



HAL
open science

**Influence du système de sécrétion de type III bactérien
dans les interactions plante-Pseudomonas spp.
fluorescents non pathogènes**

Amandine Viollet

► **To cite this version:**

Amandine Viollet. Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-Pseudomonas spp. fluorescents non pathogènes. Biologie végétale. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS030 . tel-00596562

HAL Id: tel-00596562

<https://theses.hal.science/tel-00596562>

Submitted on 27 May 2011

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT-SANTE-STIC

INRA-Université de Bourgogne-Unité Mixte de Recherche 1229
Microbiologie des Sols et de l'Environnement
Bâtiment CMSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne
Spécialité : Ecologie Microbienne

**Influence du système de sécrétion de type III bactérien
dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. fluorescents
non pathogènes**

Présentée et soutenue publiquement le
10 novembre 2010

Par
Amandine VIOLLET

Commission d'examen composée de :

Jean-Claude CLEYET-MAREL : INRA-Université de Montpellier 2, Montpellier	Rapporteur
Pascale FREY-KLETT : INRA-Université de Nancy, Champenoux	Rapporteur
Yves DESSAUX : CNRS, Gif-sur-Yvette	Examineur
Xavier LATOUR : Université de Rouen, Evreux	Examineur
Daniel WIPF : INRA-CNRS-Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Sylvie MAZURIER : INRA-Université de Bourgogne, Dijon	Directrice de thèse



*Je dédie cette thèse
à ma très grande Famille qui a fait de moi ce que je suis,
à Mathieu qui a toujours cru en moi, pour son amour et son soutien,
et à tous mes Amis pour avoir rendu mon quotidien récréatif et passionnant.*

Invictus

*Aussi étroit soit le chemin,
Bien qu'on m'accuse et qu'on me blâme
Je suis le maître de mon destin,
Le capitaine de mon âme.*

William Ernest Henley

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier *Philippe Lemanceau*, directeur de l'UMR 'Microbiologie des Sols et de l'Environnement', pour m'avoir accueillie au sein de son unité. Vous avez rendu possible la réalisation de ce travail. Au-delà de votre rôle de directeur, le temps que vous m'avez consacré, vos critiques pertinentes et votre esprit de synthèse ont été des éléments déterminants dans la valorisation de cette thèse.

Je souhaite remercier *Sylvie Mazurier* pour l'encadrement de ce travail. Ton investissement sans faille, le partage de ton expérience et tes conseils m'ont fait progresser. Nos diverses discussions professionnelles, mais aussi personnelles, ont été enrichissantes à tout point de vue. Je te remercie sincèrement pour tout le soutien que tu m'as accordé au cours de cette thèse. Ta franchise et tes encouragements ont su me remettre sur le droit chemin dans les moments où le moral n'était pas au rendez-vous. Je veux également te remercier pour m'avoir autant aidée pendant la période de rédaction : tes corrections, ta rapidité de réflexion et ta volonté de me voir réussir ont été essentielles pour l'aboutissement de ce travail.

Merci à l'ensemble de l'équipe 1. Chacun d'entre vous a participé activement au bon déroulement de ce travail de thèse et sans vous, certaines études expérimentales n'auraient pu être réalisables. *Christophe*, je te remercie pour ta gentillesse, l'aide que tu m'as apportée au quotidien et surtout pour ton investissement dans le chapitre IV de ce manuscrit. J'emmène avec moi le célèbre sobriquet que vous m'avez délicatement attribué toi et tes collègues de bureau. *Gérard*, merci pour ton humour et ta bonne humeur si communicative. Je penserai souvent à toi et tes nombreux jeux de mots inimitables vont me manquer. Tu m'as sortie de bien des situations, toi le spécialiste des astuces et du bricolage. Je te souhaite une retraite bien méritée. *Laure*, je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi, notamment dans le chapitre V. Grâce à toi la microscopie électronique est désormais moins obscure dans mon esprit et je promets de te faire signe si un jour je dois à nouveau isoler des nodosités.

Je remercie tout particulièrement *Thérèse* pour m'avoir formée au travail de laboratoire et pour toute l'aide technique qu'elle m'a apportée. Une de plus dans ta longue liste d'étudiants que tu as accompagnés et j'espère ne pas t'avoir rendu la vie trop difficile. Tu as été ma confidente et jamais je n'oublierai tout ce que tu as fait. Tu es pour moi plus qu'une collègue de travail et j'espère que notre "collaboration" ne s'arrêtera pas aux portes de l'INRA. Je te dis à très bientôt ma Thérèse et te souhaite à toi aussi une retraite douce et heureuse.

