsèques situées du côté lumen du PSII près de D1. Il porte un atome de calcium, un de chlore ainsi qu'un complexe de 4 atomes de manganèse qui ont, entre autres, pour fonction de fournir des électrons au système photosynthétique. Il contient également la protéine PsbO. Celle-ci sert au maintien structurel du complexe COE et participe à la régulation des atomes de calcium et de chlore nécessaire au dégagement d'oxygène (Gregor et al. 2005). De plus, elle limite l'accès des molécules d'eau au niveau du complexe de manganèse (Gregor et al. 2005). La protéine PsbP participe aussi au maintien de la structure du COE, protège le complexe de manganèse en limitant l'accès des agents réducteurs exogènes et participe à l'assemblage du complexe de manganèse lors de la photoactivation suivant le recyclage du PSII (Bondarava et Krieger-Liszkay, 2005). PsbP, en association avec *psbQ*, participe à la régulation de l'empilement des granas dépendamment des conditions de lumière. Le chlore et le calcium quant à eux sont des ions importants dans le COE puisqu'ils stabilisent les produits intermédiaires de la réaction d'oxydation de l'eau.





**Figure 1.4** Représentation schématique de la structure du photosystème II (David Joly, 2007).

Les flèches représentent le trajet d'un électron dans la suite de réaction d'oxydoréduction du PSII.

Une fonction importante du PSII est de capter les électrons des molécules d'eau en les scindant grâce à l'énergie solaire (voir Figure 1.4 ci-dessus). L'oxydation des molécules d'eau s'effectue dans le lumen du thylacoïde. Les électrons captés peuvent ensuite être transportés à travers le PSII et permettre la réduction des molécules de plastoquinone dans le stroma. Tel que discuté plus haut, le PSII sert ainsi de transporteur d'électrons vers le cytochrome  $b_6f$  et ultimement le PSI.

Le PSII possède deux divisions : un côté receveur d'électron ainsi qu'un côté donneur. La phéophytine, les accepteurs quinoniques primaires et secondaires  $Q_A$  et  $Q_B$  ainsi que le bassin de plastoquinones PQ représentent le côté accepteur d'électrons tandis que le COE, la tyrosine Z ( $Y_z$  ou TyrZ) et le  $P_{680}$  constituent le côté donneur d'électron.

En premier lieu, les antennes photocollectrices de lumière captent l'énergie lumineuse et la transmettent par résonance ou transfert d'excitons vers le centre



réactionnel du PSII, le  $P_{680}$ . Le  $P_{680}$  devient excité ( $P_{680}^*$ ) lors de l'absorption de photons d'une longueur d'onde de 680 nm.

L'énergie transmise est suffisante pour permettre à  $P_{680}$  d'arracher un électron à son donneur d'électron principal, la tyrosine Z située sur la protéine D1. La tyrosine Z extrait ensuite un électron du complexe de manganèse du COE, lequel complexe, arrache ultimement des électrons aux molécules d'eau, et provoque le relâchement des protons et du dioxygène (voir Figure 1.5 en page 33). Plus précisément, la libération d'une molécule d'oxygène nécessite l'extraction de 4 électrons provenant de deux molécules d'eau, ceci est rendu possible par l'accumulation de 4 charges positives hautement oxydantes au niveau du noyau de manganèse. Suite à l'absorption de lumière par les pigments du LHC du PSII, le complexe de manganèse avance dans son état d'oxydation. Les états d'oxydation du noyau, appelés états S, vont de S0 à S4; le passage de S4 vers S0 correspondant au relâchement de la molécule d'oxygène (Gauthier et al. 2010).

Parallèlement à la photolyse de l'eau,  $P_{680}^*$  transfère l'électron vers le premier accepteur, la phéophytine a (pheo), une molécule de chlorophylle sans Mg située sur la protéine D1.  $P_{680}^*$  subit alors la photooxydation et devient  $P_{680}^+$  alors que pheo est réduite et devient pheo<sup>-</sup>.

L'électron se retrouve ensuite sur l'accepteur quinonique primaire  $Q_A$ , porté par la protéine D2 et localisé du côté stroma.  $Q_A$  ne peut céder l'électron vers le site de liaison  $Q_B$  que si  $P_{680}$  se sépare d'un 2<sup>e</sup> électron. Ce 2<sup>e</sup> électron doit refaire le transfert, de  $P_{680}$  vers pheo, ensuite vers  $Q_A$  et finalement vers  $Q_B$  afin de permettre la réaction avec deux protons  $H^+$  et la formation de PQH2. PQH2 peut ensuite être transférée vers le cytochrome  $b_6f$ .

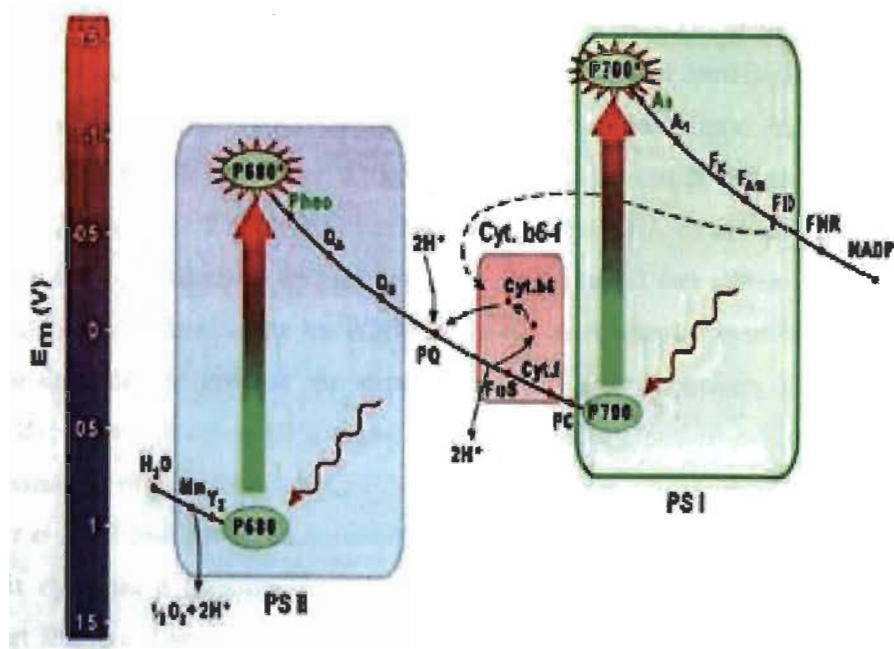


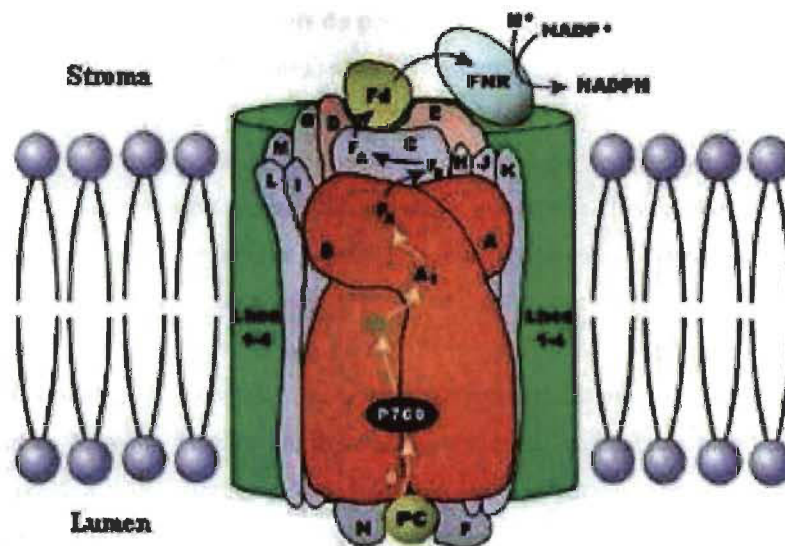
Figure 1.5 Schéma en Z du transport des électrons dans la membrane du thylacoïde (David Joly , 2007).

#### 1.2.6.5. Le cytochrome *b<sub>6</sub>f* et le PSI

Le cytochrome *b<sub>6</sub>f* est un complexe protéique transmembranaire, situé entre le PSII et PSI, aussi connu sous le nom de plastoquinol/plastocyanine réductase (voir Figure 1.3 en page 29). Il est constitué d'une protéine de cytochrome *f*, de cytochrome *b<sub>6</sub>*, d'une protéine fer-soufre Rieske ainsi que de la sous-unité IV. Le complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* a pour principale fonction de servir d'intermédiaire lors du transfert d'électrons entre les molécules de PQH<sub>2</sub> provenant du PSII et une molécule de PC du PSI.

Le PSI est très brièvement expliqué comparativement au PSII dû au fait que les approches expérimentales utilisées lors du projet permettent l'étude du PSII seulement. Ainsi, le PSI est un complexe pigment/protéine transmembranaire semblable au PSII (voir Figure 1.6 en page 34). Il comprend plusieurs protéines, une antenne ainsi qu'un centre réactionnel appelé P<sub>700</sub> (la chlorophylle y absorbe la lumière à 700 nm) avec une fonction similaire de transfert d'électrons. Comparativement au PSII, le transfert

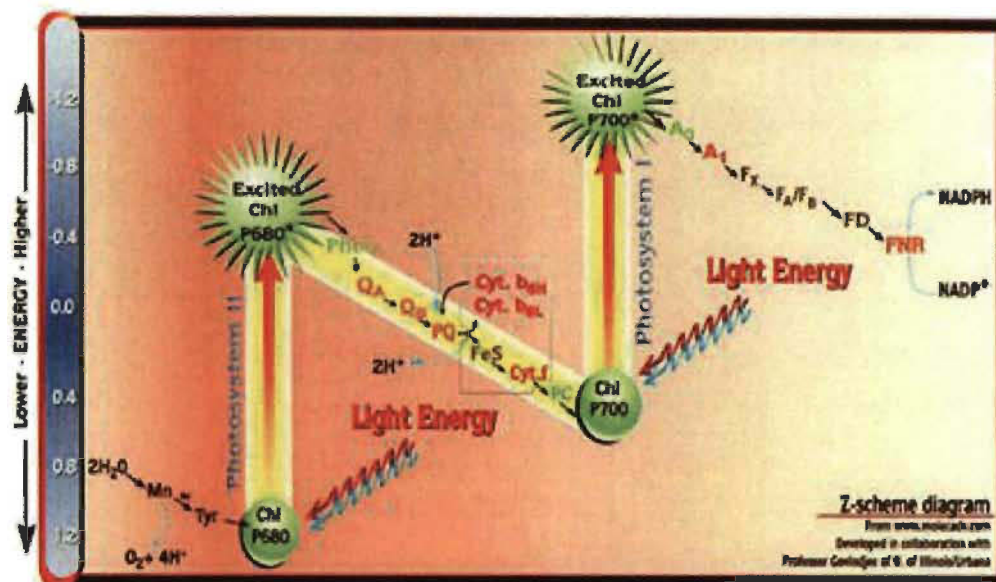
d'électron s'effectue cette fois-ci entre la plastocyanine (côté lumen) et la ferrédoxine (Fd) située côté stroma.



**Figure 1.6** Représentation schématique de la structure du photosystème I (David Joly, 2007).

#### 1.2.6.7. *Le gradient de protons*

Les phénomènes de transfert des électrons créent un flux d'ions hydrogène (protons) ainsi qu'une différence de potentiel à travers la membrane des thylacoïdes. En conséquence, il y a une acidification du lumen c'est-à-dire que l'on retrouve beaucoup plus de protons dans la lumière que dans le stroma du thylacoïde. Le transfert des protons lors de la photosynthèse se résume ainsi : l'oxydation de deux molécules d'eau permet la libération de 4 protons dans le lumen; la réaction de réduction du bassin de PQ utilise 2 protons du stroma et la réaction du cytochrome  $b_6f$  libère 2 protons dans la lumière du thylacoïde (voir Figure 1.7 en page 35). Ce transfert résulte en une différence de charge entre le lumen et le stroma qui est proprement dit le gradient de proton. L'énergie ainsi emmagasinée pourra être utilisée par l'ATP synthase et permettre la production de l'ATP. Cette ATP produite sera utilisée comme source d'énergie pour permettre les réactions du cycle de Calvin (Calvin 1989).



**Figure 1.7** Schéma en Z de la suite d'oxydoréduction des photosystèmes I et II.

En bref, la photosynthèse permet la fixation du gaz carbonique produit par la respiration cellulaire, le renouvellement de la réserve d'oxygène atmosphérique et la formation d'hexoses participe à assurer la nutrition des êtres vivants.

En laboratoire, c'est l'étude de Stefan et al. (2013) qui est la première à démontrer que l'inoculation par les PGPR peut augmenter la photosynthèse, la teneur en chlorophylle, l'activité des enzymes antioxydantes et le rendement des plants de haricots. Leurs résultats suggèrent que les souches *Bacillus pumilus* S4 et *Bacillus mycoides* S7 seul ou en combinaison ont un grand potentiel pour augmenter la photosynthèse, l'efficacité d'utilisation de l'eau, la teneur en chlorophylle des feuilles et le rendement en grain (Stefan et al. 2013). Chez le plant de riz, l'inoculation de la rhizosphère par des souches de *Rhizobium* gfp a permis après 20 jours et 130 jours respectivement, une hausse de leur niveau d'AIA ainsi qu'une augmentation du taux de photosynthèse net (Chi et al. 2005). Ceci indique que l'inoculation de plant de riz par un PGPR tels *Rhizobium* influence la réponse physiologique du plant, plus précisément sa capacité photosynthétique (Chi et al. 2005).

Ainsi, il semble que l'inoculation d'un plant par des PGPR peut influencer le transport des électrons et conséquemment la photosynthèse dans les feuilles. Il est alors légitime de se demander si d'autres PGPB peuvent influencer la photosynthèse.

### **1.3. Les hypothèses et objectifs du mémoire**

#### 1.3.1. Les hypothèses

Considérant les facteurs environnementaux, économiques et l'arrivée sur le marché de nouveaux produits agricoles issus de biotechnologies, on peut estimer que l'avenir des biofertilisants est prometteur. Un nombre croissant de microorganismes du sol sont sujets à l'étude et mis en marché. Des microorganismes génétiquement modifiés sont aussi développés afin de faciliter leur suivi sur le terrain et de permettre une amélioration de l'expression de leurs propriétés bénéfiques ou une possibilité de combiner plusieurs traits avantageux (Amarger, 2002).

Si pour certaines bactéries, on a pu étudier la colonisation transitoire dans différentes parties de la plante, il demeure que la présence des endophytes modèles *Gluconacetobacter* et *Azospirillum* dans la partie comestible du maïs n'a pas été évaluée. Il serait souhaitable d'améliorer nos connaissances générales et enrichir la littérature sur la possibilité de déplacement vertical de ces endophytes vers l'intérieur de la plante.

De plus, les données dans la littérature semblent démontrer que l'inoculation de plant avec des rhizobactéries pourrait avoir un effet positif sur le rendement photosynthétique, mais aucune recherche connue ne semble s'être penchée sur l'impact de l'inoculation de PGPB endophyte sur le transport d'électrons dans le photosystème II des feuilles. Une expérimentation est souhaitable afin de rapporter si un changement au niveau de la photosynthèse est observé, plus précisément sur le photosystème II suite à l'inoculation de *Gluconacetobacter* au niveau du grain de maïs. Rappelons que Menhaz et Lazarovits (2006) ont démontré que *G. azotocaptans* pouvait stimuler la biomasse, produire de l'AIA et fixer l'azote atmosphérique.

Ainsi, les deux hypothèses émises sont que :

- Les endophytes génétiquement modifiés pourraient coloniser les racines et la partie comestible du maïs.
- La photosynthèse pourrait être influencée par l'inoculation d'endophytes chez le maïs.

### 1.3.2. Les objectifs

Les objectifs du projet sont de détecter et évaluer le déplacement vertical d'endophytes modèles dans le maïs et de vérifier l'impact de leur inoculation sur la photosynthèse. Plus précisément, il faudra mettre en place une chambre de croissance de niveau de confinement 2, préparer un transformant, inoculer les deux endophytes modèles connus du maïs, *A. lipoferum*, *G. azotocaptans* ainsi qu'un GMM sous différentes conditions d'inoculation et détecter l'ADN bactérien, lorsque présent, par la PCR en temps réel dans les racines et les grains de l'épi.

L'élaboration d'un protocole de détection comprenant une méthode d'extraction d'ADN bactérien dans chaque matrice végétale et une méthode de détection par la PCR en temps réel pour chaque microorganisme sera effectuée pour permettre le suivi des bactéries.

Des expériences d'induction de fluorescence et de décroissance de fluorescence effectuées sur les feuilles de maïs permettront de connaître si l'ajout de cette bactérie au niveau des racines a un impact significatif sur le photosystème II. Plus précisément, l'étude des courbes et des différents paramètres de l'induction de fluorescence permettront, d'analyser l'impact de l'inoculation de *G. azotocaptans* sur les différentes phases OJIP. L'étude des courbes et des différents paramètres de la décroissance de fluorescence permettront d'analyser l'impact de l'inoculation au niveau du transport d'électron entre  $Q_A$  et  $Q_B$ .

Ainsi, des données seront disponibles dans l'éventualité où l'industrie envisagerait d'utiliser *Gluconacetobacter* et *Azospirillum* à titre de biofertilisant ou de les modifier génétiquement afin de maximiser leurs effets favorables et de proposer leur utilisation au Canada.

Rapport-Gratuit.com

## CHAPITRE II

### MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

#### 2.1 La plante modèle

Les études en chambre de croissance ont été effectuées sur la variété locale de maïs-grain (*Zea mays* L.) hybride 39D82 (Pioneer), résistante à la pyrale du maïs (Yieldguard Corn Borer avec protéine CryAb). Cette variété a démontré une réponse positive face à l'inoculation de *G. azotocaptans* et *A. lipoferum* au niveau du sol (Mehnaz et Lazarovits, 2006). Afin de retirer le fongicide, les grains ont été lavés dans l'eau distillée (Mehnaz et Lazarovits, 2006).

#### 2.2 Les endophytes modèles

Les souches d'endophytes utilisés sont *Azospirillum lipoferum* ATCC 29709 et *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC 700988. Toutes les amorces utilisées lors de nos expériences ont été obtenues d'Invitrogen (États-Unis) et à moins d'avis contraire les produits chimiques provenaient de Sigma-Adrich (États-Unis).

Pour le séquençage des endophytes, des amorces spécifiques de l'ADNr 16S (Mehnaz et Lazarovits, 2006) ont été évaluées à l'aide du logiciel Clone Manager et leur spécificité a été vérifiée par l'outil de recherche de séquences nucléiques BLAST (Basic Local Alignment Tool).

Leur ADN a été amplifié (Applied Biosystems, gene amp PCR system 9700) par la trousse « TAQ Platinum polymérase » (Invitrogen, États-Unis). Pour *A. lipoferum*, chaque réaction contenait 0.2 µl de Taq platinum (5 U/µl), 5 µl de tampon PCR (1X), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 1 µl de dNTPs (0.2 mM), 1 µl (0.2 µM) de chacune des amorces N7PRf2 (5'-GTCGCCGCTAACGCATTAAG-3') et N7SPR22 (5'-



TGATGGCAACTGACGGTAGG-3'), 35.3 µl d'eau sans RNase et 5 µl d'échantillon d'ADN (10 ng/µl). Le même mélange PCR a été utilisé pour l'amplification de l'ADN de *G. azotocaptans* avec les amorces DS1F (5'-AATGACTGGGCGTAAAG-3') et DS1R (5'-AATGCTCATCTCTGAACA-3'). L'étape de dénaturation des brins par chauffage à 94 °C pendant 2 minutes a été suivie du profil de 38 cycles suivant: dénaturation à 94 °C pour 1 minute, appariement des amorces à 62 °C pour *A. lipoferum* et à 60 °C pour *G. azotocaptans* pendant 1 minute, élongation des brins par l'ADN polymérase à 72 °C pour 1 minute et une élongation finale de 5 minutes à 72 °C. Les produits de PCR ont migré (Biorad, Power pac 300) en gel d'agarose 1 % (Invitrogen, États-Unis) avec une échelle de poids moléculaire (Invitrogen, Track It, 100pb DNA ladder) et ont été purifiés à l'aide de la trousse « Qiaquick gel extraction kit » (Qiagen). Les échantillons ont été ensuite maintenus à 4°C. Les amplicons ont été séquencés à l'aide des amorces N7 et DS1 à l'Université Laval et une recherche d'identité dans la banque de données de nucléotides Genbank du NCBI (National Center for Biotechnology Information, États-Unis) a été effectuée à l'aide de l'outil BLAST.

Le phénotype d'*Azospirillum lipoferum* a été étudié à l'aide d'un système intégré API 20NE (Biomérieux, Durham, USA) et par des tests d'étude enzymatique de catalase, d'oxydase et dégradation du lactose.

### 2.3 La culture des endophytes

La turbidité des milieux de culture « spirillum nitrogen-fixing medium » (ATCC medium 838 en g/L: 0.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g de MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 g de NaCl, 0.02 g de CaCl<sub>2</sub>, 0.01 g de FeCl<sub>3</sub>, 0.002 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> . 2 H<sub>2</sub>O, 5.0 g de malate de sodium et 0.05 g d'extraits de levures), LB (Difco) (Nunes et al. 2000; Vande Broek et al. 1989) et YEP (en g/L : 10 g d'extrait de levure et 20 g de peptone) a été évalué pour la croissance d'*A. lipoferum* en 48 et 72 h à 30°C dans des volumes entre 250 ml et 1000 ml sous des conditions aérobiques et des milieux LB (Difco), C2 (en g/L : 5 g d'extrait de levure , 10 g de peptone, 15 g de glucose, 5 g de NaCl) (Rouws et al. 2008; Teixeira et al. 1999) et mannitol (ATCC medium 1 en g/L :5.0 g d'extraits de levures, 3.0 g de peptone, 25.0 g de mannitol) pour la croissance de *G. azotocaptans* en 5 jours à

30°C dans des volumes entre 250 ml et 1000 ml en condition aérobie. Des essais de croissance à 26°C et 30°C sous agitation ont été effectués. Le temps de génération et la phase exponentielle de croissance des bactéries ont été évalués par spectrophotométrie (Nanodrop ND-1000, Wilmington, États-Unis).

Suite aux essais de turbidimétrie, *A. lipoferum* a été cultivé entre 24 h et 48 h à 30°C sous agitation dans un bouillon YEP. *G. azotocaptans* et le transformant ont été cultivés 90 h à 30°C sous agitation dans un bouillon mannitol et mannitol additionné de tétracycline 15 µg.ml<sup>-1</sup> respectivement. Les bactéries ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 15 minutes (Tian et al. 2009), mises en suspension avec du NaCl 0,8 % pour ~10<sup>8</sup> UFC/ml à 600 nm (spectrophotomètre Nanodrop ND-1000, Wilmington, États-Unis) et dénombrées par ensemencement de dilutions sériées (10<sup>-4</sup> à 10<sup>-8</sup>).