J'adresse également mes remerciements aux membres de mon comité de pilotage, *Eliane Dumas-Gaudot*, *Stéphane Genin* et *Daniel Wipf*, pour l'intérêt qu'ils ont montré à la réalisation de ce travail et à la cohérence des recherches menées. Je vous remercie pour tous vos conseils.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé étroitement à l'avancée de mes recherches et à la réalisation des études expérimentales : *Barbara Pivato*, *Cécile Guby-Rangin* et *Jean-Claude Cleyet-Marel*, *Jeannine Lherminier*, *Christine Arnould* et *Aline Bonnotte*. Je souhaite également remercier *Jérôme*, stagiaire en licence qui par son travail a également contribué à cette thèse.

Un grand merci aux secrétaires, *Roselyne*, *Catherine*, *Fabienne*, *Stéphanie* et *Sylvie*, pour leur disponibilité et leurs sourires et leur aide indispensable pour régler tous les tracas administratifs. Je tiens à remercier *Barbara*, pour sa générosité et son aide à la laverie. Grâce

à vous je me suis remise au violon. Merci à *Christine* pour la gestion des stocks et des commandes de dernières minutes toujours plus urgentes les unes que les autres.

Je pense aussi à l'ensemble des membres du bâtiment CMSE qu'ils soient permanents ou stagiaires. Merci à vous tous, vous avez tous contribué à l'installation d'une ambiance agréable. Merci à toutes les personnes que j'ai croisées à l'INRA, dans les longs couloirs, les laboratoires, autour d'un café, sur le balcon, à la cantine... Merci à *Lionel, Pierre-Alain, Nadine G, Christian, Véronique, Bernard, Nadine R, Marie-Christine, Ams, Nicos, Aurore...* pour votre accueil, votre gentillesse et votre aide au quotidien. Merci à *Agnès, Pierre, Najoi, Abdel...* pour vos conseils d'ex-thésards. *Nicolas*, je n'oublierai pas notre promenade du marché de Noël de Strasbourg et les moules à la Plancha. *Anne*, merci pour tes énigmes quotidiennes. *Sébastien* et *Xavier*, merci d'avoir supporté mes bêtises à la cantine. Mes mamans de l'INRA, *Eliane* et *Ghislaine*, pour ne jamais m'avoir perdue de vue.

L'un des côtés agréables du domaine de la recherche est la possibilité de faire de nombreuses rencontres, plus ou moins éphémères, toutes différentes les unes des autres. Je remercie tous les étudiants des horizons lointains : j'ai partagé avec chacun d'entre vous des moments culturels et sportifs... Jamais je ne vous oublierai. Vous avez rendu ces années de thèses enrichissantes et grâce à vous je peux aujourd'hui me rendre partout dans le monde ;-) : *Maguida, Carlos, Stefanie, Mario, Zhi Peng, Kathaline, Guisepe, Iulia, Manu, Anicet, Cosette...* *Joël*, je tiens tout particulièrement à te remercier : tu as été mon rayon de soleil et j'espère vraiment avoir l'occasion de te revoir.

Je remercie le bureau 107. *Mélanoche*, merci pour ta joie de vivre, ça été un grand réconfort de ne pas me sentir seule face à la maniaquerie. *Nono*, merci pour les pauses "cigarettes de 16h" et pour avoir fait bloc face aux adversités de la thèse. *Samos*, merci pour la complicité que nous avons eu et notre amitié particulière.

Je remercie *Fafa*, pour avoir partagé NOTRE bureau ; finalement ton goût musical va me manquer. *Clem*, je te souhaite tout le courage possible pour la suite de ta thèse et je te lègue mon bureau avec grand plaisir. Ne te laisse pas marcher sur les pieds par *Fafa* ! Je serai là le jour où tu soutiendras et si tu as besoin d'aide n'hésite pas, je ferai mon possible.

Quel chemin parcouru depuis nos péripéties du foyer d'Epoisses ! Ma *Zuzu*, depuis que l'on se connaît on s'est imaginé le jour où on serait toutes les deux Docteur. C'est chose faite ! Aujourd'hui tu es parti loin mais je suis certaine que nos chemins vont se recroiser.

Je remercie toute la *famille Cassecuelle, Francki, Jean* et *Domi* pour avoir pleinement occupé mon quotidien. Vous avez été avec moi depuis le début et nous avons partagé tant de moments particuliers et dans toutes sortes de situations, des plus simples au plus compliquées... Sports divers et d'hiver, sorties culturelles en tout genre, musique, bonne bouffe... Joies, rires, pleurs, colères... Je vous remercie pour tout, vous m'avez permis de me détendre et penser à autre chose. *Nic-nic* et *Maritch...* Il n'y a pas assez de place pour exprimer ce que je ressens pour vous.

Je finirai par remercier mes *parents* et toute ma *famille*, pour m'avoir permis d'aller jusqu'au bout. Je remercie également la "*famille Schulz*" pour leur compréhension et leur soutien.

Enfin, je remercie *Mathieu*, pour avoir été là tout simplement au quotidien et avoir relevé tous les défis.

Résumé

L'objectif de cette thèse est de contribuer à faire progresser les connaissances sur les interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes en évaluant la contribution des systèmes de sécrétion de type III (SST3). Une synthèse des connaissances disponibles relatives aux SST3 chez les *Pseudomonas* non pathogènes, saprotrophes ou mutualistes, présentée **chapitre I**, montre que les SST3 ne sont pas cantonnés aux interactions parasites ou pathogènes avec les plantes. Dans l'étude expérimentale présentée **chapitre II**, nous avons utilisé différents génotypes de *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong capables (Myc+) ou non (Myc-) d'établir une symbiose mycorhizienne. Ce travail nous a permis de montrer que les *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3 (SST3+) sont préférentiellement associés aux racines mycorhizées des génotypes Myc+ de *M. truncatula* (J5 et TRV48) plutôt qu'aux racines du mutant Myc- (TRV25) et au sol nu. Ainsi, la plante seule n'est pas à l'origine de la présence accrue des *Pseudomonas* SST3+. La colonisation de la racine par les champignons mycorhizogènes à arbuscules (CMA), le développement du mycélium intraradiculaire et/ou la formation associée d'arbuscules, sont également déterminants. Dans l'étude présentée **chapitre III**, nous avons comparé les effets de la souche modèle promotrice de mycorhization (MHB) *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et de son mutant C7SM7 (SST3-), sur la mycorhization et la croissance de *M. truncatula* dans un sol non stérile. Ce travail a permis de montrer que le SST3 de C7R12 contribue à l'effet MHB de la bactérie. La promotion de la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA indigènes induite par le SST3 de C7R12 s'est traduite par une amélioration de la croissance de la plante. En revanche, l'inactivation du SST3 chez C7SM7 a eu un impact délétère sur la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA du sol étudié et sur la croissance de la plante. L'observation d'effets quantitatifs opposés entre C7R12 et C7SM7, nous a conduits à nous interroger sur l'existence d'un effet différentiel de l'inoculation de ces bactéries sur la structure et la diversité des communautés des microorganismes associés. Dans une étude présentée **chapitre IV**, le suivi dynamique en parallèle de la structure des communautés totales bactériennes (B-RISA) et fongiques (F-RISA) et de la colonisation de la racine par les CMA a été réalisée. Aucun effet de l'inoculation n'a été observé sur la structure des communautés fongiques de la rhizosphère ou des racines. En revanche, la structure des communautés bactériennes a varié selon que les plantes aient été inoculées ou non et selon la souche inoculée. Néanmoins, ces différences ont été observées plusieurs semaines après les

effets de l'inoculation de C7R12 ou de C7SM7 sur la colonisation de la racine par les CMA. Ce décalage dans le temps, suggère que les différences observées dans la structure des communautés bactériennes pourraient être une conséquence plutôt qu'une cause des variations observées sur la mycorhization de *M. truncatula*. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence d'effets de l'inoculation sur la diversité des populations des bactéries fixatrices d'azote présentes dans les nodosités de *M. truncatula*. L'analyse des séquences de la grande sous-unité de l'ADN ribosomique (LSU rDNA) amplifiées à partir d'ADN extrait des racines, a montré pour les plantes inoculées et non inoculées, que les populations de CMA étaient majoritairement apparentées à *Glomus intraradices*. Un groupe d'isolats spécifiquement associé aux racines inoculées avec C7R12 et apparenté à *G. claroideum* a été décrit. Le groupe spécifique pourrait être associé à l'amélioration de la mycorhization observée dans les racines inoculées avec C7R12. Néanmoins, compte tenu de sa faible représentation numérique (8%), il semble probable que l'inoculation de C7R12 ait aussi un effet quantitatif sur la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA. Les SST3 des *Pseudomonas* phytopathogènes sont connus pour modifier les mécanismes de défense de la plante et permettre une meilleure colonisation de l'hôte par les bactéries. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le SST3 de C7R12 pourrait favoriser la colonisation des racines par les CMA en modifiant les réactions de défense de la plante et être impliqué dans la capacité de vie endophyte de la bactérie. Les résultats préliminaires, présentés dans le **chapitre V**, ont montré que C7R12 présente effectivement une meilleure aptitude à la vie endophyte que son mutant SST3-. La comparaison de la colonisation de la racine par C7R12 et C7SM7 à l'aide des observations microscopiques, n'a pas permis de confirmer les premiers résultats obtenus par dénombrement. Néanmoins, les études en microscopie n'ont concerné qu'une partie réduite de la racine et devront être complétées.