#### **2.4 La transformation génétique des endophytes**

L'élément mobile choisi, le transposon mini-Tn5gfp situé dans le plasmide pUTmini-Tn5gfp (ATCC 87454) porté par le vecteur « S17-pir (Platt et al. 2008) a été reconstitué selon les indications de l'ATCC (États-Unis) pour permettre le transfert de fonctions. Il permet une insertion aléatoire des gènes au niveau du chromosome bactérien. Ce transposon de type Tn5 situé sur le plasmide suicide R6K, le pUT, possède le gène gfp ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique (Dandie et al. 2001). Pour permettre sa réplique, la protéine Pi, codée par le gène pir, doit être présente. Il est composé d'un gène de bêta-lactamase (position 311 à 1171) qui confère au vecteur une résistance à l'ampicilline suivi des séquences de transposition, la Tn5 IE end (inside end, 871..2889), la Tn5 transposase (1323 à 2753), le gène de résistance à la tétracycline tetA (3356 à 4546), le gène d'expression de la gfp (5154 à 5870), le Tn5 OE end (outside end, 5929 à 5947) et le Rk2/RP4 (6890 à 7663). Lors de la transposition par conjugaison et par électroporation, la partie entre l'IE et l'OE du transposon est transférable à l'organisme receveur.

L'évaluation de l'expression a été effectuée par la mise en croissance sur milieu de culture YEP ou mannitol additionné de tétracycline 15µg.ml<sup>-1</sup> (Armstrong et al. 2009) tandis que l'expression du gène gfp a été évaluée l'aide d'une lampe UV, d'un

fluorimètre (Fluoroskan, LabSystems) et par la microscopie à fluorescence à 520 nm (Olympus BX61). Un contrôle positif fluorescent (*E. coli* pGLO, BIO-RAD) a été utilisé selon les indications du fournisseur.

Une PCR spécifique au gène *gfp* a été développée à l'aide du logiciel Clone Manager et de la séquence GenBank: AY364166.1 (Transposon delivery vector pUT-miniTn5-*gfp*-tet, complete sequence). La spécificité des amorces a été testée par l'outil de recherche de séquences nucléiques BLAST. Pour l'amplification du gène *gfp*, chaque réaction contenait 0.2 µl de Taq platinum (5 U/µl), 5 µl de tampon PCR (1X), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (1.0 mM), 1 µl de dNTPs (0.2 mM), 1 µl (0,2 µM) de chacune des amorces *gfp* *gfp*mut2-385f (5'- TTCAGCACGTGTCTTGTAGT-3') et *gfp*mut2-621CR (5'- GGTGAAGGTGATGCAACATA-3'), 35,3 µl d'eau sans RNase et 5 µl d'ADN (10 ng/µl). L'étape de dénaturation à 94 °C pour 2 minutes a été suivie du profil de 38 cycles suivant : dénaturation à 94 °C pour 1 minute, appariement des amorces à 60 °C pour 1 minute, élongation des brins à 72 °C pour 1 minute et une élongation finale de 5 minutes à 72 °C.

Un protocole de conjugaison a été adapté de la littérature pour *A. lipoferum* (Baoen et al. 2005; Rodriguez et al. 2006; Xie et al. 2005; Vanstockem et al. 1986). *E. coli* et *A. lipoferum* ont été respectivement mis en croissance 18 h à 30°C sous agitation dans le milieu LB additionné de tétracycline 5 mg.ml<sup>-1</sup> et ampicilline 50 mg.ml<sup>-1</sup> et 24 h sous agitation dans le milieu YEP. Des solutions bactériennes de densité optique de 1 à 600 nm (spectrophotomètre Nanodrop ND-1000, Wilmington, États-Unis) ont été préparées avec du MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Le mélange bactérien a été incubées pour 1 h 30 à 30°C dans une proportion 1:4 (*E. coli* : *A. lipoferum*) et mis en gélose YEP additionnée de MgSO<sub>4</sub> 10 mM pour 48 h à 30°C. Suite à l'incubation, les bactéries transformées ont été prélevées de la gélose à l'aide d'un écouvillon stérile et resuspendues dans 5 ml de saline 0,9 % pour être centrifugées 7 min à 5000 rpm. Le surnageant a été enlevé et les cellules ont été lavées 2 autres fois. Suite au lavage, les bactéries ont été étalées sur des géloses YEP additionnée de tétracycline et incubées 48 h à 30°C. L'étude du métabolisme par un système intégré API 20NE (Biomérieux, Durham, USA) et par des tests

enzymatiques d'oxydase, de catalase et l'utilisation du lactose ont été effectués afin de tenter de discriminer *E.coli* d'*A. lipoferum* transformé.

Pour la transformation de *G. azotocaptans*, le plasmide a été extrait d'*E.coli* à l'aide de la trousse Qiaprep Spin miniprep kit (Handbook, Qiagen). Un protocole d'électroporation (Gene Pulser II. Electroporation System, Biorad) a été adapté pour *G. azotocaptans* (Intorne et al. 2009; Rouws et al. 2008; Teixeira et al. 1999) après 90 h de croissance en milieu mannitol. L'électrocompétence des cellules a été effectuée suite à la croissance sous agitation jusqu'en phase exponentielle. Les cellules ont subi une succession de centrifugation en alternance avec plusieurs traitements thermiques sous 4°C. Les cellules compétentes ont ensuite été utilisées pour l'électroporation et/ou congelées à -70°C. Les paramètres d'électroporation suivants ont été testés: la quantité de cellules compétentes (20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl), la concentration d'ADN (25-50 ng), le type de milieu de culture (LB, C2, mannitol), la capacitance (2,5 uF, 10 uF, 25 uF, 50 uF) et la résistance (100 Ω et 200 Ω). Dans une cuvette de 0.2 cm, une transformation efficace a été effectuée par l'ajout de 4 µl d'ADN plasmidique (~7 ng/µl) à 50-100 µl de cellules électrocompétentes et 350 µl d'eau MilliQ sous 50 uF, 2,5 kV, 200 Ω pour 9.96 msec.

Suite aux transformations, un essai de séquençage de l'ADN autour du transposon a été adapté de la littérature (Spertini et al. 1999). L'ADN génomique des bactéries transformées a été extrait par la trousse commerciale « blood and tissue » (Qiagen) et a été digéré par les enzymes de restriction NarI, BstBI (New England Biolabs, Canada) afin de permettre la liaison d'un adaptateur par la T4 DNA ligase. Des amorces spécifiques des adaptateurs ont été évaluées à l'aide du logiciel Clone Manager. Deux PCR ont été effectuées avec la trousse « Picomaxx high fidelity PCR system » (Stratagene, Agilent Technologie) sur le produit de ligation avec les amorces AP1new (5'-GCTCGTAGACTGCGTACCAAGC-3') et gfpmut2-spe3 (5'-CAAGTGTGGCCATGGAACAGG-3') et AP1new et gfpmut2-sp1 (5'-ATTGGCGATGGCCCTGTCCTTT-3'). Chaque réaction contenait 2 µl de tampon PCR (1X), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (1,0 mM), 0.4 µl de dNTPs (0.2 mM), 0.4 µl de chacune des

amorces (0,2  $\mu$ M), 0,4  $\mu$ l de Polymérase PicoMaxx (Stratagene) (5 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l d'ADN (10 ng/ $\mu$ l) et 14,4  $\mu$ l d'eau sans RNase. L'étape de dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes a été suivie du profil de 34 cycles suivant : dénaturation à 95 °C pour 30 secondes, appariement des amorces à 67 °C pour 30 secondes, élongation des brins à 72 °C pour 1 minute et une élongation finale de 4 minutes à 72 °C. Les produits de PCR ont été extraits du gel d'agarose 2 % et purifiés avec la trousse « Qiaquick gel extraction kit » (Qiagen) afin d'être soumis à une deuxième PCR. Chaque 19  $\mu$ l de réaction contenait 2  $\mu$ l de tampon PCR PicoMaxx (Stratagene) (1X), 0,4  $\mu$ l de dNTPs (0,2 mM), 0,4  $\mu$ l de chacune des amorces (0,2  $\mu$ M) AP2 new (5'-AACTCAGGACTCATCCGTAGCCTCA-3') et gfpmut2-spe4 (5'-GTTGCATCACCTTCACCCTCTCC-3'), 0,4  $\mu$ l de Polymérase PicoMaxx (Stratagene) (5U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l d'ADN du produit de PCR (10 ng/ $\mu$ l) et 15,4  $\mu$ l d'eau sans RNase. L'étape de dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes a été suivie du profil de 34 cycles suivant : dénaturation à 95 °C pour 30 secondes, appariement des amorces à 67 °C pour 30 secondes, élongation des brins à 72 °C pour 1 minute et une élongation finale de 4 minutes à 72 °C. Les produits de PCR ont été extraits du gel d'agarose 2 % et purifiés avec la trousse « Qiaquick gel extraction kit » (Qiagen) afin d'être envoyés au séquençage avec les amorces gfpmut2-SEQ (5'-ACCACATGGTCCTTCTTGAG-3') et gfpmut2-SEQi (5'-TGGGACAACCTCCAGTGAA-3').

Plusieurs générations de transformants *A. lipoferum* et *G. azotocaptans* ont été repiqués sur leur milieu respectif YEP et mannitol additionné de tétracycline 15 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> afin d'étudier la stabilité de l'insertion.

## **2.5 L'extraction de l'ADN des endophytes en culture, dans le grain et dans les racines**

Les troussees testées utilisent l'affinité de l'ADN pour la silice. L'absorption spécifique de l'ADN à la membrane de silice est favorisée par des solutions tampons et devait permettre d'éliminer le plus d'inhibiteurs de la PCR possible. Les protocoles respectifs du fabricant ont été testés et modifiés au besoin selon la matrice. La lyse physique des cellules des racines ou des grains par broyage dans un mortier stérilisé a

été nécessaire pour permettre l'extraction par des détergents afin de dissoudre la couche lipidique des membranes et dénaturer les protéines. Suite aux extractions effectuées selon les recommandations du fabricant, l'ADN a été lavé et centrifugé afin d'être récupéré et conservé dans un tampon à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le dosage de l'ADN par spectrophotométrie (spectrophotomètre Nanodrop ND-1000, Wilmington, États-Unis) et l'analyse des ratios 260/230 et 260/280 ont permis d'évaluer la pureté de l'ADN et le rendement de l'extraction. La valeur à 260 nm représente la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques tandis que la mesure à 280 nm permet d'évaluer la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN. Le ratio 260/230 permet l'évaluation des impuretés d'acide humique de l'échantillon. Un ratio 260/280 d'environ 1.8 est généralement reconnu comme de l'ADN pure tandis qu'une valeur entre 2.0 et 2.2 est espérée pour le ratio 260/230 (spectrophotomètre Nanodrop ND-1000).

Pour l'extraction à partir de culture bactérienne, la trousse « DNeasy blood and tissue » (Qiagen) a été sélectionnée. Avant leur extraction, *A. lipoferum* et *G. azotocaptans* ont été cultivés entre 48 h et 5 jours et centrifugés 10 minutes à 5000 g. L'ADN extrait a été utilisé pour le séquençage.

Préalablement à l'extraction de l'ADN des racines, leur décontamination a été effectuée selon le protocole de Compant S. (2005). Les racines ont été secouées afin d'enlever le terreau qui pouvait interférer avec la décontamination et ont été trempées dans 10 ml d'alcool 70 % pour 5 minutes, transférées dans 10 ml d'eau de javel / tween 20 (0,01 %) pour une minute, lavées trois fois dans l'eau distillée (1 minute) et congelées à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pour extraire leur ADN, trois trousse d'extraction ont été testées : « Dneasy plant mini kit » (Qiagen), « Power soil DNA extraction kit » (Mobio) et « Power plant DNA isolation kit » (Mobio). Plusieurs essais avec différentes quantités de racines (50 mg, 100 mg, 200 mg) et des lavages supplémentaires (2 à 3 lavages) ont été effectués.

Pour extraire l'ADN des 200 mg de grain, deux trousse d'extraction ont été testées : « Dneasy plant mini kit » (Qiagen) et « Power plant DNA isolation kit » (Mobio).

## 2.6 La détection de l'ADN des endophytes par la PCR en temps réel

L'impact de plusieurs paramètres a été étudié afin d'optimiser la technique de PCR en temps réel (Agilent technologies, Stratagene MX 3005p). La concentration de  $MgCl_2$  (1,5 mM et 2,5 mM, 3mM), la température d'appariement des amorces (60°C, 62°C) et la concentration d'ADN (10 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng et 200 ng) ont été testées.

Suite à l'optimisation, pour *A. lipoferum*, les conditions de la PCR en temps réel avec la trousse « SYBRGreen PCR Master Mix » (Applied Biosystems) avec « Amplitaq gold polymérase » sont 12.5 µl de sybrGreen (1X), 1.25 µl (0.5 µM) de chacune des amorces N7PRf2 et N7SPR22, 24 µl de master mix, 1 µl ADN (50 ng/µl) et 10 µl d'eau sans RNase. L'étape de dénaturation à 95 °C pendant 10 minutes a été suivie du profil de 45 cycles suivant : dénaturation à 95 °C pour 15 secondes, appariement des amorces à 62 °C pour 1 minute, élongation des brins à 72 °C pour 30 secondes. Une courbe de dissociation permettant de mesurer la température de dissociation ( $T_m$ ) complétait la PCR lors du cycle final d'une minute à 95 °C, 30 secondes à 55 °C, 30 secondes à 95 °C, avec une progression des températures de 1.5 °C/sec.

Suite à l'optimisation, pour *G. azotocaptans* les conditions de PCR utilisées sont 2.5 µl de tampon PCR 1X, 1.25 µl de  $MgCl_2$  2,5mM, 0.5 µl de dNTP 0,2 mM, 1.25 µl amorce ds1-spec-rev et ds1-univ-fwr 0,5 µM, 0.25 µl d'AmpliTAQ 1,25 U, 1 µl de Sybrgreen, 5 µl d'ADN et 12 µl d'eau sans Rnase. L'étape de dénaturation à 94 °C pendant 2 minutes et à 94 °C pendant 1 minute été suivi du profil de 45 cycles suivant : appariement des amorces à 60 °C pour 1 minute, élongation des brins à 72 °C pour 1 minute. Une courbe de dissociation terminait aussi cette PCR.

Au cours de chacun des cycles, le système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel permet la mesure de l'augmentation de fluorescence provoquée par la

quantité de SYBR Green qui s'intercale dans l'ADN double brin polymérisé. En plus de détecter la présence de l'ADN de la bactérie dans les racines et l'épi de maïs, la quantification absolue, par comparaison avec une courbe standard, a permis la quantification des endophytes. Plus de 25 courbes standards de concentration variant entre  $10^0$  et  $10^9$  équivalents de bactéries ont été effectuées pour déterminer les limites de détection et de quantification de l'ADN bactérien seul, dans les racines et dans le grain.

## 2.7 Le développement de la chambre de croissance de niveau de confinement 2

Une chambre de croissance  $10 \text{ m}^2$  a été conçue pour permettre la croissance maximale de 40 plants de maïs d'une hauteur variant entre un et trois mètres. La conception de la chambre de croissance était basée sur le protocole « the greenhouse care for transgenic maize plants » du département de l'agriculture de l'University de l'État de l'Iowa. Quelques amendements au protocole ont été effectués. Le terreau SB300 universal a été remplacé par un terreau de composition équivalente, le terreau drainage extrême (Fatede, Fafard, QC) composé d'écorce compost, de sable, de chaux, d'engrais et de fibrola additionné de 20 % de vermiculite (HOVEM). L'engrais Osmocote plus 15-8-11 (15 % N, 8 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 11 %  $\text{K}_2\text{O}$ , 1,45 % Mg, 2,40 % S, 0,02 %, B, 0,35 % Fe, 0,05 % Mn, 0,014 % Mo) en combinaison avec le fertilisant liquide Miracle Gro Excell # EX15515 du fournisseur Corbeil et Bigras ont également été utilisés. Les lampes sodium haute pression (SHP) recommandées avant la floraison, ont été privilégiées pendant 120 jours au lieu de la lampe à iodures métalliques (MH ou métal halide) qui favorise la période végétative des plants. Les deux lampes SHP de 1000 watts ont permis de conserver une luminosité entre 200 et  $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$  pour les 40 plants (hauteur d'un mètre, luminomètre, Quantum meter, Apogee), une croissance adéquate en période végétative ainsi qu'une floraison permissive au stade reproductif. Dans la chambre de croissance NC<sub>2</sub>, l'air était filtré, l'eau bouillie et la verrerie était décontaminée par autoclavage selon les directives de l'ACIA, mais le terreau était envoyé à l'incinérateur (1 \$/kg). L'acidification de l'ampoule de *Geobacillus stearothermophilus* incubée 4 h à 37°C ainsi que les tests de croissance sur milieux gélosés ont permis de confirmer que la décontamination par autoclavage (1 heure, 121°C, 18 livres de pression, 4 kg/sac) n'était pas une mesure de contrôle adaptée



pour le terreau. La température a été surveillée à l'aide de thermomètres enregistreurs et maintenue par climatisation centrale. La photopériode a été réglée 16h/8h (clarté/noirceur). Des gicleurs automatiques, 200 ml eau par minute, ont permis d'uniformiser l'arrosage des plants. Une méthode de brumisation manuelle et par brumisateur automatique a été testée et adaptée selon les observations. Un hygromètre a permis de surveiller le taux d'humidité.

La pollinisation croisée a été effectuée deux fois par jour jusqu'au brunissement des soies. Le maïs étant une plante monoïque possède sur le même plant l'organe mâle générant les grains de pollen d'une viabilité de 10 à 30 minutes (Coe et al. 1988) et l'organe femelle qui deviendra l'épi mature (voir Figure 2.1 en page 49). Afin d'éviter la contamination croisée, le pollen récolté à l'aide d'un pinceau et déposé sur les soies provenait des plants ayant reçu le même type d'inoculum ou des plants contrôles.

Les paramètres de croissance (température, humidité, luminosité) ont été étudiés pendant 120 jours avec des plants contrôles. Ces plants sans inoculum ont permis d'assurer que l'environnement est exempt d'ADN d'*A. lipoferum* et de *G. azotocaptans* avant leur inoculation en chambre. Les échantillons de racines et d'épis recueillis ont pu être utilisés à titre de contrôle négatif.



**Figure 2.1 Floraison du plant de maïs.**

La floraison femelle apparaît à mi-hauteur du plant. Les soies continuent de s'allonger jusqu'à la fécondation (gauche). La floraison mâle apparaît sur une panicule au sommet du plant (droite).

## 2.8 Le test de germination des grains de maïs

Des tests de germination comparatifs à l'incubateur et en multicellules ont été effectués avec 20 grains. Chaque grain a été recouvert de papier filtre imbibé d'eau distillée et incubé dans un pétri à 30 °C (Mehnaz et Lazarovits, 2006). En multicellules, la luminosité a été ajustée à 350  $\mu\text{mol.m}^2/\text{s}$  et les grains ont été mis en terre humide à une profondeur d'un centimètre. Après une semaine de croissance, les plantules dans l'incubateur présentaient 3 feuilles comparativement à 2 feuilles pour les plantules en multicellules. Lors des expériences ultérieures, les grains ont tous été mis directement en terre parce que la différence de croissance pouvait être compensée en quelques jours suite à la croissance en pot de 13,21 L.

## 2.9 L'évaluation du transport d'électrons dans le PSII

24 grains ont été inoculés avec *G. azotocaptans* natif et 24 grains n'ont reçu aucun inoculum (eau distillée stérile). La méthode d'inoculation 1-grain (voir détails section 2.10) a été utilisée. La récolte a été effectuée après 8 jours de croissance. Les plants ont été mis à l'obscurité pour un minimum d'une heure avant les tests. Le centre

de la troisième feuille a été poinçonné afin d'obtenir des rondelles de grandeur uniforme et favoriser la reproductibilité des résultats.

### 2.9.1 Les mesures d'induction de fluorescence

La méthode quantitative utilisée lors de nos essais a été développée en 2008 (Joly et Carpentier, 2009) afin d'étudier la fluorescence dans des systèmes intacts tels les feuilles ou les chloroplastes et a permis de découvrir une relation sigmoïdale dans la cinétique des accepteurs du PSII.

$$F(t) = F_0 + A_{O-J}(1 - e^{-k_{O-J} t}) S_{O-J} + A_{J-I}(1 - e^{-k_{J-I} t}) S_{J-I} + A_{I-P}(1 - e^{-k_{I-P} t}) S_{I-P}$$

Où  $F(t)$  est la fluorescence au temps  $t$ ,  $F_0$  est la fluorescence minimale,  $A_{O-J}$ ,  $A_{J-I}$ ,  $A_{I-P}$  sont les amplitudes de chaque phase,  $k$  est la constante de vitesse de chaque phase et  $S$  le facteur sigmoïdale (Joly et Carpentier 2009).

Cette équation a permis de faire l'analyse des courbes et de calculer le facteur sigmoïdal, l'amplitude de chaque phase c'est-à-dire la hauteur de la phase dans le graphique, la constante de vitesse  $\kappa$  représentant la vitesse de réaction composant chacune des phases ainsi que le temps de demi-vie qui correspond au temps nécessaire afin de compléter la moitié de la phase.

Les mesures d'induction de fluorescence ont été effectuées à la température pièce avec le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK) (voir Figure 2.2 en page 51). Les échantillons de feuilles, adaptés à l'obscurité, ont subi une excitation avec une lumière actinique rouge ( $\lambda = 655 \text{ nm}$  et intensité de  $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) fournie par des diodes émettrices de lumière.

Lors des essais, on a défini le niveau minimal de fluorescence ( $F_0$ ) comme étant la fluorescence avant que l'excitation transmise par les antennes photocollectrices atteigne le centre réactionnel c'est-à-dire lorsque la majorité des centres réactionnels sont ouverts et capables d'accepter des électrons. À l'inverse, la fluorescence maximale ( $F_m$ ) a été définie comme la fluorescence au point maximal lorsque la majorité des centres

réactionnels sont fermés et n'ont pas la capacité d'accepter un électron. Le rendement photosynthétique a été calculé à l'aide du ratio  $F_v/F_m$  où la fluorescence variable ( $F_v$ ) représente la soustraction de  $F_o$  à la valeur de  $F_m$ .

Les données recueillies pour effectuer la décomposition des trois phases et pour le calcul des paramètres  $A$  et  $T_{1/2}$  ont été traitées à l'aide du logiciel d'analyse mathématique Sigma plot (SSI, Richmond, CA) ainsi que du logiciel OJIP (Trois-Rivières, Qc). Les données jusqu'à 40 us ont été retranchées, car elles représentent un artéfact due au temps de réponse de l'instrument. Le temps de demi-vie ( $T_{1/2}$ ), est calculé à l'aide de la constante de vitesse  $k$  provenant du logiciel. 15 échantillons ont été testés pour chacune des conditions.



**Figure 2.2** Les mesures d'induction de fluorescence ont été effectuées à la température pièce avec le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK).

### 2.9.2 Les mesures de déclin de fluorescence

Le déclin de fluorescence (« fluorescence decay ») a été effectué avec un fluorimètre FL3500 (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) à la température de la pièce. Certains paramètres, par exemple l'intensité de la lumière, ont dû être adaptés à chaque plant afin d'éviter des oscillations au niveau de la courbe. Les données recueillies pour effectuer la décomposition des trois phases et pour le calcul des paramètres  $A$  et  $T_{1/2}$  ont été également traitées à l'aide du logiciel d'analyse mathématique Sigma plot (SSI, Richmond, CA). Le temps de demi-vie est calculé à l'aide de la constante de vitesse  $k$  provenant du logiciel. 15 échantillons ont été testés pour chacune des conditions.

## 2.10 L'évaluation de l'effet des conditions d'inoculation des endophytes sur la biomasse et la colonisation des racines

La première méthode (Méthode 1- grain) qui consiste à l'inoculation d'un millilitre de suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/ml) directement sur le grain mis en terre a été comparée à la deuxième méthode (Méthode 2- racines 3 jours) qui était basée sur le protocole de Mehnaz et Lazarovits (2006) et consistait à inoculer les racines suite à 3 jours de croissance avec un millilitre de suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/ml). Lors du test comparatif en chambre, 72 grains ont été inoculés par la méthode 1-grain et 36 grains par la méthode 2- racines 3 jours. 36 plants ont été inoculés avec *G. azotocaptans* natif, 36 avec le transformant et 36 plants contrôles n'ont reçu aucun inoculum. Suite à une croissance de 8 jours, la quantification des feuilles a été effectuée et les racines récoltées ont été comparées au barème préétabli. La détection des endophytes a été effectuée.

Des tests court terme sur l'inoculation des endophytes en terreau stérile versus non stérile ont été effectués (Mehnaz et Lazarovits, 2006). Le terreau a été mis en sac avec environ 5 cm d'épaisseur et une stérilisation de 30 minutes à  $121^{\circ}\text{C}$  sous 15 livres de pression a été effectuée pour le terreau des contenants multicellules. 54 grains ont été mis en terre stérile et 54 autres en terre non stérile. 36 plants ont été inoculés avec *G. azotocaptans* natif, 36 avec le transformant et 36 plants contrôles n'ont reçu aucun inoculum. Suite à une croissance de 8 jours, la quantification des feuilles a été effectuée et les racines récoltées ont été comparées au barème préétabli (voir Figure 2.3 en page 53). La détection des endophytes a été effectuée par la PCR en temps réel.



**Figure 2.3** Barème de classification du nombre relatif de racines récoltées correspondant à 0,1,2,3 et 4 de gauche à droite.

### 2.11 L'évaluation de la persistance des endophytes

Deux tests de croissance long terme ont été effectués pour évaluer le déplacement vertical de *G. azotocaptans* transformé en comparaison avec *G. azotocaptans* natif et *A. lipoferum* natif.

Lors du premier test 120 jours en chambre de croissance, 8 plants ont été inoculés avec *G. azotocaptans* transformé, 8 autres plants ont reçu *G. azotocaptans* natif et 8 plants n'ont reçu aucun inoculum. La méthode d'inoculation 1-grain (voir détails section 2.10) a été utilisée. La récolte a été effectuée suite à la formation de l'épi.

Lors du deuxième test, les racines de 12 plants ont été inoculées par les endophytes *G. azotocaptans* transformé, *G. azotocaptans* natif, *A. lipoferum* et 12 plants n'ont reçu aucun inoculum (contrôles). La méthode 3 (Méthode 3- Racines 6 jours (trempées)) basée sur l'expérience décrite par Tian et al. (2009) a été utilisée. Des pousses, stade 2-3 feuilles, ont été prélevés des contenants multicellules avec terreau stérile après 6 jours. Les racines ont été rincées et trempées pendant 30 minutes dans la suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/ml). La récolte a été effectuée après 120 jours.

## 2.12 L'analyse statistique

Des tests non paramétriques ont été utilisés pour l'évaluation des conditions d'inoculation et les données qualitatives. Les analyses statistiques effectuées sont l'ANOVA de Kruskal-Wallis par rangs ( $n \geq 2$ ), le test U de Mann-Whitney ( $n=2$ ) et le test de la médiane. L'hypothèse nulle ( $H_0$ ) suggérant que les médianes des échantillons sont égales, est rejetée lors que la valeur de  $P < \alpha$ . L'intervalle de confiance utilisé est de 95 % ( $\alpha=0,05$ ).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1. La caractérisation des endophytes modèles et du transformant

##### 3.1.1. Le séquençage de l'ADNr 16S des endophytes

La séquence de l'amplicon de 285 paires de bases amplifiée pour *A. lipoferum* confirme 100 % d'homologie avec le genre et l'espèce *A. lipoferum* de la banque de données (*Azospirillum lipoferum* 16S ribosomal RNA, M59061.1) et 95 % d'homologie avec la séquence déposée dans GenBank par Menhaz et Lazarovits, (2006) (*Azospirillum lipoferum* isolate N7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, AY998242.3).

La séquence de l'amplicon de 438 paires de bases amplifiée pour *G. azotocaptans* confirme 100 % d'homologie avec la séquence déposée dans GenBank par Menhaz et Lazarovits, (2006) (*Gluconacetobacter azotocaptans* isolate DS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, gb|DQ073427.1).

##### 3.1.2. La culture des endophytes

*A. lipoferum* peut croître en 48 h à 30°C en aérobiose dans le milieu de repiquage recommandé par l'ATCC « spirillum nitrogen-fixing medium », dans le milieu LB (Difco LB Broth [Luria-Bertani] BD) ainsi que dans le milieu YEP. La phase exponentielle de croissance de la bactérie en aérobiose à 30°C est atteinte en 24 h avec un temps de génération évalué à ~6 h.

Pour *G. azotocaptans*, l'ATCC recommande une croissance de 5-7 jours à 26°C sous conditions aérobiques dans le milieu C2. Pour des raisons d'équipement, on a dû opter pour une croissance à 30°C sous conditions aérobiques. *G. azotocaptans* peut



croître dans le milieu de repiquage C2, le milieu LB et le milieu mannitol en 5 jours à 30°C en atmosphère aérobie. La phase exponentielle de croissance de la bactérie en atmosphère aérobie à 30°C est atteinte en 90 h avec un temps de génération évalué à ~10 h.

### 3.1.3. La transformation génétique des endophytes

La transformation d'*A. lipoferum* natif a été difficile. Suite à la conjugaison, quelques colonies présentaient un aspect mucoïde sur le milieu YEP additionné d'antibiotique. Cette morphologie non typique suggérait la réussite de la transformation. Le repiquage du transformant sur milieu YEP additionné de tétracycline 15µg.ml<sup>-1</sup> a permis de déterminer que la bactérie sélectionnée exprimait le gène d'antibiorésistance. Au niveau du génotype, les amorces spécifiques N7 et gfp ont permis l'amplification des séquences cibles. Par contre, la PCR gfp amplifiait également une séquence pour *A. lipoferum* natif. Ces résultats peuvent suggérer que la souche *Azospirillum lipoferum* ATCC 29709 contient un plasmide ou un gène gfp. La valeur de fluorimétrie (voir Tableau 3.1 en page 57) d'*A. lipoferum* natif plus élevée que celle de *G. azotocaptans* natif est conséquente avec la PCR gfp positive. La littérature connue n'a pas permis d'éclairer notre questionnement. Au niveau biochimique, le transformant sélectionné obtenait des tests de catalase, de lactose et d'oxydase positifs et était différenciable d'*E. coli* seulement par le test d'oxydase. Après plusieurs repiquages, la culture du transformant dans un milieu mannitol additionné de tétracycline 15ug.ml<sup>-1</sup> était toujours possible. La stabilité de la transformation est donc d'au moins 9 générations, mais les ambiguïtés au niveau des résultats ont fait exclure l'utilisation de la souche pour l'inoculation en chambre de croissance.

L'électroporation de *G. azotocaptans* a permis de transformer génétiquement la bactérie. La croissance dans le milieu mannitol additionné de tétracycline 15ug.ml<sup>-1</sup> a permis de confirmer l'expression du gène d'antibiorésistance. Au niveau génotypique, les amorces DS1 et gfp permettent l'amplification de la séquence cible. Le séquençage a également permis de confirmer que le transformant possédait le génotype du transposon. Une correspondance entre les séquences du transformant et le pUTmini-Tn5 gfp tet

(AY364166.1) a été obtenu par l'outil de recherche BLAST. Probablement dû à un manque de pureté de l'ADN de certains amplicons, les séquences du génome bactérien autour du transposon ne possédaient pas de correspondance. Après plusieurs repiquage, la culture du transformant dans un milieu mannitol additionné de tétracycline est toujours possible. La stabilité de la transformation est donc d'au moins 10 générations. Par contre, l'expression de la fluorescence n'a pas été détectée par l'observation des colonies à la lampe UV et par la microscopie à fluorescence. La valeur des unités de fluorimétrie de *G. azotocaptans* transformé plus basse que la bactérie native suggère également que le transformant n'exprime pas le gène (voir Tableau 3.1 ci-dessous).

**Tableau 3.1**

Résultats de fluorimétrie des endophytes natif et de *G. azotocaptans* transformé.

Suspension bactérienne	Valeur moyenne de fluorescence $\pm$ écart-type (unité)
<i>E. coli</i> pGLO	226 $\pm$ 16
<i>A. lipoferum</i> ATCC 29709	143 $\pm$ 28
<i>G. azotocaptans</i> ATCC 700988	49 $\pm$ 1
<i>G. azotocaptans</i> transformé	44 $\pm$ 1

Note : La valeur de densité optique de chaque suspension bactérienne est de 1. *E. coli* pGLO est utilisé comme contrôle positif.

Considérant les ambiguïtés sur la transformation d'*A. lipoferum*, le transformant sélectionné pour l'inoculation en chambre de croissance est *G. azotocaptans*. Malgré l'absence d'expression de la fluorescence du transformant, la détection du gène *gfp* par PCR est possible ainsi que l'expression de l'antibiorésistance.

#### 3.1.4. L'extraction des endophytes dans les racines et les grains de l'épi de maïs

Pour les racines, aucune trousse testée n'a permis l'extraction d'ADN d'une pureté optimale. L'analyse des ratios d'extraction 260/280 et 260/230 démontre la présence d'impuretés tels des protéines, du phénol, de l'acide humique ou d'autres contaminants. L'acide humique présent dans la terre des racines est reconnu pour rendre cette matrice d'extraction plus difficile. Malgré les essais au niveau du poids des racines prélevées, le nombre de lavages effectués, le volume de tampon utilisé, les ratios 260/280 et 260/230 demeurent faibles. La trousse « Powerplant DNA isolation kit » de Mo bio a été choisie, car elle obtient les ratios les plus acceptables en plus d'un rendement conséquent au rendement attendu par la compagnie qui est entre 1000 et 20 000 ng d'ADN extrait (voir Tableau 3.2 en page 59).

Pour le grain, l'extraction de l'ADN avec la trousse « Powerplant DNA isolation kit » (Mo bio) démontre moins d'efficacité que la trousse « DNeasy Plant mini kit » (Qiagen). Tant par la présence d'impuretés dans l'extrait qu'au niveau du rendement attendu de la compagnie qui est entre 1000 et 15 000 ng d'ADN extrait, la trousse « DNeasy Plant mini kit » de Qiagen présentait les meilleurs résultats (voir Tableau 3.2 en page 59).

**Tableau 3.2**

Comparaison des résultats d'extraction de l'ADN bactérien dans les racines et le grain par différentes trousse commerciales.

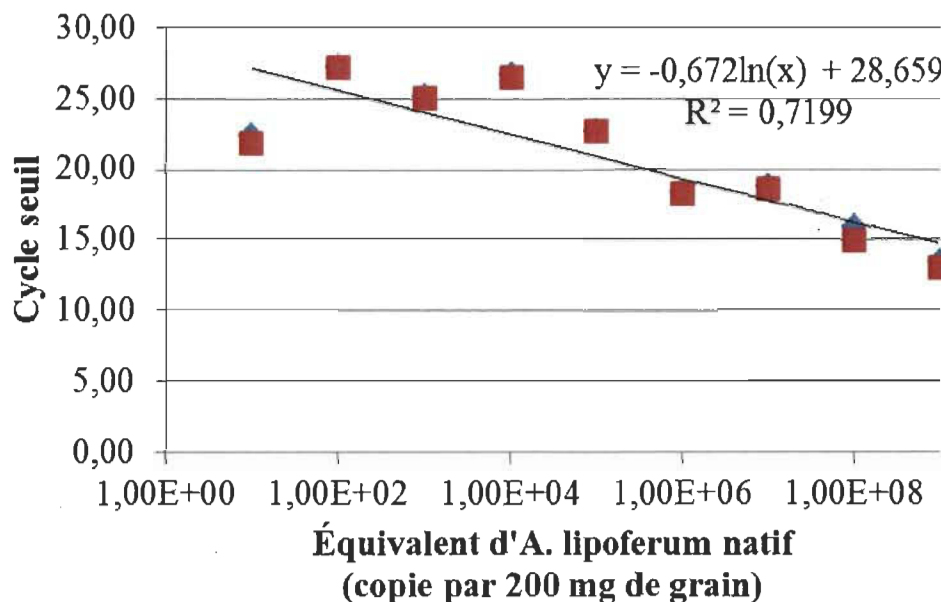
Matrice extraite	Trousse commerciale utilisée	Nombre d'extraction	Moyenne ratio 260/280	Moyenne ratio 260/230	Concentration moyenne extraite (ng)
racines 50mg	<b>Powerplant DNA isolation kit, Mo bio</b>	82	1,71±0,2	1,48±0,4	1327,65±620
racines 100mg	Powersoil DNA isolation kit, Mo bio	71	1,73±0,9	0,92±0,5	1322,17±1635
racines 200mg	Power soil DNA isolation kit, Mo bio	28	1,70±4	0,81±0,5	831,59±811
racines 100mg	DNeasy Plant mini kit, Qiagen	19	1,79±0,6	1,18±0,3	421,81±111
racines 200mg	DNeasy Plant mini kit, Qiagen	29	1,54±0,2	1,14±0,5	750,12±492
grains 200mg	<b>DNeasy Plant mini kit, Qiagen</b>	93	1,82±0,08	2,11±0,8	9198,63±5288
grains 200mg	Powerplant DNA isolation kit, Mo bio	16	1,49±0,2	0,98±0,3	1935,93±1087

Note : Les trousse sélectionnées pour les essais ultérieurs sont en caractère gras. ± indique l'écart-type.

### 3.1.5. La détection de l'ADN des endophytes par la PCR en temps réel

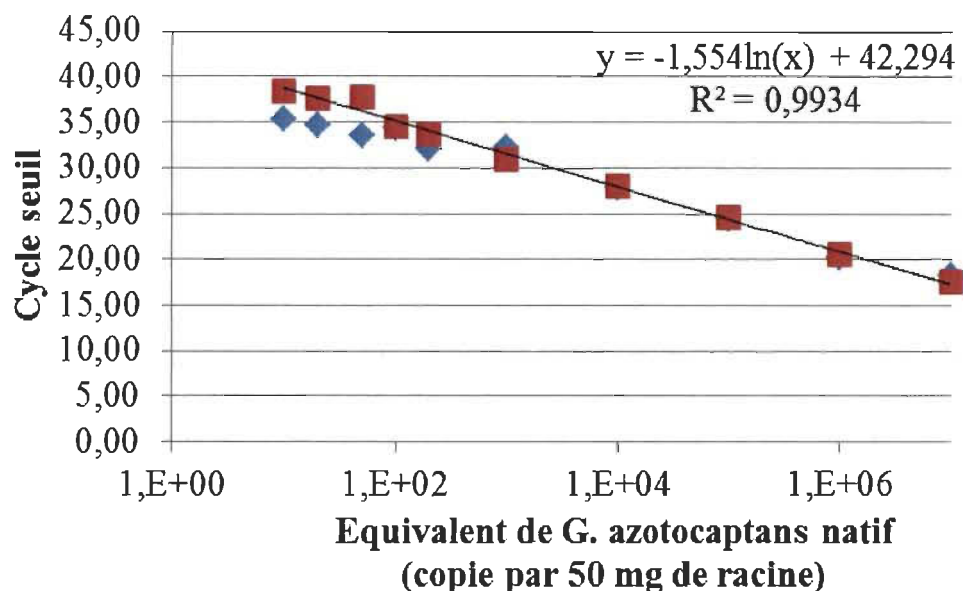
La PCR en temps réel a permis d'amplifier en grand nombre une faible quantité d'acide nucléique d'*A. lipoferum* et de *G. azotocaptans* présent dans l'échantillon de racines ou de grain. La limite de détection pour *A. lipoferum* avec les amorces N7 a été évaluée à 100 équivalents de copies par PCR pour les racines et à 10 équivalents de copies par 200 mg de grains de maïs. Dans les deux cas, la limite de quantification a été fixée à  $10^4$  équivalents de copies. L'efficacité (E) de la PCR dans la région linéaire entre  $10^4$  et  $10^9$  équivalents de copies est respectivement pour les racines et le grain de 77,6 % ( $R^2=0,9874$ ) et de 151,1 % ( $R^2=0,9424$ ). C'est le calcul de la pente des courbes standards qui permet d'évaluer si la quantité d'ADN double à chacun des cycles, autrement dit si la PCR est efficace. Lorsque la pente est plus grande que -3,32, c.-à-d. que l'efficacité est supérieure à 100 %, on peut soupçonner la formation de dimères d'amorces ou une

amplification d'ADN non spécifique. De tels problèmes ne sont pas observés sur nos courbes de dissociation. Par contre, la courbe standard obtenue suite à l'inoculation d'*A. lipoferum* sur le grain semble démontrer la présence d'inhibiteurs. Il est possible de le constater, car la dilution de l'inhibiteur fait chuter la valeur du cycle seuil (Ct) (voir Figure 3.1 ci-dessous).



**Figure 3.1** Courbe standard d'*A. lipoferum* natif inoculé sur le grain de maïs. Une efficacité de 151,1 % est retrouvée dans la région linéaire entre  $10^4$  et  $10^9$  équivalents d'*A. lipoferum* natif. La courbe présente fort probablement des inhibiteurs ainsi qu'une surestimation des concentrations.

La limite de détection pour *G. azotocaptans* avec les amorces DS1 a été évaluée à 10 équivalents de copies par 50 mg de racines et 100 équivalents de copies par 200 mg de grain. La limite de quantification a été fixée à  $10^4$  équivalents de copies. Une augmentation de la variabilité des cycles seuil est observée au-delà de cette limite (voir Figure 3.2 en page 61). L'efficacité de la PCR dans la région linéaire entre  $10^4$  à  $10^7$  équivalents de copies est respectivement pour les racines et le grain de 96,8 % ( $R^2=0,9934$ ) et de 108,34 % ( $R^2=0,9866$ ).



**Figure 3.2** Courbe standard de *G. azotocaptans natif* inoculé sur la matrice végétale. Ici inoculé sur les racines.

Une efficacité de 96,8 % est retrouvée dans la région linéaire entre  $10^4$  et  $10^7$  équivalents de *G. azotocaptans natif*. Une variabilité de la quantification est observée au-delà de  $10^4$  équivalents de copie.

Une corrélation entre la présence des inhibiteurs dans la courbe standard d'*A. lipoferum* et la valeur des ratios 260/280 et 260/230 n'a pas été observée pour le grain. On peut tout de même supposer que l'extraction soit mise en cause. En principe, l'ADN pur du grain ou de la racine pourrait rendre la détection PCR plus difficile, mais ne devrait pas démontrer d'impact sur les ratios d'extraction. Étrangement, dans les racines, l'efficacité de la PCR n'a pas été affectée malgré la faiblesse des ratios d'extraction qui démontre la présence d'impuretés ou d'autres inhibiteurs potentiels tel l'acide humique. Dans nos conditions expérimentales, l'extraction des endophytes dans les racines ne permet pas une qualité d'ADN optimale. Nos essais de croissance courts termes ont tout de même permis de détecter l'ADN d'endophytes dans plusieurs échantillons de racines. Aucune corrélation significative n'a été observée entre les ratios d'extraction faibles et les échantillons négatifs. La possibilité d'optimiser les protocoles d'extraction afin d'éviter les contaminants et les pertes aurait pu être envisageable, mais en général beaucoup d'investissements sont effectués en recherche au niveau de l'optimisation pour la mise en marché de trousse de haute qualité.

## 3.2. Les expérimentations en chambre de croissance

### 3.2.1. Les paramètres de croissance des plants de maïs

Les échantillons de racines matures (n=15) et d'épi (n=11) recueillis lors de la première mise en croissance ont servi de contrôles négatifs lors des tests par PCR. Ils démontrent que la conception de la chambre est adéquate pour permettre la croissance du plant de maïs jusqu'à maturité. Aucun des échantillons n'a testé positif à la présence d'ADN d'*A.lipoferum* ou de *G. azotocaptans*. Même si en théorie trois ou quatre épis peuvent être portés par le pied, généralement on observait la croissance de deux épis, et un seul se développait. Les épis recueillis après 120 jours ne comptaient pas tous le nombre théorique de grains (voir Figure 3.3 ci-dessous). Les conditions de la chambre permettent d'observer deux stades de croissance d'environ 60 jours. Le stade végétatif, de la germination du grain jusqu'à la sortie de la floraison mâle est suivie du stade reproductif, de l'apparition des soies à la maturité physiologique du grain.



**Figure 3.3** Exemple d'épis récoltés à la suite de la pollinisation des soies. Plusieurs grains pouvaient être retrouvés sur certains épis (à gauche) tandis que d'autres présentaient clairement des lacunes de pollinisation (à droite).

L'évaluation de la disposition des plants lors du premier test de croissance a permis également de positionner 40 plants contrôles qui reçoivent entre 159 et 339  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . 7,5 % des plants reçoivent moins de 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  et 15 % des plants reçoivent plus de 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . La quantité de lumière influence directement la hauteur des plants. Il a été déterminé que la quantité minimale de lumière serait d' $\sim 200$   $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (voir Figure 3.4 en page 63). Deux lampes de 1000 watts à vapeur sodium

sous haute pression (SHP) sont nécessaires afin de fournir ce seuil minimum de lumière à 40 plants.



**Figure 3.4** Effet de la luminosité sur la hauteur du plant.

Le plant recevant moins de  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de lumière est plus petit comparativement au autres.

Les données obtenues par les thermomètres enregistreurs permettent de démontrer une différence de température entre  $19^{\circ}\text{C}$  et  $34^{\circ}\text{C}$  en relation avec la photopériode 16:8. La température n'est toutefois pas uniforme dans la chambre. Aucun plant ne doit être mis directement sous les lampes, car la température y est trop élevée et les feuilles flétrissent. Un essai d'uniformisation de la chaleur de la chambre a été mis au point sans succès.

L'observation quotidienne de l'état des plants a permis également de constater que le taux d'humidité était le facteur qui influençait le plus l'état des feuilles. Les données obtenus à l'aide de l'hygromètre et les observations en chambre permettent de confirmer l'importance d'un taux d'humidité plus élevé que 30 %. En dessous de cette valeur, un enroulement anormal des feuilles du plant est visible et le manque d'humidité doit être compensé par la brumisation manuelle ou automatique. Pour des raisons de sécurité, la brumisation manuelle a été privilégiée. Par contre, un taux d'humidité trop élevé favorise la multiplication d'insectes non désirés en provenance du terreau. Des mesures de contrôle doivent être adoptées.



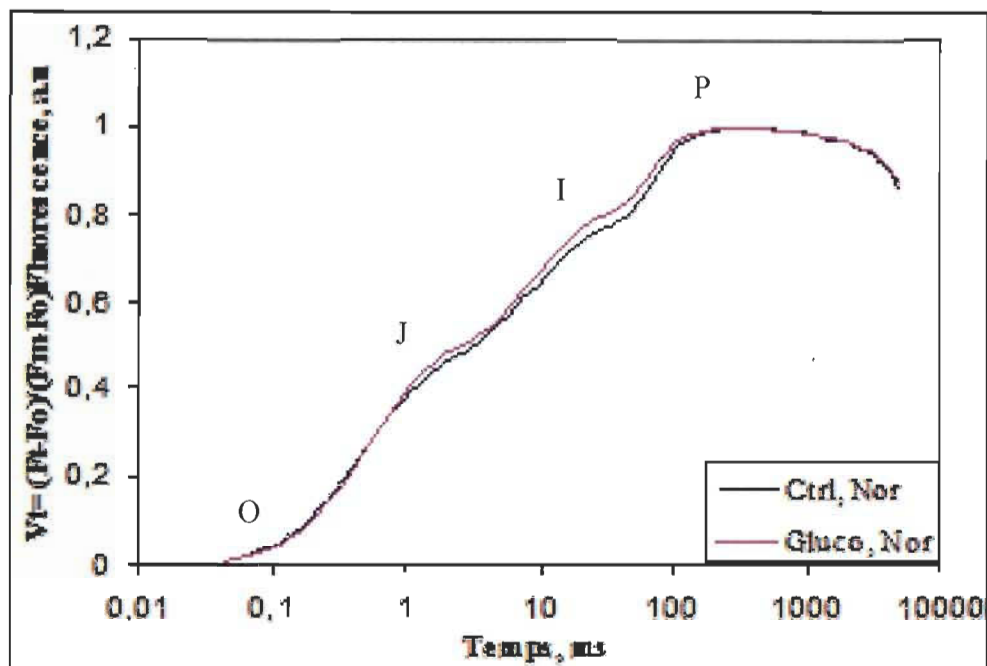
Les observations suite à la fertilisation en granule ont permis de constater un jaunissement des feuilles du plant. Le fertilisant doit être ajouté en périphérie du pot afin d'éviter ce problème. Étant donné que le maïs appartient à la famille des graminacées, mais que son pied ne talle pas, le diamètre des tiges et la vitesse de croissance doivent être surveillés.

Les essais de croissance dans les contenants multicellules ont permis de déterminer que la présence de l'humidôme évite le jaunissement des plantules et que leur transplantation en pots de 13,21 L est nécessaire après 8 à 10 jours de croissance.

### 3.2.2 L'impact de l'inoculation de *G. azotocaptans* sur le photosystème II

#### 3.2.2.1 L'induction de fluorescence

L'induction de fluorescence (FI) effectuée sur les feuilles entières du maïs a permis de représenter la courbe OJIP de fluorescence en fonction du temps. O désigne ainsi « origin », i pour « inflexion » et P pour « peak ». J a été découvert par la suite et cette lettre lui a été attribuée arbitrairement (Lazar et Pospisil 1999). Les courbes normalisées obtenues expérimentalement suivent le profil théorique, car on y retrouve les trois phases distinctes: O-J, J-I et I-P (voir Figure 3.5 en page 65). Aucune variation majeure de ces phases n'est observable suite au traitement du grain par *G. azotocaptans*.



**Figure 3.5** Tracé expérimental d'induction de fluorescence dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par *G. azotocaptans* natif.

Chaque courbe est normalisée et constitue la moyenne de 15 mesures. Gluco= *G. azotocaptans* natif, CTRL= contrôles.

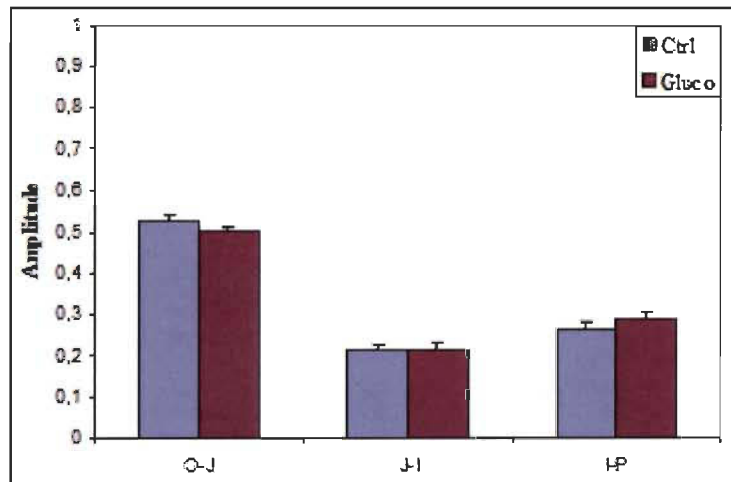
L'analyse quantitative de la phase O-J permet d'observer une légère augmentation de l'amplitude dans les feuilles contrôles sans toutefois observer de variation pour le temps de demi-vie (voir Tableau 3.3 en page 66, Figure 3.6 en page 66 et Figure 3.7 en page 67). Pour la phase J-I, c'est le temps de demi-vie qui est augmenté suite à l'inoculation du grain par *G. azotocaptans* sans que l'amplitude varie (voir Tableau 3.3 en page 66, Figure 3.6 en page 66 et Figure 3.7 en page 67). Pour la phase I-P, l'analyse quantitative de l'amplitude et des temps de demi-vie ne permet pas de confirmer une variation des deux paramètres (voir Tableau 3.3 en page 66 et Figure 3.6 en page 66 et Figure 3.7 en page 67).

**Tableau 3.3**

Amplitude (A) et temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) des trois phases de l'induction de fluorescence du PSII testé sur les feuilles de maïs entières 8 jours après l'inoculation du grain par *G. azotocaptans* natif.

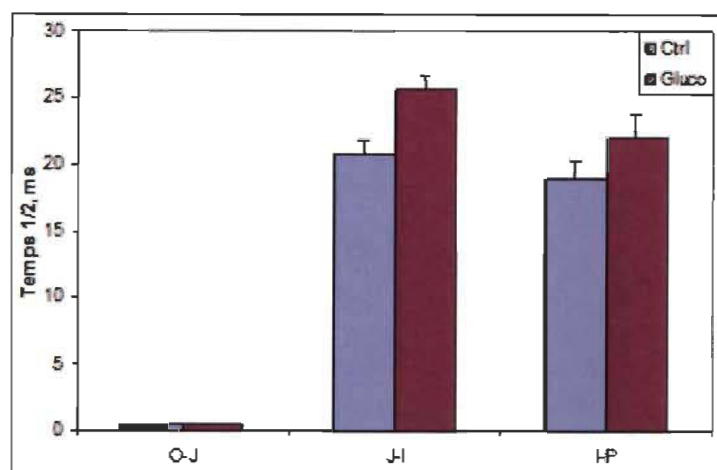
Traitement	Phase					
	O-J		J-I		I-P	
	A	$t_{1/2}$ , ms	A	$t_{1/2}$ , ms	A	$t_{1/2}$ , ms
Contrôles	0,53 ±0,01	0,47 ± 0,04	0,21 ±0,02	21 ±1	0,26 ±0,02	19 ±1
<i>G. azotocaptans</i>	0,502 ±0,009	0,46 ±0,05	0,21 ±0,02	26 ±1	0,28 ±0,02	22 ±2

Note : ± indique l'écart-type



**Figure 3.6** Comparaison des amplitudes des phases O-J, J-I et I-P dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par *G. azotocaptans* natif.

L'amplitude est calculée en proportion sur l'amplitude totale. On peut également observer la sensibilité de chaque résultat. Gluco= *G. azotocaptans* natif, Ctrl= contrôles.



**Figure 3.7** Comparaison des temps de demi-vie des phases O-J, J-I et I-P dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par *G. azotocaptans* natif.

On peut également observer la sensibilité de chaque résultat. Gluco= *G. azotocaptans* natif, Ctrl= contrôles.

Lors de l'analyse des courbes, on a pu calculer un point de fluorescence minimale (Fo ou O) ainsi qu'un point représentant la fluorescence maximale (Fm ou P). Le Fo ainsi que le Fm des feuilles dont les plants ont subi un traitement bactérien présente une augmentation qui n'a pas d'impact significatif sur les paramètres Fv/Fo et Fv/Fm. L'analyse quantitative ne permet donc pas de conclure que l'inoculation du grain par *G. azotocaptans* influence le rendement photochimique (Fv/Fm) (voir Tableau 3.4 ci-dessous). Plus le ratio Fv/Fm est élevé meilleur est considéré le rendement photosynthétique.

**Tableau 3.4**

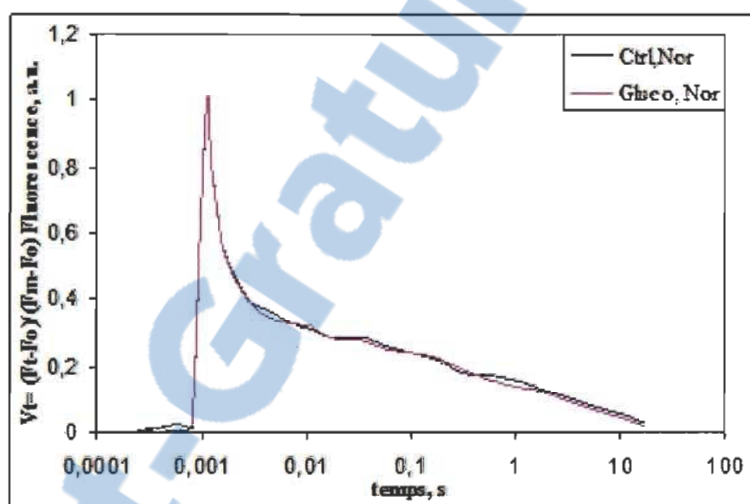
Analyse quantitative des paramètres d'induction de fluorescence dans les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par *G. azotocaptans* natif.

Traitement	Fo	Fm	Fv/Fo	Fv/Fm
Contrôles	461 ± 14	1987 ± 49	3,3 ± 0,1	0,767 ± 0,006
<i>G. azotocaptans</i> natif	511 ± 6	2124 ± 44	3,15 ± 0,06	0,758 ± 0,004

Note : ± indique l'écart-type.

### 3.2.2.2 Le déclin de fluorescence

Aucune variation majeure des courbes normalisées du déclin de fluorescence n'est observable suite au traitement du grain par *G. azotocaptans* (voir Figure 3.8 ci-dessous). On peut remarquer qu'elles se superposent presque parfaitement. De plus, les paramètres d'amplitude et de temps de demi-vie des phases rapides, moyennes et lentes changent très peu entre les feuilles provenant de plants traités et les contrôles (voir Tableau 3.5 en page 69). L'analyse quantitative supporte l'analyse visuelle des courbes.



**Figure 3.8** Cinétique du déclin de fluorescence chlorophyllienne du PSII effectuée sur les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par *G. azotocaptans* natif.

Un seul « flash » est induit (single turnover flash). Chaque courbe est normalisée (Nor) et constitue la moyenne d'environ 15 mesures. Gluco= *G. azotocaptans* natif, Ctrl= contrôles.

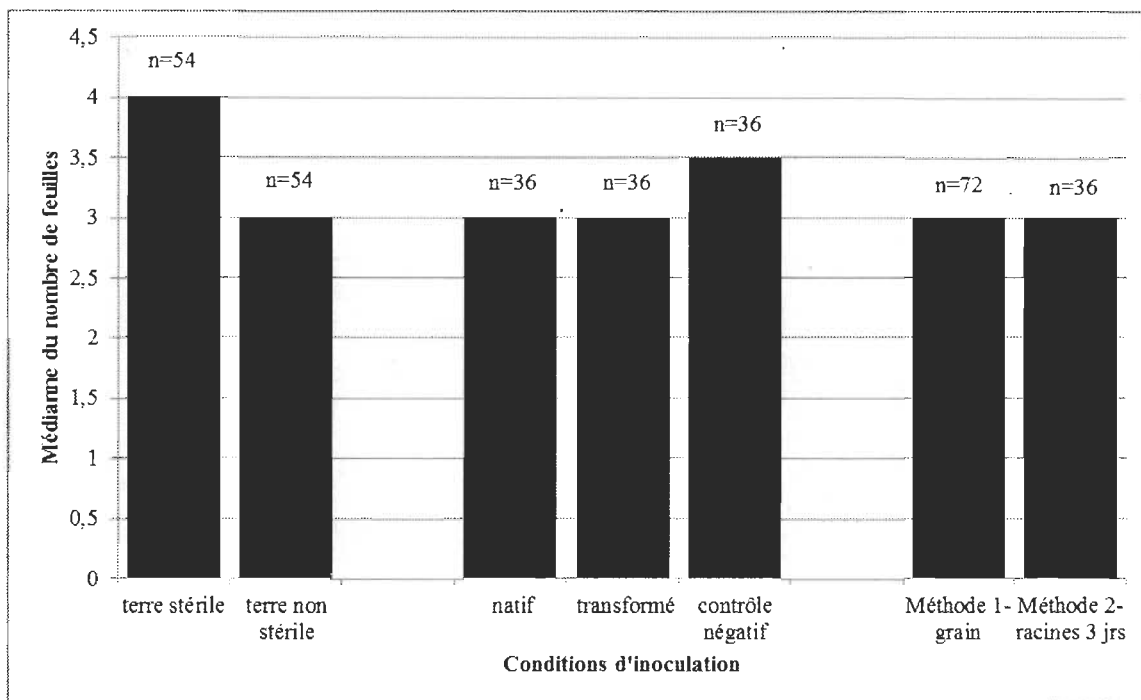
**Tableau 3.5**

Amplitude (A) et temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) des trois phases du déclin de fluorescence du PSII testé sur les feuilles de maïs entières de 8 jours suite au traitement du grain par *G. azotocaptans natif*. La somme des amplitudes est également représentée.

Traitement	Phase rapide		Phase moyenne		Phase lente		A total
	A	$t_{1/2}$ , s	A	$t_{1/2}$ , s	A	$t_{1/2}$ , s	
Contrôle	0,696	0,000294	0,137	0,0316	0,167	3,17	1
G. azotocaptans	0,691	0,000282	0,142	0,0212	0,166	2,86	1

### 3.2.3 L'impact des conditions d'inoculation des endophytes sur la biomasse

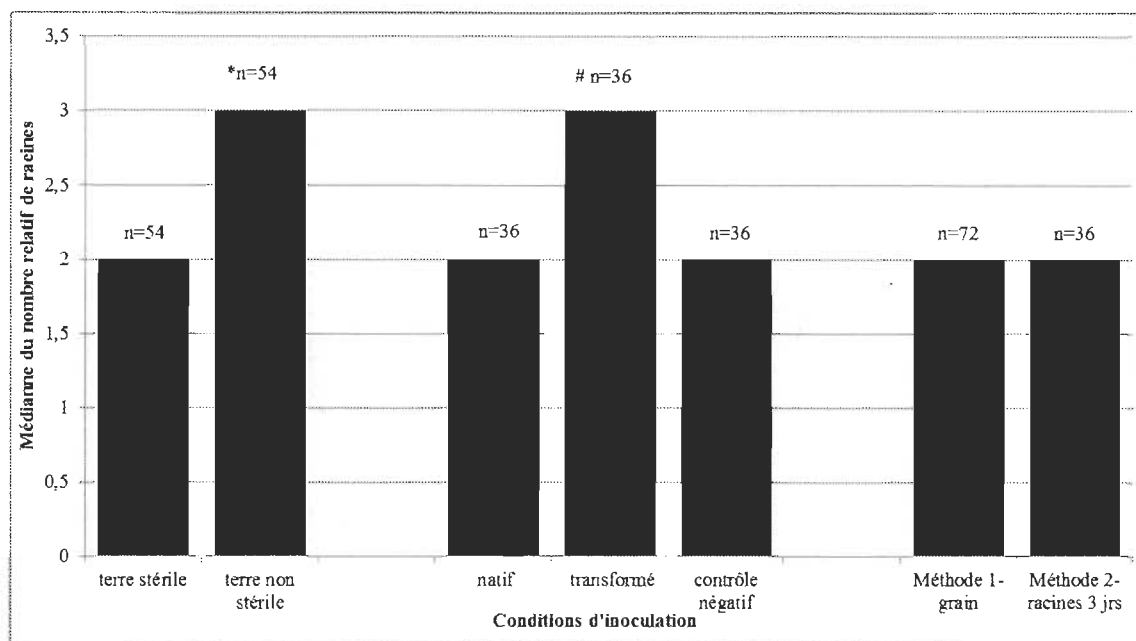
Après 8 jours de croissance, les conditions d'inoculation incluant le type de terreau, la présence de l'endophyte et la méthode d'inoculation n'influencent pas significativement le nombre de feuilles sur le plant de maïs ( $P > 0,05$ ) (voir Figure 3.9 en page 70).



**Figure 3.9 Impact des conditions d'inoculation sur la médiane du nombre de feuilles de maïs après 8 jours de croissance.**

Trois conditions ont été comparées: la stérilité du terreau, la présence de l'endophyte et la méthode d'inoculation ( $P > 0,05$ ).  
n représente le nombre d'échantillons.

Par contre, l'inoculation de l'endophyte a un impact significatif sur la quantification des racines. La transformation génétique et la méthode par laquelle cet endophyte est inoculé ne sont pas des facteurs d'influence ( $P > 0,05$ ) (voir Figure 3.10 en page 71). De plus, conséquemment avec l'étude de Mehnaz et Lazarovits (2006), le type de terreau a un impact significatif sur les racines de la variété 39D82 ( $P < 0,05$ ) (voir Figure 3.10 en page 71).



**Figure 3.10 Impact des conditions d'inoculation de *G. azotocaptans* natif et transformé sur la médiane du nombre relatif de racines après 8 jours de croissance.**

n représente le nombre d'échantillons.

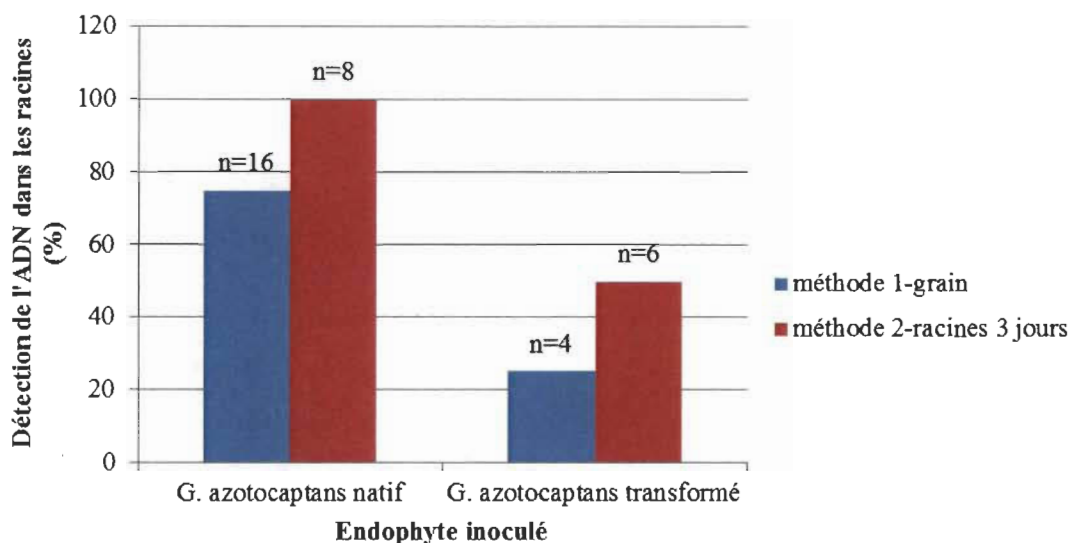
\* Nombre de racines significativement différent selon le type de terreau ( $P < 0,05$ ).

# Nombre de racines significativement différent comparativement au contrôle ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.4 L'impact des conditions d'inoculation des endophytes sur la colonisation des racines

Toutes conditions confondues, l'inoculation des racines de 3 jours par *G. azotocaptans* natif permet sa détection dans la totalité des racines de 8 jours testées. Lorsque le grain est inoculé, on obtient seulement 12 échantillons positifs sur 16 (voir Figure 3.11 en page 72). Il semble que l'inoculation des racines soit plus permissive à la colonisation par les endophytes que l'inoculation du grain, mais le nombre peu élevé d'échantillons ne permettent pas de déterminer une tendance significative. Comparativement, le pourcentage de détection du transformant est plus faible. Le nombre d'échantillon trop limité ne permet pas de conclure à ce niveau.



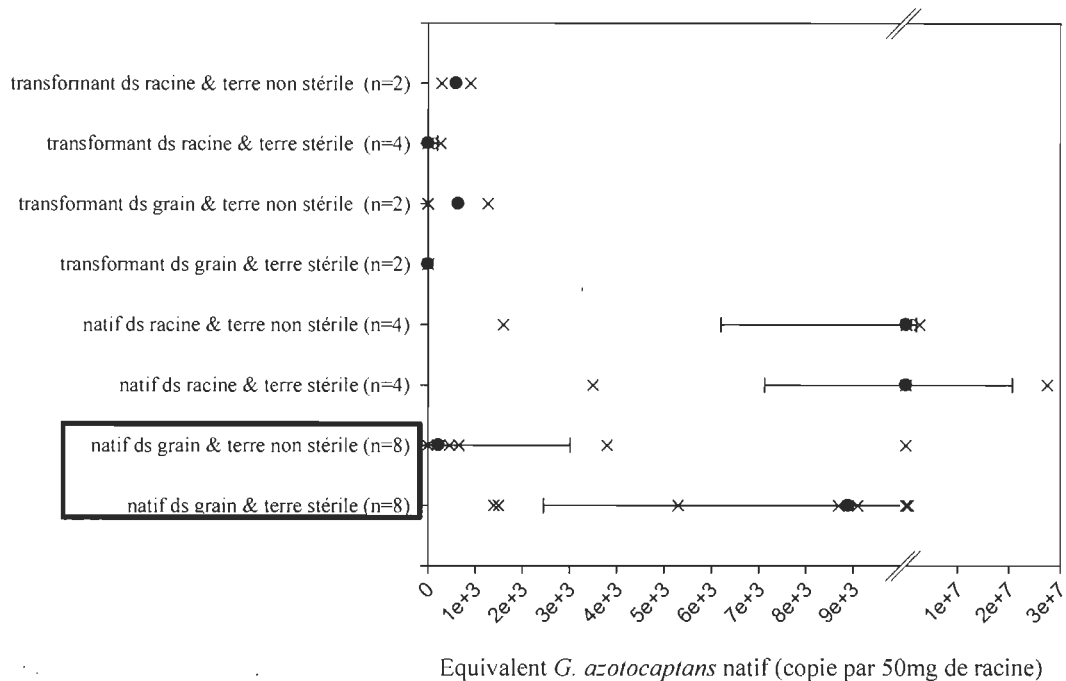


**Figure 3.11** Variation du pourcentage de détection de l'ADN de *G. azotocaptans* dans les racines après 8 jours de croissance selon la méthode d'inoculation.

n représente le nombre d'échantillons.

Une grande variabilité est observée lors de la quantification des endophytes dans les racines par PCR en temps réel (voir Figure 3.12 en page 73). Les résultats sont présentés malgré la limite de quantification élevée de  $10^4$  copies par 50 mg de racines ou par 200 mg de grain et le nombre restreint d'échantillons testés avec le transformant.

Le graphique permet surtout d'observer la différence de détection et de quantification lorsque le grain est inoculé avec l'endophytes natif en terre stérile comparativement à non stérile. L'ADN de *G. azotocaptans* natif est détecté dans 100 % des racines testées (8/8) après 8 jours de croissance en terreau stérile, mais seulement dans 50 % des racines (4/8) lorsque le terreau est non stérile. La détection et la quantification de l'ADN d'endophytes dans les racines après 8 jours de croissance est donc variable selon le type de terreau. La distribution des données et la médiane sont différentes. Le nombre peu élevé d'échantillons ne permettent pas de déterminer une tendance significative.

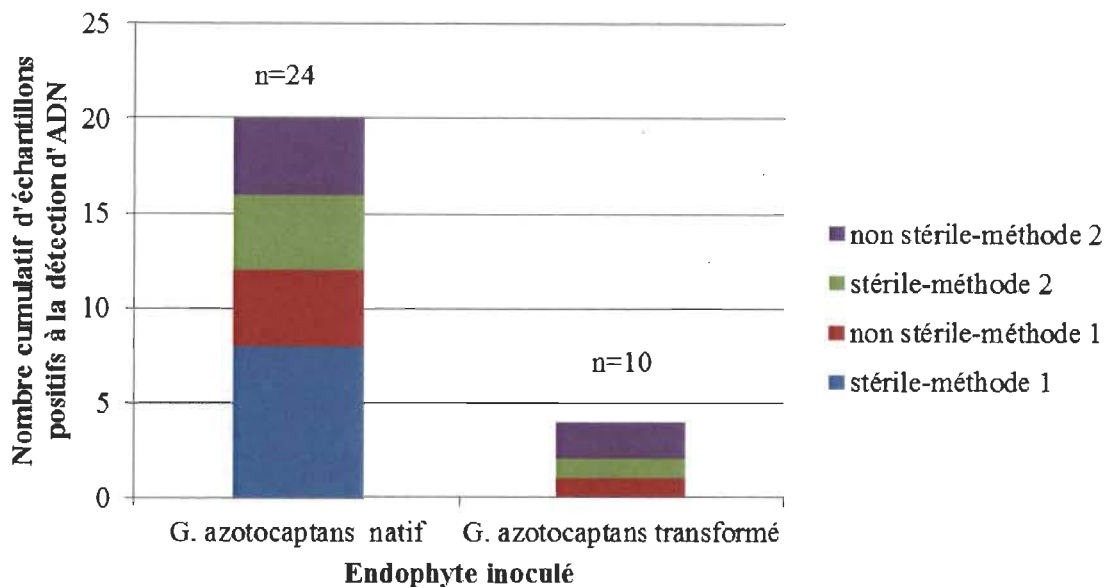


**Figure 3.12 Quantification du nombre d'endophytes dans les racines de 8 jours en fonction des conditions d'inoculation.**

La limite de quantification est de  $10^4$  copies par 50 mg de racines ou par 200 mg de grain.

x représente la quantification de l'endophyte et le point noir représente la médiane des données.

Toutes conditions confondues, l'ADN de *G. azotocaptans* natif peut être détecté dans 83 % (20/24) des racines après 8 jours de croissance comparativement à l'ADN de *G. azotocaptans* transformé qui est détecté dans 40 % (4/10) des racines (voir Figure 3.13 en page 74). Les différences de détection sont notables. Le nombre insuffisant d'échantillons ne permet pas de déterminer une tendance significative, mais permet de supposer que la détection de l'ADN d'endophytes dans les racines après 8 jours de croissance est variable en fonction de la transformation effectuée.



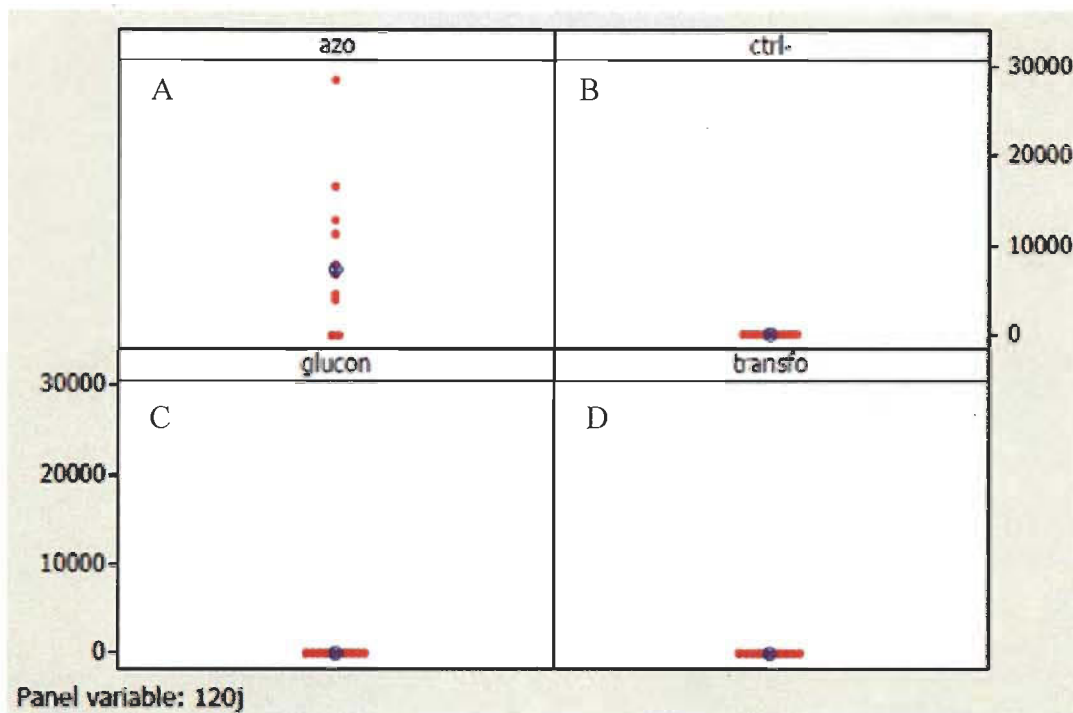
**Figure 3.13** Proportion du nombre d'échantillons de racines de 8 jours positifs à la détection de l'ADN de *G. azotocaptans* en fonction des différentes conditions d'inoculation.

n représente le nombre d'échantillons total testé.

### 3.2.5 L'évaluation de la persistance des endophytes.

Suite au trempage des racines à 6 jours de croissance, l'ADN d'*A. lipoferum* a été détecté à 120 jours dans 80 % des échantillons de racines matures (8/10) contrairement à l'ADN de *G. azotocaptans* natif (0/10) et transformé (0/10) qui n'a pas été détecté dans les échantillons de racines matures (voir Figure 3.14 en page 75).

L'ADN d'*A. lipoferum*, de *G. azotocaptans* natif (0/10) et transformé (0/10) n'a pas été détecté dans les grains des épis. Ces résultats négatifs sont conséquents avec ceux obtenus pour les grains dans une expérience préliminaire avec *G. azotocaptans* natif (0/7) et transformé (0/7) inoculé par la méthode 1. Toutes méthodes d'inoculation confondues, l'ADN de *G. azotocaptans* (n=34) et d'*A. lipoferum* (n=10) n'a pas été détecté dans aucun des 44 échantillons d'épi testés.



**Figure 3.14 Quantification de la présence d'endophytes dans les racines matures.**  
 La méthode d'inoculation utilisée est le trempage des racines à 6 jours.  
 A) Équivalent de copies d'*A. lipoferum* par 50 mg de racines matures  
 B) Quantification du nombre d'endophytes dans les racines des plants contrôles  
 C) Équivalent de copies de *G. azotocaptans natif* par 50 mg de racines matures.  
 D) Équivalent de copies de *G. azotocaptans* transformé par 50 mg de racines matures.

Les résultats obtenus suggèrent qu'*A. lipoferum* a la capacité de se déplacer verticalement de la rhizosphère vers les racines et y persister 120 jours à titre d'endophyte. Son déplacement vertical vers l'épi semble toutefois limité. *G. azotocaptans* natif et transformé semblent avoir une dispersion verticale et une persistance limitées, car ils ont la capacité de coloniser les racines à titre d'endophyte après 8 jours de croissance, mais leur ADN n'est plus détecté après 120 jours.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

#### 4.1 Le modèle expérimental

##### 4.1.1 Le choix des endophytes modèles

L'endophyte inoculé peut avoir de la difficulté à s'adapter aux conditions environnementales créées par le modèle expérimental. Il est possible qu'il ne puisse pas compétitionner avec la flore indigène, persister dans la rhizosphère ou se déplacer. Il est probable qu'il nécessite plusieurs jours voir des semaines pour s'établir, pour coloniser les différents tissus de la plante, stimuler la biomasse ou la photosynthèse. De nombreuses études sur la colonisation de l'intérieur des plantes y compris le maïs indiquent que plusieurs bactéries ont la capacité de se déplacer verticalement (Balsanelli et al. 2010; Estrada-de los Santos et al. 2001; Gagliardi et al. 2001; Lee et al. 2005; Muthukumarasamy et al. 2002; Nairn et Chanway 1999; Perin et al. 2006; Reinhold-Hurek et Hurek, 1998; Snyder et al. 1999; Sturz et al. 2000; Tian et al. 2009). Ces bactéries peuvent coloniser plusieurs tissus de la plante tels les racines, les tiges, les feuilles, les graines, les fruits, les tubercules, les ovules et les nodules de plants de légumes (Benhizia et al. 2004; Hallmann et al. 1997; Sturz et al. 1997). Tian et al. (2009) ont démontré le déplacement vertical de *G. diazotrophicus* vers les racines, les feuilles et les tiges de maïs. Par contre, Lindow et Brandl. (2003) ont observé que *Rhizobium* et *Azospirillum*, qui ont également la capacité de coloniser les racines, ne s'établissent pas sur les feuilles. La nature de l'endophyte est probablement un des facteurs les plus importants affectant la capacité de colonisation du tissu végétal.

Les genres *Gluconacetobacter* et *Azospirillum*, et plus précisément, les espèces *G. azotocaptans* et *A. lipoferum* respectivement ont été sélectionnées à titre d'endophytes modèles. Ces bactéries ont été choisies en premier lieu parce qu'elles ont été isolées

directement de la rhizosphère de plant de maïs au Canada (Mehnaz et Lazarovits, 2006; Oliveira et al. 2004). Le deuxième aspect qui a été pris en considération est leur potentiel commercial en tant que biofertilisant. En effet, ces bactéries sont bien caractérisées en tant que PGPB. Elles peuvent fixer l'azote atmosphérique, produire de l'AIA et fournir une amélioration significative de la croissance du plant de maïs en stimulant le développement de la biomasse (Amarger, 2002; Mehnaz et Lazarovits, 2006, Tian et al. 2009). Considérant la disponibilité des souches sur le marché, nous avons choisi *Azospirillum lipoferum* ATCC 29709 isolé d'un plant de maïs au Brésil, et *Gluconacetobacter azotocaptans* ATCC 700988 isolé de la rhizosphère d'un plant de café au Mexique.

Il est possible que leur provenance ait une importance et qu'une période d'adaptation des endophytes aux conditions de croissance de notre variété de maïs ait été préférable (Gu et Mazzola, 2001). Aucun problème de mise en culture n'a été remarqué, mais le temps de croissance de *G. azotocaptans* de 5 jours a certes limité notre capacité à reproduire les expériences effectuées.

#### 4.1.2 La chambre de croissance de niveau de confinement 2

La mise en place d'une chambre de croissance NC<sub>2</sub> permettait d'évaluer la colonisation des racines et de la partie comestible du maïs par les endophytes ainsi que leur effet sur le rendement du plant sous des conditions contrôlées de température et de luminosité. La chambre permettait également le développement d'une expertise sur le niveau de biosécurité pouvant être requise lors de l'évaluation d'endophyte génétiquement modifié. Le niveau de confinement 2 nécessitait un contrôle étroit des résidus, de la disposition de l'eau, et de la filtration de l'air. Si la littérature rapporte plutôt l'utilisation des serres pour la croissance des plants de maïs, il existe peu de serres NC<sub>2</sub> au Canada permettant de réaliser ce type d'expérience. Le protocole de croissance en chambre, de la germination du grain jusqu'à la maturité des plants, a donc été adapté aux conditions de confinement de niveau 2. Les facteurs abiotiques incluant la température, l'humidité, la photopériode et les caractéristiques du sol dont le protocole

de fertilisation ont été contrôlés afin de permettre une croissance des plants jusqu'à maturité. Toutefois la technique de fécondation croisée utilisée, due au fait que la maturité de la panicule permissive au prélèvement du pollen était plus précoce que l'apparition des soies, ne permettait pas un développement de la totalité des grains. Si dans l'ensemble l'objectif lié à la mise en place de la chambre de croissance a été atteint, la taille des épis et le nombre de grains suggèrent un biais avec la réalité en champs probablement associé au protocole de pollinisation.

#### 4.1.3 Le transformant

Le développement d'un transformant s'est avéré difficile. La transformation devait permettre d'évaluer l'influence d'une modification génétique de la bactérie native sur son déplacement vertical. L'introduction d'une protéine gfp avait comme objectif la confirmation visuelle de la présence du transformant dans les racines et les grains par microscopie à fluorescence. Si nécessaire, la propriété de résistance aux antibiotiques aurait pu faciliter la détection par mise en culture préalable des échantillons de racines ou des grains. Le plasmide utilisé, pUTmini-Tn5gfp, permet une insertion aléatoire du gène gfp dans le génome bactérien (Matthysse et al. 1996). Toutefois, les résultats de fluorimétrie et de microscopie ont démontré une expression génotypique insuffisante. Considérant la détection du gène par la PCR dans le transformant et l'expression de l'antibiorésistance, la principale hypothèse est que le promoteur natif ou un autre élément modulant l'expression de la gfp n'était pas optimal. L'expression du gène de fluorescence de ce vecteur serait dépendante de l'insertion du transposon près d'un promoteur fort du chromosome bactérien. Le marquage de notre transformant avec un gène constitutif aurait pu être une option intéressante afin d'optimiser l'expression de la fluorescence. Cette approche a déjà été utilisée pour localiser les endophytes et suivre la dynamique de leur propagation (Chi et al. 2005; Compant et al. 2010; Coombs et Franco, 2003; Ikeda et al. 2010; Rouws et al. 2010). Nous aurions également pu utiliser un plasmide constitutif tel que le p519ngfp (Matthysse et al. 1996). Par contre, la conjugaison triparentale utilisée lors du transfert de ce plasmide (Persello-Cartieaux et al. 2001) aurait été difficile à mettre en application due au temps de croissance de *G.*

*azotocaptans*. Considérant que nous avons tout de même un endophyte transformé retraceable par la PCR, le *G. azotocaptans* résistant à la tétracycline a été retenu pour effectuer le suivi d'un GMM modèle dans la chambre de croissance.

#### 4.1.4 La PCR en temps réel

Le développement d'un protocole de détection de l'ADN des endophytes modèles dans la matrice végétale était un autre défi du projet. La technique qPCR, utile pour la détection de microorganismes chez la plante ou dans le sol, est plus rapide et offre une meilleure sensibilité et spécificité que les méthodes de détection conventionnelles (Holland et al. 1991; Mullis, 1987; Vincelli et Tisserat, 2008). Ces méthodes requièrent une mise en culture des endophytes de plusieurs jours pour permettre leur détection avec une sensibilité somme toute limitée (Menhaz et Lasarovits, 2006; Palacio-Bielsa et al. 2009; Tian et al. 2009).

L'analyse de la courbe standard de *G. azotocaptans* extrait de racines ou de grain a démontré que nous pouvions détecter et quantifier les endophytes. Les résultats de quantification sont toutefois très variables. Les valeurs s'échelonnaient sur plusieurs log (entre  $10^4$  et  $10^7$  équivalents de bactéries par 50 mg de racines). Wulff et al. (2003) ont rapporté un taux de colonisation par *Bacillus subtilis* variant entre  $10^3$  et  $10^7$  UFC par gramme de tissu frais dans le maïs sucré et le coton. Cette variabilité de la population pourrait dépendre de la distribution de la bactérie dans la rhizosphère suite à l'inoculation ainsi que de l'échantillonnage. Pinton et al. (2001) ont déterminé que malgré la présence d'une grande population de bactéries dans la rhizosphère, seulement 7 à 15 % des racines sont colonisées par des microorganismes (Pinton et al. 2001). Ces résultats suggèrent que la colonisation n'est pas distribuée également dans le tissu testé, mais il est également possible que celle-ci soit transitoire. Selon l'étude de Liu et al. (2006) avec le maïs et le riz, *Bacillus megaterium* migre lentement des racines à la tige pour ensuite se déplacer. Une faible population de bactérie se retrouve ainsi à l'intérieur de la plante. Les conditions environnementales, l'espèce bactérienne et le stade de développement de l'hôte (Dudeja et al. 2012) sont également des facteurs à considérer



dans la variabilité des résultats de quantification. Par exemple, il existerait une relation entre la concentration en sucrose de la variété de maïs utilisé et le pourcentage de colonisation du plant (Tian et al. 2009).

Des résultats de quantification similaires ont été obtenus avec *A.lipoferum*. Par contre, l'efficacité obtenue avec la courbe standard d'*A. lipoferum* lors des essais sur les épis est problématique. Cette courbe standard démontre la présence d'inhibiteurs en plus d'une surestimation quantitative probablement reliée à une erreur technique lors des dilutions des échantillons pour la courbe standard. D'un autre côté, les courbes de dissociation ne présentaient pas de pic supplémentaire indiquant l'amplification de dimères d'amorces ou de produits non spécifiques. Les températures de dissociation ( $T_m$ ) ont donc permis d'analyser les échantillons de grain de façon qualitative et de confirmer l'absence d'amplification d'*A. lipoferum* dans les épis. Dans l'éventualité où les échantillons de grain avaient été positifs à la présence de l'ADN d'*A. lipoferum*, les valeurs de quantification n'auraient pas été fiables.

La concentration d'endophytes naturels chez le maïs peut varier entre  $10^2$  et  $10^6$  UFC par gramme de tissu (Kobayashi and Palumbo, 2000). Une autre étude analysant cinq souches de *Rhizobium gfp* inoculées dans la rhizosphère du plant de riz a permis de détecter une concentration variant de  $10^{4.3}$  à  $10^{6.1}$  UFC par gramme de tissu frais de racines stérilisées (Chi et al. 2005). Nos limites de détection et de quantification ne nous permettraient pas de détecter et quantifier dans tous les cas ces communautés endophytes. Une période d'enrichissement par mise en culture du grain ou des racines aurait été une alternative peu coûteuse permettant d'améliorer la sensibilité de la méthode. *Azospirillum* a été trouvé en association avec les plants de maïs dans plusieurs études à l'aide de méthodes utilisant la mise en culture (Baldani et al. 1986 *a* et *b*; Baldani et Dobereiner, 1980; Palus et al. 1996). Par contre, la croissance lente de *G. azotocaptans* en compétition avec une flore indigène endophyte à croissance plus rapide serait un obstacle à considérer dans l'évaluation de cette approche.

## 4.2 Les conditions d'inoculation des endophytes

Le développement de la chambre de croissance NC<sub>2</sub>, du transformant et de la méthode de détection a permis d'évaluer la colonisation des racines et des grains par les endophytes modèles. Toutefois, la littérature et nos résultats, somme toute préliminaires, semblent démontrer que les conditions d'inoculation représentent un biais important à considérer pour l'interprétation des résultats. Lors des études sur les endophytes et/ou PGPB, la plupart des chercheurs ne s'entendent pas concernant les conditions à privilégier et utilisent des méthodes d'inoculation non reproductibles en champs (Gholami et al. 2012; Menhaz et al. 2005; Tian et al. 2009). Ce sujet d'une importance fondamentale pour l'étude des biofertilisants est loin d'être réglé.

Trois différentes méthodes d'inoculation ont été testées afin de favoriser l'entrée des endophytes et observer leur impact sur la détection. La méthode 1 qui consistait à l'inoculation du grain mis en terre est la plus représentative de la réalité agricole. La méthode 2 impliquait l'inoculation des racines. Son efficacité sur le plant de variété de maïs 39D82 a déjà été démontrée par Mehnaz et Lazarovits (2006). Enfin la méthode 3 basée sur l'expérience de Tian et al. (2009) utilisait de jeunes plants de 6 jours dont les racines nettoyées étaient trempées dans l'inoculum. Il est fort probable que le niveau de stress subi par le plant ainsi que les microtraumatismes occasionnés aux racines soient différents entre ces trois approches. L'efficacité de la méthode 1 sur la biomasse semble équivalente à la méthode 2, mais nos résultats suggèrent qu'elle est moins efficace en ce qui concerne le taux de colonisation des racines par les endophytes. La méthode 3 a été utilisée pour le test de persistance 120 jours suite aux résultats obtenus des expériences court terme avec les méthodes d'inoculation 1 et 2. De plus, Tian et al. (2009) ont démontré qu'avec cette méthode d'inoculation *G. diazotrophicus* peut coloniser différents tissus du maïs y compris les racines après 30 jours. La méthode est donc permissive à l'entrée des endophytes. Malheureusement, faute d'espace et de temps, une seule expérience a été réalisée à 120 jours avec cette méthode d'inoculation : ceci limite fortement l'interprétation des résultats et les conclusions qui peuvent en être tirées. Idéalement, une répétition des expériences long terme avec les trois différentes

méthodes d'inoculation aurait dû être effectuée, car l'inoculation représente une étape critique pour ce type de recherche et demeure une question non résolue.

Lors de l'introduction d'une nouvelle population en terre, la littérature indique qu'il est possible que la bactérie inoculée ne puisse pas s'attacher aux racines, se nourrir adéquatement, et surtout qu'elle ne puisse pas compétitionner la flore résidente (Amarger, 2002). Les conditions environnementales locales ont un effet crucial sur la survie de l'inoculant en compétition avec la population native et pour exprimer son potentiel, la bactérie génétiquement modifiée a besoin de rivaliser avec les bactéries de la rhizosphère déjà présentes (Amarger, 2002). Par exemple, nous savons que les champignons peuvent sécréter des substances qui ont un effet sélectif sur la communauté microbienne (Marschner et Timonen, 2005). La colonisation par les mycorhizes peut influencer le taux de croissance bactérien et leur organisation dans la rhizosphère (Barea et al. 2002a). Il est donc probable que les relations symbiotiques ou de compétitions retrouvées dans la microflore du terreau puissent influencer la colonisation par les endophytes. Ainsi, un test court terme a été effectué afin d'étudier la possibilité d'un lien entre la capacité de colonisation de l'endophyte et la stérilité du sol (Tian et al. 2009). Le but étant d'éliminer la compétition par la flore résidente et d'éviter l'endommagement des jeunes racines par les larves d'insectes dans les jours qui suivent l'inoculation.

Sous nos conditions expérimentales, la stérilisation du terreau semble favoriser la colonisation puisque l'ADN de *G. azotocaptans* natif a été détecté dans la totalité des racines de 8 jours comparativement à un taux de détection de 50 % lorsque le terreau est non stérile. Le nombre d'échantillons avec le transformant est trop limité pour tirer des conclusions. S'il est évident que la stérilité du terreau ne représente pas une condition de terrain, les résultats obtenus apportent de l'information supplémentaire sur la capacité de colonisation des endophytes et sur les limites associées à l'interprétation de résultats utilisant ces conditions.

Toutes conditions d'inoculation confondues, lorsque les endophytes modèles ont la capacité de coloniser le maïs, ils peuvent avoir un effet sur la productivité du plant. C'est par l'analyse, par exemple de la biomasse et dans notre cas, de la photosynthèse, plus particulièrement par l'étude du transport d'électron dans le photosystème II, que nous avons choisi d'évaluer certains aspects de cet impact.

### **4.3 L'étude de la photosynthèse**

L'étude de la fluorescence a permis d'étudier le transport des électrons dans le PSII des feuilles testées. Le principe de la fluorescence réside dans le fait que lorsqu'une molécule est excitée par une onde électromagnétique, elle atteint un état d'énergie supérieur « S ». Afin de revenir vers son état d'énergie fondamental, elle peut subir en premier lieu une désactivation interne des niveaux d'énergie vibrationnelles. Ensuite, plusieurs phénomènes sont possibles afin qu'elle revienne à son état de base (« ground state »). La compétition pour la désactivation se produit donc entre le phénomène de photochimie, la désactivation radioactive et la fluorescence (Skoog et al. 1997). S'il y a émission d'un photon lorsque la molécule revient à son état fondamental d'énergie; c'est le phénomène de fluorescence qui se produit. On parle ici de réaction dans l'ordre des nanosecondes. La plupart des molécules prennent le chemin de relaxation le plus rapide qui est la désactivation radioactive. Par contre, si la molécule a des caractéristiques structurales particulières, elle peut émettre de la fluorescence au lieu de revenir à l'état basal d'énergie par photochimie ou émission d'énergie non radiative.

Au niveau des systèmes photosynthétiques, le signal de fluorescence obtenu provient des antennes photocollectrices, plus précisément des centaines de chlorophylles qui les constituent (Butler, 1978). La fluorescence chlorophyllienne peut provenir à la fois des antennes des photosystèmes I et II. Par contre, sous nos conditions expérimentales (température, longueur d'onde, type de plante), la fluorescence provenant du PS1 n'est pas plus de 20 % (Roelofs et al. 1996). Ainsi, lorsque l'énergie lumineuse est captée par l'antenne, elle peut être dissipée par les trois façons citées précédemment. On peut alors utiliser l'équation suivante :

$L$  (énergie lumineuse) =  $E$  photochimique +  $E$  non radiative (chaleur) +  $E$  fluorescence.

En observant l'équation, on peut déduire que l'augmentation de l'un des types d'énergie entraînera la diminution d'un autre et vice-versa.

L'induction de fluorescence a été découverte par Kautsky et Hirsch et est définie par la mesure de la fluorescence en fonction du temps (Kautsky et Hirsh 1931). Elle est souvent utilisée pour étudier le transport d'électron dans le photosystème II et peut aussi être utile pour évaluer l'effet de différents polluants et herbicides directement sur les feuilles ou sur du matériel photosynthétique isolé. Dans notre cas, elle a permis de comparer la cinétique de transfert provenant d'échantillons contrôles versus des échantillons ayant subi un traitement microbien.

L'étude cinétique du PSII dépend de l'état redox de l'accepteur primaire d'électron  $Q_A$ . Lorsque le centre réactionnel est ouvert,  $Q_A$  est oxydé et il peut accepter un électron. Dans ce cas, la photosynthèse (photochimie) se produit au détriment de la fluorescence. D'autre part, lorsque le centre réactionnel est fermé, la molécule  $Q_A$  est réduite ( $Q_{A-}$ ), elle ne peut pas accepter d'électron et le signal de fluorescence est à son maximum (Joly et Carpentier 2009). Le même principe s'applique pour PQ, c'est-à-dire que le rendement de fluorescence est élevé lorsque PQ ne peut pas accepter d'électron. La fluorescence est ainsi favorisée lorsque les conditions de photochimie sont défavorables.

Les recherches sur l'origine des phases obtenues lors des essais de fluorescence ne cessent de progresser, mais plusieurs notions restent encore un mystère. L'analyse visuelle des courbes permet de distinguer des variations majeures et de tirer des conclusions plutôt sommaires, mais les détails concernant les phases sont pour l'instant difficile à comprendre. Ainsi, on a pu les étudier et comprendre qu'elles semblent être reliées aux équilibres redox de  $Q_A$ ,  $Q_B$  et PQ (Lazar et Pospisil, 1999). Autrement dit, elles sont reliées à l'accumulation maximale de différentes espèces réduites du côté accepteur du PSII (Gauthier et al. 2010). On croit également, que les phases de la FI seraient influencées par les états d'oxydation S du COE. Il est connu que la fluorescence

est minimale quand la population de S2 et S3 est maximale, que le point Fo ou O représente aussi l'énergie d'excitation dissipée par les photons avant qu'ils n'atteignent le centre réactionnel (Boisvert et al. 2006). La plupart des auteurs s'entendent également pour dire que la fluorescence maximale (Fm) est atteinte lorsque le bassin de PQ est complètement réduit (Lazar, 2003; Strasser et al. 1995).

Plusieurs hypothèses sont également émises concernant chacune des phases. Il a été déterminé que la phase O-J serait peut-être associée à l'accumulation de l'accepteur quinonique primaire  $Q_A$  sous sa forme réduite  $Q_{A-}$  (Gauthier et al. 2010; Rees et Horton 1990; Strasser et al. 1995), mais les récentes publications semblent nuancer cette hypothèse en parlant de l'origine de la phase O-J comme étant représentée par un équilibre dans la formation de l'espèce  $Q_{A-}$  plutôt que par son accumulation. Cette phase serait aussi affectée par le cycle des états S du COE (Gauthier et al. 2010). Tandis que la phase I-P serait associée à la réduction du bassin de PQ (Gauthier et al. 2010; Lazar et Pospisil 1999; Zhu et al. 2005) c'est-à-dire que cette phase correspondrait à l'épuisement des plastoquinones capable de réoxyder  $Q_{A-}$ . Pour ce qui est de la phase J-I qui semble encore difficile à comprendre, on sait que, contrairement à I-P, J-I ne serait pas associée à la réduction du bassin de PQ (Boisvert et al. 2006). Elle serait peut-être associée au  $Q_B$  double réduit ( $Q_{B-}$ ) et à la balance des  $Q_A$ .

La grande quantité de questionnements non résolus sur le sujet ne permet pas de conclure sur les résultats d'induction de fluorescence obtenus lors de nos expérimentations. En fait, ils permettent surtout une comparaison visuelle et quantitative de chacune des phases O-J, J-I et I-P ainsi que l'évaluation des paramètres de rendement photochimique entre les échantillons traités et les contrôles. Ainsi, la diminution observée dans l'amplitude de la phase O-J suppose que l'accumulation de  $Q_A$  réduit dans le PSII des feuilles est influencée par le traitement des racines avec *G. azotocaptans* natif, mais aucune différence au niveau de la phase I-P n'a été déterminée. On peut supposer que le traitement ne change pas la réduction du bassin de PQ du PSII.

Suite à l'analyse des résultats, on peut également supposer que les paramètres de rendement photochimique n'ont pas été affectés par le traitement bactérien. Une hypothèse serait que le traitement microbien n'augmente pas le rendement photochimique des photosystèmes, mais seulement leur nombre. La technique de fluorescence indique la capacité moyenne des photosystèmes présents sans toutefois apporter d'information sur leur concentration dans la feuille. De plus, les rendements  $F_v/F_m$  obtenus lors des expérimentations ne sont pas aussi élevés que désiré. En effet, lors de conditions optimales, un ratio  $F_v/F_m$  de 0,84 peut être calculé (Rees et Horton, 1990; Strasser et al. 1995). Cette valeur théorique permet de mettre en cause l'état des feuilles, il est possible que leur fraîcheur n'était pas optimale. L'utilisation de membranes thylacoïdes au lieu de feuille entière aurait peut-être permis de régler la situation.

Néanmoins, malgré un grand avancement sur le sujet, la cinétique de l'induction de fluorescence varie selon le stade de croissance de la plante, l'âge des feuilles et l'adaptation dans le noir. Plusieurs informations restent à considérer et à découvrir pour la compréhension complète des phases. Il demeure que la technique permet de visualiser l'ampleur de l'impact du traitement microbien.

Trois phases sont également observées dans les courbes de déclin de fluorescence. Une phase rapide qui est associée à la réoxydation de  $Q_{A-}$  par  $Q_B$ ; une phase moyenne associée à la réoxydation de  $Q_{A-}$  dans les centres réactionnels de PSII avec une poche de  $Q_B$  vide et une phase lente associée à la fluorescence constante de fond. La technique de déclin de fluorescence est utile pour étudier la cinétique liée au transport des électrons entre  $Q_A$  et  $Q_B$  dans les feuilles entières et les techniques non invasives utilisées ont favorisé la répétition des expériences.

Par contre, lors de l'obtention des données, toutes les techniques d'étude par la fluorescence font face à une atténuation qui résulte en une diminution du signal de fluorescence. Elle est divisée en deux types : photochimique et non photochimique. Par exemple, si  $Q_A$  ne porte aucune charge, il peut dans cet état accepter un électron. En

conséquence,  $Q_A$  peut effectuer des réactions photochimiques au détriment de l'émission de fluorescence; il est alors considéré comme un atténuateur photochimique de la fluorescence (Krause et Weis, 1991; Samson et al. 1999; Vernotte et al. 1979). De plus, certaines molécules désactivent les excitations directement au niveau des antennes photocollectrices. Une partie des excitons n'atteindra pas le centre réactionnel et on observera une diminution de la fluorescence. Ce type d'atténuation est utilisé par les PQ oxydés qui sont des atténuateurs non photochimiques du signal de fluorescence (Rajagopal et al. 2003; Vasilev et al. 1998; Zhu et al. 2005).

Considérant cette limite, l'étude de la photosynthèse par la thermoluminescence aurait pu être utilisée. L'avantage de la méthode est qu'elle permet l'étude sélective du PSII du côté donneur ainsi que du côté receveur. Elle aurait permis de supporter nos résultats de fluorescence et enrichir la documentation sur le sujet.

En effet, la littérature connue laisse présumer que l'inoculation d'un PGPB pourrait avoir un impact sur la photosynthèse sans toutefois préciser l'impact sur le PSII. Un lien entre la photosynthèse et la production de phytohormone et/ou la fixation d'azote a été avancé (Harley et al. 1992, Shoukat Hussain Shah, 2011). Les auteurs soupçonnaient une augmentation de l'activité de la rubisco, mais également du transport des électrons suite à la fixation de l'azote (Harley et al. 1992). De plus, un lien entre cette fixation d'azote et la chlorophylle a été démontré par Baset Mia et al. (2010a). Il est probable que l'effet photosynthétique soit associé à la stimulation de la croissance des feuilles par les phytohormones et/ou pourrait être la conséquence d'une incorporation d'azote plus élevé qui a contribué à la formation de la chlorophylle. Considérant que *G. azotocaptans* peut produire l'AIA et fixer l'azote (Mehnaz et Lazarovits, 2006), une hypothèse est que sous nos conditions expérimentales, *G. azotocaptans* n'ait pas eu suffisamment de temps pour s'établir, influencer le nombre ou la taille des feuilles, conséquemment la concentration en chlorophylle et le nombre de photosystèmes, et avoir un impact significatif sur la photosynthèse.



Pourtant, l'étude de Stefan et al. (2013) indique que la réponse de l'inoculation par des rhizobactéries était relativement élevée dans les premiers stades de croissance du riz. Le traitement avec un PGPR *Bacillus mycoides* S7 a démontré une hausse significative de la valeur du taux de photosynthèse lors de la phase végétative (Stefan et al. 2013). Cela pourrait être lié aux échanges de nutriments des racines qui sont plus intenses pendant cette phase (Zamfirache, 2005). Par contre, une hausse de la teneur en chlorophylle est observée pendant la floraison précoce et tardive seulement (Stefan et al. 2013). La chlorophylle étant responsable du signal de fluorescence, une hypothèse est que la phase végétative ne soit pas le moment opportun pour tester le transport d'électrons dans le PSII suite à l'inoculation de notre endophyte à croissance lente.

De plus, la disponibilité de l'eau, la température et les nutriments, particulièrement, N et P, des enzymes et des cofacteurs tels que le fer, le cuivre sont importants pour le bon fonctionnement des processus photosynthétiques (Cakmak et Engels, 1999; Lambers et al. 1998). L'effet de l'inoculation des rhizobactéries sur la photosynthèse n'est pas uniforme entre les traitements et les stades de croissance du plant (Stefan et al. 2013). Il est donc probable que les conditions de croissance que nous avons choisies et le calendrier de fertilisation utilisé aient eu un impact sur nos résultats. Ces facteurs auraient pu être étudiés plus en profondeur.

En regard des objectifs, malgré le fait que de légères variations ont été remarquées, le traitement bactérien de *Gluconacetobacter azotocaptans* natif au niveau des racines de maïs n'influence pas de façon majeure les paramètres OJIP associés au PSII ainsi que le transport d'électron entre  $Q_A$  et  $Q_B$  dans le PSII.

Sous nos conditions expérimentales, l'inoculation de *G. azotocaptans* sur le grain n'influence pas négativement le rendement photochimique et ne provoque pas de stress majeur au niveau des paramètres de photosynthèse étudiés. Dans une perspective commerciale, la bactérie inoculée n'importune pas le PSII. Nos résultats permettent de recueillir des données supplémentaires utiles au niveau de l'étude sur l'évaluation de

cette bactérie, mais il demeure que l'impact de l'inoculation des bactéries sur le plant est directement relié à leur persistance dans leur nouvel environnement.

#### **4.4 Le déplacement vertical et la persistance des endophytes**

Sous nos conditions expérimentales, l'ADN de *G. azotocaptans* natif et transformé ainsi que l'ADN d'*A. lipoferum* a été détecté dans les racines sans être détecté dans l'épi. Pour coloniser la partie comestible du maïs, le modèle d'endophyte doit se déplacer verticalement en partant du site primaire d'infection et persister à titre d'endophyte dans la plante mature. Il a été signalé que *G. diazotrophicus* peut coloniser les tissus de canne à sucre comme les vaisseaux xylémiques des racines et de la tige (Muthukumarasamy et al. 2002). La bactérie peut vivre dans l'espace intercellulaire des racines et de la tige, mais également dans les feuilles (Boddey et al. 1991). Tian et al. (2009) ont détecté *G. diazotrophicus* à l'intérieur des racines de maïs 30 jours après l'inoculation. Leur étude indique que la bactérie a la capacité de vivre, de s'établir et de persister dans le plant de maïs, mais peut également se déplacer vers d'autres tissus et organes après la colonisation. Nous détectons *G. azotocaptans* après 8 jours sans toutefois le retrouver dans les racines matures. Supposant que la colonisation initiale de l'intérieur des racines était efficace, la bactérie devrait s'y retrouver après 120 jours. Les conditions de croissance et le temps nécessaire à la colonisation pour que *G. azotocaptans* puisse s'établir à titre d'endophyte étaient-ils adéquats ou est-ce vraiment l'espèce bactérienne *azotocaptans* qui est le facteur d'influence sur la persistance? Le fait de ne pas retrouver de trace d'ADN dans les racines matures suppose que l'ADN bactérien détecté à 8 jours dans les racines a été dégradé après 120 jours ou que la bactérie n'a pas colonisé réellement les jeunes racines à titre d'endophyte. La bactérie peut coloniser transitoirement ou accidentellement via des blessures l'intérieur des racines pour ensuite retourner vers la rhizosphère, mais elle peut également coloniser la rhizoplane sans atteindre l'intérieur de la racine. Cette dernière hypothèse impliquerait que l'étape de stérilisation des racines n'a pas été suffisamment efficace pour déloger les *G. azotocaptans* présents à l'extérieur des racines. La colonisation de la rhizoplane pourrait aussi expliquer l'effet de l'inoculation de la bactérie sur le développement des racines de

8 jours. Une évaluation de la procédure de décontamination aurait pu répondre à certains aspects de cette question (Zinniel et al. 2002).

Les expériences effectuées avec le GMM, même si limitées, semblent démontrer les mêmes tendances. Notre modèle GMM colonise les racines pour un temps limité, mais de façon moins efficace que le natif. Une étude de Da et Deng (2003) indique que les modifications génétiques réduisent la survie du GM *S. meliloti* 104A14. Il est donc possible que la modification génétique de *G. azotocaptans* ait affecté sa persistance ou qu'elle nuise à sa capacité de compétitionner efficacement la flore indigène lors de l'inoculation. D'autres expérimentations concernant l'efficacité du transformant en relation avec la persistance devraient être effectuées. L'importance des paramètres telle que la variété de maïs, le type de sol, la compétition endogène, le mode d'inoculation, la souche d'endophyte, les modifications génétiques de la bactérie sont indicatifs d'une grande spécificité de la relation hôte-endophyte. Une telle spécificité pourrait être considérée comme un avantage dans le développement de ces produits. Ce sont d'importants éléments qui restreignent la mobilité des endophytes GMM et leur capacité à coloniser des hôtes non désirés.

Une panoplie de facteurs influence également les conclusions concernant la colonisation du maïs par les endophytes modèles. Plusieurs questionnements demeurent en suspens dû au nombre très limité de paramètres pouvant être étudiés à la fois et au temps de croissance de 120 jours nécessaire à la formation des épis. L'absence d'ADN bactérien dans la matrice peut indiquer l'incapacité de migration de l'endophyte ou une mauvaise persistance dans les conditions expérimentales, mais peut également signifier une difficulté de détection causée par une population transitoire et/ou faible. Une fertilisation élevée en azote semble aussi influencer la colonisation par les endophytes tels *G. diazotrophicus* dans la canne à sucre (Fuentes-Ramirez et al. 1999). Lorsque l'endophyte est détecté, il est probable qu'une distribution non homogène des bactéries dans les racines ou l'épi fasse varier la quantification de l'ADN bactérien d'un échantillon à l'autre. Une plus grande quantité d'échantillons et la répétition de certaines expériences auraient été souhaitables afin de tenter de comprendre l'effet de toutes ces

variables. Le temps alloué au développement de la chambre de croissance NC<sub>2</sub> et aux transformants ainsi qu'à l'étude des conditions d'inoculation a restreint le nombre d'expérimentations.

Plusieurs paramètres pouvant avoir une influence sur la colonisation par les endophytes et la productivité des plants de maïs n'ont pas été explorés dans cette étude. Par exemple, il serait intéressant d'augmenter la concentration de bactéries inoculées, d'analyser les résultats à différents temps de croissance et avec d'autres tissus telle la tige ou de modifier la variété de maïs-grain par un maïs sucré (James et al. 2000; Lahda et al. 1982; Reis et al. 2000; Roesch et al. 2008; Tian et al. 2009). D'autres endophytes tels que *Burkholderia graminis* (Viallard et al. 1998) et *B. cepacia* genomovar III (Balandreau et al. 2001) qui ont été retrouvées abondamment dans le maïs en champs en France ainsi que *B. vietnamiensis* isolées de la tige de maïs et de racines stérilisées au Mexique (Estrada-de los Santos et al. 2001; Perin et al. 2006) mériteraient aussi d'être étudiés à titre de biofertilisants efficaces pour le maïs.

À l'avenir, il serait aussi intéressant de considérer sur le terrain la dispersion des GMM par les insectes, par les blessures ou par les échanges génétiques avec la flore résidente. L'observation du déséquilibre qu'ils provoquent au niveau de la population du sol, de leur vitesse et distance de migration, de la colonisation d'hôtes non ciblés ainsi que leur temps de survie dans l'environnement sont d'autres informations utiles à recueillir. La dissémination non désirée de gènes ainsi que la dispersion verticale (autour des racines et par la tige) et horizontale (par les procédés de labourage, par l'eau et les insectes) de différents GMM sont d'autres projets qui méritent qu'on s'y attarde.

Certaines recherches semblent démontrer que le déplacement vertical des endophytes durant la croissance de la plante est limité à la rhizosphère des plants inoculés. D'autres ont confirmé la possibilité de déplacement vers la tige et la phyllosphère. Aucune recherche connue, y compris celle-ci sur *Azospirillum* et *Gluconacetobacter*, n'a démontré la présence de ces endophytes dans l'épi du maïs. Est-

il est avantageux pour les bactéries de la rhizosphère de se déplacer vers ce type de tissu...  
ou encore pour la plante de favoriser leur colonisation?

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

Les objectifs du projet ont été atteints. Nous avons mis en place une chambre de croissance NC<sub>2</sub>, développé un protocole de détection d'ADN par la PCR et préparé un transformant qui a été inoculé avec deux autres modèles d'endophytes *A. lipoferum* et *G. azotocaptans* natif au niveau des racines et de la rhizosphère du maïs. Suite à l'extraction dans chacune des matrices, le suivi de l'ADN bactérien a été effectué par la PCR en temps réel dans les racines et les grains de l'épi. L'étude impliquait une supervision étroite de chacun des paramètres de croissance pendant 120 jours et une pollinisation efficace des plants pour permettre la formation d'un épi. Nous avons ensuite évalué l'effet de l'inoculation de l'endophyte sur le photosystème II par l'étude des courbes et des différents paramètres de l'induction de fluorescence et de décroissance de fluorescence.

Malgré le fait que certaines expériences doivent être reproduites ou encore optimisées avant de permettre des conclusions définitives, ce projet a permis de contribuer à l'avancement des connaissances sur le déplacement vertical d'endophytes par les racines vers la partie comestible du maïs ainsi que sur leur effet au niveau du photosystème II. De l'information sur l'impact des conditions d'inoculation sur la biomasse et sur la colonisation par les endophytes pourrait également faciliter l'évaluation de ces biofertilisants par les organisations réglementaires et l'industrie.

Le maïs est une production très répandue dans l'ensemble du Canada. Il est en demande pour l'alimentation humaine et animale, mais également pour l'industrie du bioéthanol. Nécessaire aux attentes de rendement agricole, l'épandage des fertilisants chimiques a un impact environnemental négatif en plus d'un coût qui ne cesse d'augmenter. Ainsi, s'ils permettaient un rendement équivalent à la fertilisation

chimique, on peut estimer que l'utilisation des biofertilisants pourrait être une alternative prometteuse. Un nombre croissant de GMM du sol sont sujets à l'étude et mise en marché. La colonisation transitoire de diverses parties des plantes par certains endophytes a donc été étudiée, mais la présence des endophytes modèles *Gluconacetobacter* et *Azospirillum* dans la partie comestible du maïs n'avait pas été évaluée. Les résultats de détection obtenus, aussi préliminaires qu'ils soient, suggèrent que la colonisation des racines de maïs à titre d'endophyte par *A. lipoferum* et *G. azotocaptans* natif ou transformé est possible. La persistance de *Gluconacetobacter* natif ou transformé dans les racines semble toutefois limitée à quelques jours suivants l'inoculation, tandis qu'*A. lipoferum* peut persister jusqu'à maturité. L'inoculation de *G. azotocaptans* natif influence le développement du système racinaire, mais ne provoque pas de stress majeur au niveau des paramètres du photosystème II étudiés. Enfin, aucun déplacement de ces endophytes de leur site d'inoculation vers l'épi n'a été détecté.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amarger, N. (2002). *Genetically modified bacteria in agriculture*. Biochimie. 84 (11): 1061-72.
- Andrews, J.H., et Harris, R.F. (2000). *The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces*. Annual Review of Phytopathology. 38: 145-180.
- Anuar, A.R., Shamsuddin, Z.H., et Yaacob, O. (1995). *Contribution of legume-N by nodulated groundnut for growth of maize on an acid soil*. Soil Biology and Biochemistry. 27: 595-601.
- Armstrong, D., Azevedo, M., Mills, D., Bailey, B., Russell, B., Groenig, A., Halgren, A., Banowitz, G., et McPhail, K. (2009). *Germination-Arrest Factor (GAF): 3. Determination that the herbicidal activity of GAF is associated with a ninhydrin-reactive compound and counteracted by selected amino acids*. Biological Control. 51: 181-190.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, M. Jr., Pereira, J.O., et Araujo, W.L. (2000). *Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants*. Electronic Journal of Biotechnology. 3(1): n.p.
- Balandreau, J., Viillard, V., Cournoyer, B., Coenye, T., Laevens, S., et Vandamme, P. (2001). *Burkholderia cepacia genomovar III is a common plant-associated bacterium*. Applied and environmental microbiology. 67: 982-985.
- Baldani, VLD., et Dobereiner, J. (1980). *Host-plant specificity in the infection of cereals with Azospirillum spp.* Soil Biology and Biochemistry. 12: 433-439.
- Baldani, VLD., Alvaraez, MAB., Baldani, JI., et Döbereiner, J. (1986a). *Establishment of inoculated Azospirillum spp. In the rhizosphere and in roots of field-grown wheat and sorghum*. Plant and Soil. 90: 35-46.
- Baldani, JI., Baldani, VLD., Seldin, L., et Döbereiner, J. (1986b). *Characterization of Herbaspirillum-seropedicae gen-nov, sp-nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 36: 86-93.
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., et Schliefer, K. H. (1992). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin.
- Balsanelli, E., Serrato, RV., De Baura, VA., Sasaki, G., Yates, MG., Rigo, LU., Pedrosa, FO., De Souza, EM., et Monteiro, RA. (2010). *Herbaspirillum*



*seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization.* Environmental Microbiology. 2233-2244.

- Baoen, X., Ke, X., Hong, X.Z., et San, F.C. (2005). *Isolation of transposon mutants from Azospirillum brasiliense Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis.* FEMS Microbiology letters. 248: 57-63.
- Barea, J.M., Gryndler, M., Lemanceau, Ph., Schuepp, H., et Azcon, R. (2002a). The rhizosphere of mycorrhizal plants. In S. Gianinazzi, H. Schuepp, J.M. Barea, K. Haselwandter (dir.), *Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts.* (p. 1-18). Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Barea, J.M., Azcon, R., et Azcon-Aguilar, C. (2002b). *Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality.* van Leeuwenhoek international journal of general and molecular microbiology. 81: 343-51.
- Barea, J.M., Pozo, M. J., Azcon, R., et Azcon-Aguilar, C. (2005). *Microbial cooperation in the rhizosphere.* Journal of Experimental Botany. 56 (417): 1761-1778.
- Baset Mia, M.A., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z., et Marziah, M. (2010a). *Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured Musa plantlets under nitrogen-free hydroponics condition.* Australian journal of crop science. 4(2): 85-90.
- Baset Mia, M.A., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z., et Marziah, M. (2010b). *Rhizobacteria as bioenhancer and biofertilizer for growth and yield of banana (Musa spp. cv. 'Berangan').* Scientia Horticulturae. 126(2): 80-87.
- Bashan, Y., Puente, M.E., Rodriguez-Mendoza, M.N. Toledo, G., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R., et Pedrin, S. (1995). *Survival of Azospirillum brasilense in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types.* Applied and Environmental Microbiology. 61: 1938-1945.
- Bashan, Y., et Holguin, G. (1998). *Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications : biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB.* Soil Biology and Biochemistry. 30: 1225-1228.
- Bashan, Y. (1999). *Interactions of Azospirillum spp. in soils: a review.* Biology and Fertility of Soils. 29: 246-256.
- Bashan, Y., Rojas, A., et Puente, M.E. (1999). *Improved establishment and development of three cacti species inoculated with Azospirillum brasilense transplanted into disturbed urban desert soil.* Canadian Journal of Microbiology. 45: 441-451.

- Bashan, Y., et de-Bashan, L.E. (2005). Plant growth-promoting. In D. Hillel (dir.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (vol 1, p.103–115). Elsevier, Oxford, U.K.
- Bashan, Y., Puente, M.E., de Bashan, L.E., et Hernandez, J.P. (2008). Environmental use of plant growth-promoting bacteria. In A.E. Barka et C. Clément. *Plant-Microbe interactions* (p. 69-93).
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., et Squartini, A. (2004). *Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus Hedysarum*. Systematic and Applied Microbiology. 27: 462-468.
- Bjorklof, K. (2002). *Genetically modified Pseudomonas associated with plants: aspects for environmental risk assessment*. Thèse de doctorat, University of Helsinki.
- Boddey, R.M., Urquiaga, S., Reis, V.M., et Dobereiner, J. (1991). *Biological nitrogen fixation associated with sugar cane*. Plant and Soil. 137: 111-117.
- Bohme, L., et Bohme, F. (2006). *Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long-term fertilisation*. European Journal of Soil Biology. 42: 1-12.
- Boisvert, S., Joly, D., et Carpentier, R. (2006). *Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step*, FEBS Journal. 273: 4770-4777.
- Bondarava, N., Beyer, P., et Krieger-Liszkay, A. (2005). *Function of the 23 kDa extrinsic protein of photosystem II as a manganese binding protein and its role in photoactivation*. Biochimica et Biophysica Acta. 1708: 63-70.
- Bryant, D.A. (1994). *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Bowen G.D., et Rovira, A.D. (1999). *The rhizosphere and its management to improve plant growth*. Advances in Agronomy. 66: 1-102.
- Butler, W.L. (1978). *Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis*. Annual Review of Plant Biology. 29: 345-378.
- Cakmak, I., et Engels, C. (1999). Role of mineral nutrients in photosynthesis and yield formation. In Z. Rengel (dir.), *Mineral Nutrition of Crops. Fundamental Mechanisms and Implications*. (p. 141-168). The Haworth Press. New York.
- Calvin, M. (1989). *40 years of photosynthesis and related activities*. Photosynthesis Research. 21: 3-16.

- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., et Smith V.H. (1998). *Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen*. *Ecological Applications*. 8: 559-568.
- Chaboud, A. (1983). *Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime*. *Plant Soil*. 73: 395-402.
- Chelius, M.K., et Triplett, E.W. (2001). *The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of Zea mays L.* *Microbial Ecology*. 41: 252-263.
- Chi, F., Shen, S.H., Cheng, H.P., Jing, Y.X., Yanni, Y.G., et Dazzo, FB. (2005). *Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 7271-7278.
- Coe, E.H. Jr., Nueffer, M.G., et Hoisington, D.A. (1988). The genetics of maize. In G.F. Sprague et J.W. Dudley (dir.) *Corn and corn improvement. Agronomy Monographs* (p. 81-236), American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.
- Cohen, A.C., Travaglia, C.N., Bottini, R., et Piccoli, P.N. (2009). *Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic Azospirillum in the alleviation of drought effects in maize*. *Botany*. 87(5): 455-462.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C. et Ait Barka, E. (2005). *Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by plant growth-promoting bacterium Burkholderia sp. Strain PsJN*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 1685-1693.
- Compant, S., Clément, C., et Sessitsch, A. (2010). *Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants : their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization*. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 669-678.
- Coombs, J.T., et Franco, CM. (2003). *Visualization of an endophytic Streptomyces species in wheat seed*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4260-4262.
- Corich, V., Giacomini, A., Vendramin, E., Vian, P., Carlot, M., Squartini, A., et Nuti, M.P. (2000). The field release and monitoring of rhizobial strains marked with lacZ and mercury resistance genes. In J. K. Jansson, J. D. van Elsas et M. J. Bailey (dir.) *Tracking Genetically-Engineered Microorganisms*. (p. 139-144), Landes Bioscience. Austin, Texas, USA.
- CRAAQ. (2008). *La production d'éthanol à partir de grains de maïs et de céréales*. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec. Publication no EVC 029.

- Da, H.N., et Deng, SP. (2003). *Survival and persistence of genetically modified Sinorhizobium meliloti in soil*. Applied Soil Ecology. 22: 1-14.
- Dandie, C.E., Thomas, S.M., et McClure, N.C. (2001). *Comparison of a range of green fluorescent protein-tagging vectors for monitoring a microbial inoculant in soil*. Letters in Applied Microbiology. 32: 26-30.
- De Leij, F.A.A.M., Sutton, E.J., Whipps, J.M., et Lynch, J.M. (1994). *Spread and survival of a genetically modified Pseudomonas aureofaciens in the phytosphere of wheat and in soil*. Applied soil ecology. 1: 207-218.
- De Leij, F.A.A.M., Sutton, E.J., Whipps, J.M., Fenlon, J.S., et Lynch, JM. (1995). *Field release of a genetically modified Pseudomonas fluorescens on wheat : establishment, survival and dissemination*. Biotechnology. 13: 1488-1492.
- Dhingra, A., Portis, A.R. Jr., et Daniell, H. (2004). *Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 101: 6315-6320.
- Dighton, J., Jones, H. E., Robinson, C. H., et Beckett, J. (1997). *The role of abiotic factors, cultivation practices and soil fauna in the dispersal of genetically modified microorganisms in soils*. Applied Soil Ecology. 5: 109-131.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A. (2001). *Response of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum*. Australian Journal of Plant Physiology. 28: 1-9.
- Dobereiner, J. (1997). *Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions*. Soil Biology and Biochemistry. 29: 771-774.
- Doube, B.M., Ryder, M.H., Davoren, C.W., et Stephens, P.M. (1994). *Enhanced root nodulation of subterranean clover (Tri- folium subterranean) by Rhizobium leguminosarium biovar trifolii in the presence of the earthworm Aporrec-todea trapezoides (Lumbricidae)*. Biology and Fertility of Soils. 18: 169-174.
- Driscoll, C., Whitall, D., Aber, J., Boyer, E., Castro, M., Cronan, C., Goodale, C., Groffman, P., Hopkinson, C., Lambert, K., Lawrence, G. et Ollinger, S. (2003). *Nitrogen pollution: sources and consequences*. U.S. northeast. Environnement. 45: 9-22.
- Dudeja, S.S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., et Kothe, E. (2012). *Interaction of endophytic microbes with legumes*. Journal of Basic Microbiology. 52: 248-260.

- El Mohandes, M.A.O. (1999). *The use of associative diazotrophs with different rates of nitrogen fertilization and compost to enhance growth and N<sub>2</sub>-fixation of wheat*. Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo. 50: 729-753.
- El Zemrany, H., Czarnes, S., Hallett, P.D., Alamercury, S., Bally, R., et Monrozier, J. (2007). *Early changes in root characteristics of maize (Zea mays) following seed inoculation with the PGPR Azospirillum lipoferum CRT1*. Plant Soil 291: 109-118.
- Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., et Caballero-Mellado, J. (2001). *Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution*. Applied and environmental microbiology. 67: 2790-2798.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., et Iwata, S. (2004). *Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center*. Science. 303: 1831-1838.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Caballero-Mellado, J., Seplveda, J. et Martinez-Romero, E. (1999). *Colonization of sugarcane by Acetobacter diazotrophicus is inhibited by high N-fertilization*. FEMS Microbiology Ecology. 29: 117-128.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernandez, A., Jimenez-Salgado, T., Wang, E.T., Martinez-Romero, E., et Caballero-Mellado, J. (2001). *Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, Gluconacetobacter johannae sp.nov. and Gluconacetobacter azotocaptans sp. Nov., associated with coffee plants*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 1305-1314.
- Galloway, J.N., Schlesinger, W.H., Levy, H.I., Michaels, A.F., et Schnoor, J.L. (1995). *Nitrogen fixation: anthropogenic enhancement–environmental response*. Global Biogeochemical Cycles. 9: 235-252.
- Ganguly, T.K., Jana, A.K., et Moitra, D.N. (1999). *An evaluation of agronomic potential of Azospirillum brasilense and Bacillus megaterium in fibre-legume-cereal system in an Aeric haplaquept*. Indian Journal of Agricultural Research 33: 35-39.
- Gauthier, A., Joly, D., Boisvert, S., et Carpentier, R. (2010). *Period-four Modulation of Photosystem II Primary Quinone Acceptor (Q<sub>A</sub>) Reduction/oxidation Kinetics in Thylakoid Membranes*. Photochemistry and Photobiology. 86: 1064-1070.
- Gholami, A., Biyari, A., Gholipoor, M., et Rahmani, H.A. (2012). *Growth promotion of maize (Zea mays L.) by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions*. Communications in soil science and plant analysis. 43: 1263-1272.

- Glick, B.R. (1995). *The enhancement of plant growth by free-living bacteria*. Canadian Journal of Microbiology. 41: 109-117.
- Grayston, S.J., et Campbell, C.D. (1996). *Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (Larix eurolepis) and Sitka spruce (Picea sitchensis)*. Tree Physiology. 16: 1031-1038.
- Gopalaswamy, G., Kannaiyan, S., O'Callaghan, K. J., Davey, M.R., et Cocking, E.C. (2000). *The xylem of rice (Oryza sativa) is colonized by Azorhizobium caulinodans*. Proceedings of the Royal society Biological Sciences. 267: 103-107.
- Gregor, W., Cinco, R.M., Yu, H., Yachandra, V.K., et Britt, D. (2005). *Influence of the 33 kDa manganese-stabilizing protein on the structure and substrate accessibility of the oxygen-evolving complex of photosystem II*. Biochemistry 44: 8817-8825.
- Gu, Y.H., et Mazzola, M. (2001). *Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of Pseudomonas putida strain 2C8*. Soil biology and biochemistry. 33: 1155-1162.
- Gurska, J., Wang, W., Gerhardt, K.E., Khalid A.M., Isherwood, D.M., Huang X.D., Glick, B.R., et Greenberg, B.M. (2009). *Three Year Field Test of a Plant Growth Promoting Rhizobacteria Enhanced Phytoremediation System at a Land Farm for Treatment of Hydrocarbon Waste*. Environmental Science and Technology. 43(12): 4472-4479.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper J.W. (1997). *Bacterial endophytes in agricultural crops*. Canadian Journal of Microbiology. 43: 895-914.
- Halvorson, A.D., Peterson, G.A., et Reulea, C.A. (2002). *Tillage System and Crop Rotation Effects on Dry land Crop Yields and Soil Carbon in the Central Great Plains*. Agronomy Journal. 94: 1429-1436.
- Han, H.S., et Lee, K.D. (2005). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria Effect on Antioxidant Status, Photosynthesis, Mineral Uptake and Growth of Lettuce under Soil Salinity*. Journal of Agriculture and Biology Sciences. 1(3): 210-215.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., et Elsas, J.D. (2008). *Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth*. Trends in Microbiology. 16: 463-471.
- Harley, P.C., Thomas, R.B., Reynolds, J.F., et Strain, B.R. (1992). *Modelling photosynthesis of cotton grown in elevated CO<sub>2</sub>*. Plant Cell and Environment. 15: 271-282.

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., et Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 60: 579-598.
- Hegazi, N.A., Faye, M., Amin, G., Hamza, M.A., Abbas, M., Youssef, H., et Monib, M. (1998). Diazotrophs associated with non-legumes grown in sandy soil. In K.A. Malik, M.S. Mirza, J.K. Ladha (dir.) *Nitrogen fixation with non-legumes*. (p. 209-222). Kulwer, Dordrecht.
- Heidari, M., et Golpayegani, A. (2012). *Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (Ocimum basilicum L.)*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 11(1): 57-61.
- Hirkala, D.L.M., Germida, J.J. (2004). *Field and soil microcosm studies on the survival and conjugation of a Pseudomonas putida strain bearing a recombinant plasmid, pADPTel*. *Canadian journal of microbiology*. 50: 595-604.
- Hirsch, P.R., et Spokes, J.D. (1994). *Survival and dispersion of genetically modified rhizobia in the field and genetic interactions with native strains*. *FEMS Microbiology Ecology*. 15: 147-159.
- Hirsch, P.R. (2004). *Release of transgenic bacterial inoculants- rhizobia as a case study*. *Plant and soil*. 266: 1-10.
- Hoffmann, A., Thimm, T., et Tebbe, C.C. (1999). *Fate of plasmid-bearing, luciferase marker gene tagged bacteria after feeding to the soil microarthropod Onychiurus fimatus (Collembola)*. *FEMS Microbiology Ecology*. 30: 125-135.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., et Gelfand D.H. (1991). *Detection of specific polymerase chain reaction product by using the 5' to 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88: 7276-7280.
- Hoque, M.S., Broadhurst, L.M., et Thrall, P.H. (2011). *Genetic characterisation of root nodule bacteria associated with Acacia salicina. stenophylla (Mimosaceae) across south eastern Australia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 61(2): 299-309.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E. M., et Pedrosa, F.O. (2010). *Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil*. *Plant Soil*. 331: 413-425.
- Ibanez, F., Angelini, J, Taurian T., Tonelli, ML, et Fabra, A. (2009). *Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology*. 32(1): 49-55.

- Ikeda, S., Okubo, T., Anda M., Nakashita, H., Yasuda, M., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Eda, S., Momiyama, A., Terasawa, K., Mitsui, H., et Minamisawa, K. (2010). *Community- and Genome-Based Views of Plant-Associated Bacteria: Plant–Bacterial Interactions in Soybean and Rice*. *Plant Cell Physiology*. 51(9): 1398-1410.
- Intorne, A.C., de Oliveira, M.V., Lima, M. L., da Silva, J.F., Olivares, F.L., et de Souza Filho, G.A. (2009). *Identification and characterization of Gluconacetobacter diazotrophicus mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc*. *Archives of Microbiology*. 191: 477-483.
- Isawa, T., Yasuda, M., Awasak , H., Minamisawa, K., Shinozaki, S., et Nakashita, H. (2010). *Azospirillum sp. strain B510 enhances rice growth and yield*. *Microbes and Environments*. 25: 58-61.
- Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P., et Bally, R. (1999). *Initiation of root growth stimulation by Azospirillum lipoferum CRT1 during maize seed germination*. *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 339-342.
- James, E.K., Olivares, F.L., Baldani, J.I., et Döbereiner, J. (1997). *Herbaspirillum, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of Sorghum bicolor L. Moench*. *Journal of experimental botany*. 48: 785-798.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Barraquio, W.L., Mathan, N., et Ladha, J.K. (2000). *Endophytic diazotrophs associated with rice*. In J.K. Ladha et P.M. Reddy (dir.) *The quest for nitrogen fixation in rice*. (p. 119-140), International Rice Research Institute, Los Banos.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Lanetta, P.P., Olivares, F.L., et Ladha, J.K. (2002). *Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium Herbaspirillum seropedicae Z67*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15(9): 894-906.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., et Barea, J.M. (2003). *The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility*. *Biology and Fertility of Soil*. 37: 1-16.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M.A., Martinez-Romero, E., et Caballero-Mellado, J. (1997). *Coffea arabica L., a new host plant for Acetobacter diazotrophicus, and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3676-3683.
- Joergensen, R.G. et Emmerling, C. (2006). *Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils*. *Journal of plant nutrition and soil science*. 169: 295-309.



- Joly, D., et Carpentier, R. (2009). *Sigmoidal reduction kinetics of the photosystem II acceptor side in intact photosynthetic materials during fluorescence induction*. Photochemical Photobiological sciences 8: 167-173.
- Kamiya, N., et Shen, J.R. (2003). *Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from Thermosynechococcus vulcanus at 3.7-Å resolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 100: 98-103.
- Karl, D., Bergman, B., Capone, D., Carpenter, E., Letelier, R., Lipschultz, F., Paerl, H., Sigman, D., et Stal, L. (2002). *Dinitrogen fixation in the world oceans*. Biogeochemistry. 57(58): 47-98.
- Kaschuk, G., Hungria, M., Leffelaar, P.A., Giller, K.E., et Kuyper, T.W. (2009a). *Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (Glycine max L. Merrill) dependent on N<sub>2</sub> fixation or nitrate supply*. Plant Biology. 12(1): 60-69.
- Kaschuk, G., Kuyper, T W., Leffelaar, P.A., Hungria, M., et Giller, K.E. (2009b). *Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?* Soil Biology and Biochemistry. 41: 1283-1244.
- Kaschuk, G., Leffelaar, P. A., Giller, K.E., Alberton, O., Hungria, M., et Kuyper, T. W. (2010). *Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses*. Soil Biology and Biochemistry. 42: 125-127.
- Kautsky, H., et Hirsch, A. (1931). *Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation*. Naturwissenschaften. 19: 964-964.
- Kennedy, I.R., Tchan, Y. (1992). *Biological nitrogen fixation in noleguminous field crops: recent advances*. Plant Soil. 141: 93-118.
- Kennedy, A.C. (1998). The rhizosphere and spermosphere. In D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, et D.A. Zuberer (dir.). *Principles and applications of soil microbiology*. (p. 389–407). Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.I.M.A, KecSkcs, M.L. (2004). *Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?* Soil Biology and Biochemistry. 36(8): 1229-1244.
- Kishore, G.K., Pande, S., et Podile, A.R. (2005). *Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (Arachis hypogaea L.)*. Letters in Applied Microbiology. 40(4): 260-268.

- Kloepper, J.W. (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In Y. Okon (dir.). *Azospirillum/plant associations*. (p. 111–118). Boca Raton, FL, USA.
- Kloepper, J.W., Zablotowick, R.M., Tipping, E.M., et Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In D.L. Keister, et P.B. Cregan (dir.), *The rhizosphere and plant growth*. (p. 315-326). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Kobayashi, D.Y., et Palumbo, J.D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In C.W. Bacon et J.F. White (dir.), *Microbial endophytes*. (p. 199-233). Marcel Dekker, New York.
- Krause, G.H., et Weis, E. (1991). *Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 42: 313-349.
- Kuklinsky-Sobral, J. Araujo, W. L., Mendes, R., Geraldi, IO. Pizzirani-Kleiner, AA., et Azevedo JL. (2004). *Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion*. Environmental Microbiology. 6 (12): 1244-1251.
- Kutuzova, R.S., Vorobev, N.I., et Kruglov, Y.V. (2006). *Structure of the microbial complex in wheat rhizosphere under herbicide stress*. Eurasian soil science. 39: 195-202.
- Ladha, J.K., Baraquio, W.L., et Watanabe, I. (1982). *Immunological techniques to identify Azospirillum associated with rice*. Canadian Journal of Microbiology. 28: 478-485.
- La Financière Agricole Québec. (2011). *Maïs-grain, coût de production, janvier à décembre 2009*. (p. 1). Direction de la recherche et du développement.
- Lambers, H., Chapin III, F.S., et Pons, T.L. (1998). *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York.
- Lazar, D., et Pospisil, P. (1999). *Mathematical simulation of chlorophyll a fluorescence rise measured with 3-(3', 4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea barley leaves at room and high temperatures*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters. 28: 468-477.
- Lazar, D. (2003). *Chlorophyll a Fluorescence Rise Induced by High Light Illumination of Dark-adapted Plant Tissue Studied by Means of a Model of Photosystem II and Considering Photosystem II Heterogeneity*. Journal of Theoretical Biology. 220: 469-503.

- Lee, K.D., Bai, Y., Smith, D., Han, H.S., et Supanjani. (2005). *Isolation of plant-growth-promoting endophytic bacteria from bean nodules*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1(3): 232-236.
- Lilley, A.K., Hails, R.S., Cory, J.S., et Bailey, M.J. (1997). *The dispersal and establishment of pseudomonad populations in the phyllosphere of sugar beet by phytophagous caterpillars*. FEMS Microbiology Ecology. 24: 151-157.
- Lin, S.Y, Shen, F.T, et Young, C.C. (2011). *Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus Azospirillum by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers*. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 99(4): 837-844.
- Linderman, R.G. (1992). Vesicular–arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In G.J. Bethlenfalvay, et R.G. Linderman (dir.), *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. (p. 45-70). Madison, Wisconsin.
- Lindow, S. E. et Brandl, M.T. (2003). *Microbiology of the phyllosphere*. Applied and Environmental Microbiology. 69(4): 1875-1883.
- Liu X.M., Zhao, H.X., et Chen, S.F. (2006). *Colonization of maize and rice plants by strain Bacillus megaterium C4*. Current Microbiology. 52(3): 186-190.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., et Biesiadka, J. (2005). *Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II*. Nature. 438: 1040-1044.
- Lucy, M., Reed, E., et Glick, B.R. (2004). *Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria*. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 86: 1-25.
- Lynch, J.M. (1990). *The rhizosphere*. John Wiley. New York.
- Mahdi, S.S., Hassan, G.I., Samoon, S.A., Rather, H.A., Dar, Showkat, A. et Zehra, B. (2010). *Bio-fertilizer in organic agriculture*. Journal of Phytology, 2(10): 42-54.
- Malik, K.A., Mirza, M.S., Hassan, U., Mehnaz, S., Rasul, G., Haurat, J., Bauy, R., et Normanel, P. (2002). The role of plant associated beneficial bacteria in rice-wheat Cropping System. In I.R. Kennedy, et A.T.M.A. Chaudhry (dir.), *Biofertilisers in action*. (p. 73-83). Rural industries research and development Corporation. Canberra.
- Malty, J.D., Siquiera, J.O., et Moreira, F.M.D. (2006). *Effects of glyphosate on soybean symbiotic microorganisms, in culture media and in greenhouse*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 41: 285-291.

- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., et Crowley, D.E. (2001). *Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere*. Soil biology and biochemistry. 33: 1437-1445.
- Marschner, P. et Timonen, S. (2005). *Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere*. Applied soil ecology. 28: 23-36.
- Matthysse, A.G., Stretton, S., Dandie, C., McClure, N.C. et Goodman, A.E. (1996). *Construction of GFP vectors for use in Gram-negative bacteria other than Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters. 145: 87-94.
- Mehnaz, S. et G. Lazarovits. (2006). *Inoculation effects of Pseudomonas putida, Gluconacetobacter azotocaptans, and Azospirillum lipoferum on corn plant growth under greenhouse conditions*. Microbial Ecology. 51(3): 326-35.
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B., et Lazarovits, G. (2010). *Growth promoting effects of corn (Zea mays) bacterial isolates under greenhouse and field conditions*. Soil biology and biochemistry. 42: 1848-1856.
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., et Tebbe, CC. (2000). *Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with Sinorhizobium meliloti L33*. Microbial Ecology. 41: 43-56.
- Miransari, M. Soil microbes and plant fertilization. (2011). Appl Microbiol Biotechnol. 92: 875-885.
- Miransari, M et Mackenzie, A.F. (2011). *Development of a soil N-test for fertilizer requirements for corn (Zea mays L.) production in Québec*. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 42: 50-65.
- Mirza, M.S., Rasul, G., Mehnaz, S., Ladha, J.K., So, R.B., Ali, S., et Malik, K.A. (2000). Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. In J.K. Ladha, et P.M. Reddy (dir.), *The quest for nitrogenfixation in rice*. (p. 191-204) International Rice Research Institute, Los Banos.
- Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., Garcia, J.M., Wyke, L., et Ramos, J.L. (2000). *Survival of Pseudomonas putida KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions*. Soil Biology and Biochemistry. 32: 315-321.
- Montanez, A., Blanco, A.R., Barlocco, C., Beracochea, M., et Sicardi, M. (2012). *Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with cultivars (Zea mays L.) and their inoculation effects in vitro*. Applied Soil ecology. 58: 21-28.

- Morrisey, J.P., Walsh, U.F., O'Donnell, A., Moenne-Loccoz, Y., et O'Gara, F. (2002). *Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications*. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 81: 599-606.
- Mullis, K. (1987). *Process for amplifying nucleic acid sequences*. U.S. Patent No. 4683202.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., et Lakshminarasimhan, C. (1999). *Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India*. Tropical Agriculture. 76: 171-178.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., et Lakshminarasimhan, C. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus, a promising diazotrophic endophyte in tropics*. Current Science. 83: 137-45
- Nunes, C.P., Passaglia, L.M.P., Schrank, A., Schrank, I.S. (2000). *Directed mutagenesis affects recombination in Azospirillum brasilense nif genes*. Genetics and Molecular Biology. 23(4): 901-905.
- Nuti, M.P. (1994). European community regulation for the use and release of genetically modified organisms (GMOs) in the environment. In F. O'Gara, D.N. Dowling, B. Boesten (dir.), *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms biotechnology and the release of GMOs*. (p. 165-173) Weinheim, Germany.
- Okon, Y. (1994). *Azospirillum /plant associations*. p. 87-110. Boca Raton, FL, USA.
- Okon, Y., et Itzigsohn, R. (1995). *The development of Azospirillum as a commercial inoculant for improving crop yields*. Biotechnology Advances. 13(3): 415-424.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., et Lopez, M.M. (2009). *Pcr detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated reviews of protocols (1989-2007)*. Journal of Plant Pathology, 91(2): 249-297.
- Palus, J.A., Borneman, J, Ludden, P.W., et Triplett, E.W. (1996). *A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of Zea mays L. and Zea luxurians Iltis and Doebley*. Plant soil. 186: 135-142.
- Pampulha, M., et Oliveira, A. (2006). *Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil*. Current microbiology. 53: 238-243.
- Pandey, A., et Kumar, S. (1989). *Potential of Azotobacters andAzospirilla as biofertilizers for upland agriculture: a review*. Journal of Scientific and Industrial Research. 48: 134-144.

- Pandey, P., Kang, S.C., et Maheshwari, DK. (2005). *Isolation of endophytic plant growth promoting Burkholderia sp. MSSP from root nodules of Mimosa pudica*. Current Science. 89: 177-180.
- Pedraza, R.O. (2008). *Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria*. Journal of food microbiology. 125: 25-35.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., et Baldani, J.I. (2006). *Estrada-de los Santos, P., Reis, VM., Caballero-Mellado, J. Burkholderia silvatlantica sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize*. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 56: 1931-1937.
- Persello-Cartieaux, F., David, P., Sarrobert, C. Thibaud, M-C., Achouak, W., Robaglia, C., et Nussaume, L. (2001). *Utilization of mutants to analyze the interaction between Arabidopsis thaliana and its naturally root-associated Pseudomonas*. Planta. 212: 190-198.
- Petrini, L.E., Petrini, O., et Laflamme, G. (1989). *Recovery of endophytes of Abies balsamea from needles and galls of Paradiplosis tumifex*. Phytoprotection. 70: 97-103.
- Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (2001). The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. In R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri (dir.), *The rhizosphere*. (p.1-18). Mercel Dekker. New York.
- Pitkajarvi, J., Rasanen, L.A., Langenskiold, J., Wallenius, K., Niemi, M., Lindstrom, K. (2003). *Persistence, population dynamics and competitiveness for nodulation of marked gene-tagged Rhizobium galegae in field lysimeters in the boreal climatic zone*. FEMS Microbiology Ecology. 46: 91-104.
- Platt, M.D., Schurr, M. J., Sauer, K., Vazquez, G., Kukavica-Lbrulj, I., Potvin, E., Levesque, R.C., Fedynak, A., Brinkman, F.S., Schurr, J., Hwang, S.H., Lau, G.W., Limbach, P.A., Rowe, J.J., Lieberman, M.A., Barraud, N., Webb, J., Kjelleberg, S., Hunt, D.F., Hassett, D.J. (2008). *Proteomic, Microarray, and Signature-Tagged Mutagenesis Analyses of Anaerobic Pseudomonas aeruginosa at pH 6.5, Likely Representing Chronic, Late-Stage Cystic Fibrosis Airway Conditions*. Journal of microbiology. 190(8): 2739-2758.
- Rahe, T.M., Hagedorn, C., McCoy, E.L. et Kling G.F. (1978). *Transport of Antibiotic-resistant Escherichia coli Through Western Oregon Hillslope Soils Under Conditions of Saturated Flow*. Journal of Environmental Quality. 7: 487-494.
- Rajagopal, S., Egorova, E.A., Bukhov, N.G., et Carpentier, R. (2003). *Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of*

Photosystem I by exogenous quinones. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1606: 147-152.

Ratcliff, A.W., Busse, M.D., et Shestak, C.J. (2006). *Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils*. *Applied soil ecology*. 34: 114-124.

Rees, D., et Horton, P. (1990). *The mechanisms of changes in Photosystem II efficiency in spinach thylakoids*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1016: 219-227.

Reinhold-Hurek, B., et Hurek, T. (1998). *Life in grasses: Diazotrophic endophytes*. *Trends in microbiology*. 6: 139-144.

Reinhold-Hurek, B. et Hurek, T. (2011). *Living inside plants: bacterial endophytes*. *Current opinion in plant biology*. 14: 435-443.

Reis. V.M., Baldani, JI., Baldani, V.L.D., et Döberener, J. (2000). *Biological dinitrogen fixation in the gramineae and palm trees*. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19: 227-247

Ricoud, A. (1997). *Photopies solaires*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, Suisse.

Ripp, S., Nivens, D.E., Werner, C., et Sayler, G.S. (2001). *Vertical transport of a field-released genetically engineered microorganism through soil*. *Soil biology and biochemistry*. 33: 1873-1877.

Rodriguez, H., Mendoza, A. Cruz M.A. , Holquin, G., Glick, B.R., et Bashan, Y. (2006). *Pleiotropic physiological effects in the plant growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense following chromosomal labeling in the clpX gene*. *FEMS Microbiology Ecology*. 57(2): 217-25.

Roelofs, T.A., Liang, W., Latimer, M.J., Cinco, R.M., Rompel, A., Andrews, J.C., Sauer, K., Yachandra, V. K., et Klein, M. P. (1996). *Oxidation states of the manganese cluster during the flash-induced S-state cycle of the photosynthetic oxygen-evolving complex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 3335-3340.

Roesch L.F.W., Camargo, F.A.O., Bento, F.M., et Triplett. E.W. (2008). *Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize*. *Plant soil*. 302: 91-104.

Romero, A.M., Correa, O.S. Moccia, S. et Rivas. J.G. (2003). *Effect of Azospirillum-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato*. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 832-838.

- Rouws, L.F.M., Simoes-Araujo, J.L., Hemerly, A.S., et Baldani, J.I. (2008). *Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for Gluconacetobacter diazotrophicus through characterization of a flagellar mutant*. Archives of Microbiology 189: 397-405.
- Rouws, L.F., Meneses, C.H., Guedes, H.V., Vidal, M.S., Baldani, J.I., et Schwab, S. (2010). *Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium Gluconacetobacter diazotrophicus marked with gfp and gusA reporter genes*. Letters in Applied Microbiology. 51: 325-330.
- Russo, A., Felici, C., Toffanin, A., Gotz, M., Collados, C., Barea, J.M., Moënne-Loccoz, Y., Smalla, K., Vanderleyden, J., et Nuti, M. (2005). *Effect of Azospirillum inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants*. Biology and fertility of soils. 41: 301-309.
- Sahin, F., Cakmakci, R., et Kantar, F. (2004). *Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria*. Plant and Soil. 265: 123-129.
- Samson, G., Prasil, O., et Yaakoubd, B. (1999). *Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence*. Photosynthetica. 37: 163-182.
- Sayler, G.S., et Ripp, S. (2000). *Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes*. Current opinion in biotechnology. 11: 286-289.
- Schilling, G., Gransee, A., Deubel, A., Lezovic, G., et Ruppel, S. (1998). *Phosphorus availability, root exudates and microbial activity in the rhizosphere*. Z Pflanzenernähr Bodenk. 161: 465-478.
- Schindler, F.V. et Knightin, R.E. (1999). *Fate of fertilizer nitrogen applied to corn as estimated by the isotopic and difference methods*. Soil Science Society of America Journal .63: 1734-1740.
- Schwieger, F., mmann-Kalinowski, T., Dresing, U., Selbitschka, W., Munch, J.C., Puhler, A., Keller, M., et Tebbe, C.C. (2000). *Field lysimeter investigation with luciferase-gene (luc)-tagged Sinorhizobium meliloti strains to evaluate the ecological significance of soil inoculation and a recA-mutation*. Soil biology and biochemistry. 32: 859-868.
- Selbitschka, W., Keller, M., Miethling-Graff, R., Dresing, U., Schwieger, F. Krahn, I., Homann, I., mmann-Kalinowski, T., Puhler, A., et Tebbe, C.C. (2006). *Long-term field release of bioluminescent Sinorhizobium meliloti strains to assess the influence of a recA mutation on the strain's survival*. Microbial ecology. 52: 583-595.



- Sevilla, M., Burris, R.H., Gunapala, N., et Kennedy, C. (2001). *Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14: 358-366.
- Singh, S., et Datta., P. (2005). *Growth and survival potentials of immobilized diazotrophic cyanobacterial isolates exposed to common ricefield herbicides*. *World journal of microbiology and biotechnology*. 21: 441-446.
- Skoog, West, et Holler. (1997). *Chimie Analytique*. DeBoeck.
- Snow, A.A., Andow, D.A., Gepts, P., Hallerman, E.M., Power, A. Tiedje, J.M., et Wolfenbarger, L.L. (2005). *Genetically Engineered Organisms and the Environment: Current Status and Recommendations*. *Ecological applications*. 15: 377-404.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., et Remans, R. (2007). *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425-448.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., et Vanderleyden, J. (2008). *Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants*. *Plant Soil*. 312: 15-23.
- Spertini, D., Béliveau, C., et Bellemare, G. (1999). *Screening of transgenic plants by amplification of unknown genomic DNA flanking T-DNA*. *Biotechniques*. 27(2): 308-14.
- Stephan, M.P., Oliveira, M., Teixeira, K.R.S, Martinez-Drets, G., Dobereiner, J. (1991). *Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus**. *FEMS Microbiology Letters*. 77: 67-72.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Govingjee. (1995). *Polyphasic Chlorophyll a Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria*. *Photochemistry and Photobiology*. 61: 32-42.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., et Nowak, J. (1997). *Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth*. *Biology and Fertility of Soils*. 25: 13-19.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., et Nowak, J. (2000). *Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production*. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19: 1-30.
- Sumner, M.E. (1990). *Crop response to *Azospirillum* inoculation*. *Advances in Soil Sciences*. 12: 53-123.

- Taiz, L., et Zeiger, E. (1998). *Plant physiology*. Sinauer Associates. Sunderland.
- Teixeira, K.R.S., Wülling, M., Morgan, T., Galler, R., Zellermann, E.M., Baldani, J. I., Kennedy, C., et Meletzus, D. (1999). *Molecular analysis of the chromosomal region encoding the nif A and nif B genes of Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiology Letters. 176: 301-309.
- Tian, G., Pauls, P., Dong, Z., Reid, L.M., et Tian, L. (2009). *Colonization of the nitrogen-fixing bacterium Gluconacetobacter diazotrophicus in a large number of Canadian corn plants*. Canadian Journal of Plant Science. 89(6): 1009-1016.
- Timms-Wilson, T.M., et Smalla, K. (2006). Microbial diversity in the phyllosphere and rhizosphere of field grown crop plants: microbial specialisation at the plant surface. In M.J. Bailey, A.K. Lilley, T.M. Timms-Wilson, et P.T.N. Spencer-Phillips (dir.), *Microbial ecology of aerial plant surfaces*. (p. 401-408) CAB international.
- Trevors, J.T., Van Elsas, J.D., Van Overbeek, L.S., et Starodub, M.E. (1990). *Transport of a genetically engineered Pseudomonas fluorescens strain through a soil microcosm*. Applied and Environmental Microbiology. 56(2): 401-408.
- Troxler, J., Zala, M., Natsch, A., Nievergelt, J., Keel, C., et Defago, G. (1998). *Transport of a biocontrol Pseudomonas fluorescens through 2.5-M deep outdoor lysimeters and survival in the effluent water*. Soil Biology and Biochemistry. 30: 621-631.
- Vande Broek, A., van Gool, A., et Vanderleyden, J. (1989). *Electroporation of Azospirillum brasilense with plasmid DNA*. FEMS Microbiology Letters. 61: 177-182.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G., et Jahns, H.M. (1996). *Algae – An introduction to phycology*. Cambridge University Press, New York.
- Van der Lelie, D., Taghavi, S., Monchy S., Schwender, J., Miller, L., Ferrieri R., Rogers, A., Wu, X., Zhu, W., Weyens, N., Vangronsveld, J., et Newman, L. (2009). *Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony*. Critical Reviews in Plant Sciences. 28(5): n.p.
- Van Dillewijn, P., Soto, M.J., Villadas, P., et Toro, N. (2001). *Construction and Environmental Release of a Sinorhizobium meliloti Strain Genetically Modified To Be More Competitive for Alfalfa Nodulation*. Applied and Environmental Microbiology. 67: 3860-3865.
- Vanstockem, M., Michiels, K., Vanderleyden, J., et Van Gool, A.P. (1986). *Transposon Mutagenesis of Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum: Physical Analysis of Tn5 and Tn5-Mob Insertion Mutants*. Microbiology Applied and Environmental Microbiology. 53(2): 410-415.

- Van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., et van Elsas, J.D. (1997). *Fate and activity of microorganisms introduced into soil*. Microbiology and molecular biology reviews. 61: 121-135.
- Vasilev, S., Wiebe, S., et Bruce, D. (1998). *Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone in spinach thylakoids as a model for antenna based quenching mechanisms*. Biochimica et Biophysica Acta. 1363: 147-156.
- Venkataraman, G.S. et Shanmugasundaram, S. (1992). *Algal biofertilizers technology for rice*. Bio-fertilizer Technology. X: 270-272.
- Vernotte, C., Etienne, A.L., et Briantais, J.M. (1979). *Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool*. Biochimica et Biophysica Acta. 545: 519-527.
- Vessey, J.K. (2003). *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Plant and Soil. 255: 571-586.
- Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Ophel-Keller, K. et Balandreau, J. (1998). *Burkholderia graminis sp. nov., a rhizospheric Burkholderia species, and reassessment of [Pseudomonas] phenazinium, [Pseudomonas] pyrrocinia and [Pseudomonas] glathei as Burkholderia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 48: 549-563.
- Viebahn, M., Glandorf, D.C.M., Ouwens, T.W.M., Smit, E., Leeftang, P., Wernars, K., Thomashow, L.S., van Loon, L.C., et Bakker, P.A.H.M. (2003). *Repeated introduction of genetically modified Pseudomonas putida WCS358r without intensified effects on the indigenous microflora of field-grown wheat*. Applied and environmental microbiology. 69: 3110-3118.
- Vincelli, P. et Tisserat N. (2008). *Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology*. Plant Disease 92: 660-669.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., et Vangronsveld, J. (2009). *Phytoremediation: plant-endophyte partnership take the challenge*. Current Opinion in Biotechnology. 20: 248-254.
- Wilcox, L. (2005). *Fertilizer and fuel outlook for spring*. FAPRI-UMC Report 04-05.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., et Wong M.H. (2005). *Effects of biofertilizer containing N-fixers, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial*. Geoderma. 125(1-2): 155-66.

- Wulff, E, van Vuurde, J.W.L., et Hockenhull, J. (2003). *The ability of the biological control agent Bacillus subtilis, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation*. Plant and Soil. 255: 463-474.
- Xie, B. Xu, K., Zhao, H.X., et Chen, S.F. (2005). *Isolation of transposon mutants from Azospirillum brasilense Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis*. FEMS Microbiology Letters. 248: 57-63.
- Zahir, Z.A, Arshad, M., Frankenberger, W.T. (2004). *Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture*. Advances in Agronomy. 81: 97-168.
- Zamfirache, M.M. (2005). *Fiziologie vegetala*. Editura Azimuth, Iasi.
- Zhang, F., Dashti, N., Hynes R.K., et Smith, D.L. (1997). *Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean [Glycine max (L) Merr] growth and physiology at suboptimal root zone temperatures*. Annals of Botany. 79(3): 243-249.
- Zhu, X. G., Govindjee, Baker, N. R., deSturler, E., et Long, S. P. (2005). *Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II*. Planta. 223: 114-133.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A. Barletta, R.G. et Vidaver, A.K. (2002). *Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants*. Applied and environmental microbiology. 79(18): 2198-2208.