Mots clés : système de sécrétion de type III, *Pseudomonas* spp. fluorescents, mycorrhiza helper bacteria (MHB), *Medicago truncatula*, champignons mycorrhizogènes à arbuscules, interactions plantes-microorganismes bénéfiques

Table des Matières

Introduction générale.....	1
Contexte scientifique.....	2
Objectif du travail de thèse	11
CHAPITRE I.....	13
Synthèse bibliographique relative aux systèmes de sécrétion de type III des <i>Pseudomonas</i> non pathogènes.....	15
1. Introduction	15
2. Différents types de système de sécrétion.....	15
2.1. Système de sécrétion de type I	15
2.2. Système de sécrétion de type II	16
2.3. Système de sécrétion de type IV.....	17
2.4. Système de sécrétion de type V	18
2.5. Système de sécrétion de type VI.....	19
3. Système de sécrétion de type III	19
3.1. SST3 des bactéries pathogènes.....	19
3.2. SST3 des bactéries non pathogènes	19
3.3. SST3 des <i>Pseudomonas</i> non pathogènes	20
4. Organisation génétique et structure du SST3.....	22
4.1. SST3 des bactéries pathogènes.....	22
4.2. SST3 du phytopathogène <i>Pseudomonas syringae</i>	22
4.3. SST3 des <i>Pseudomonas</i> non pathogènes	24
5. Protéines chaperonnes	26
5.1. Définition et classification des protéines chaperonnes.....	26
5.2. Protéines chaperonnes des bactéries pathogènes	27
5.3. Protéines chaperonnes des <i>Pseudomonas</i> non pathogènes.....	27
6. Régulation des gènes de SST3.....	28
6.1. Facteurs environnementaux	28
6.2. Contact entre les cellules hôtes eucaryotes et les bactéries pathogènes	29
6.3. Régulation transcriptionnelle de type Hrp-I.....	30
6.4. Régulation transcriptionnelle de type Hrp-II	31

6.5. Induction et régulation des gènes de SST3 des <i>Pseudomonas</i> non pathogènes	32
7. Protéines sécrétées <i>via</i> le SST3	33
7.1. Protéines effectrices des bactéries pathogènes d'animaux	33
7.2. Protéines effectrices des bactéries phytopathogènes	34
7.3. Protéines effectrices des <i>Pseudomonas</i> non pathogènes	35
8. Signal de sécrétion des protéines effectrices	36
9. Origine et évolution des SST3	36
9.1. Origine des SST3	36
9.2. Evolution des SST3	38
10. Conclusion	40

CHAPITRE II..... 41

Avant propos	43
Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of <i>Medicago truncatula</i>	45
1. Abstract	45
2. Introduction	46
3. Materials and methods	48
3.1. Plant growth conditions and bacterial strains	48
3.2. Evaluation of plant mycorrhization, nodulation and growth	50
3.3. PCR amplifications	50
3.4. RFLP of <i>hrcRST</i> -PCR fragments	51
3.5. DNA cloning, sequencing and analysis	51
3.6. Statistical analysis	52
4. Results	53
4.1. Growth, development, mycorrhization and nodulation of the plant genotypes	53
4.2. Comparison of fluorescent pseudomonads harboring <i>hrcRST</i> genes in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots	53
4.3. Genotypic diversity of <i>hrcRST</i> ⁺ fluorescent pseudomonads	54
5. Discussion	56
6. Acknowledgments	60
7. References	60
Bilan	64

CHAPITRE III	66
Avant propos _____	68
Type three secretion system is involved in the promotion of arbuscular mycorrhization of <i>Medicago truncatula</i> by <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 _____	70
1. Summary _____	70
2. Introduction _____	71
3. Materials and methods _____	73
3.1. Microorganisms used and plant growth conditions _____	73
3.2. Construction of a <i>hrcC</i> negative mutant of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 ____	73
3.3. Spore germination and hyphal growth of <i>Glomus mosseae</i> <i>in vitro</i> assay _____	74
3.4. Bacterial survival in the plant rhizosphere _____	74
3.5. Evaluation of plant mycorrhization and biomass _____	75
4. Results _____	75
4.1. Construction of a <i>hrcC</i> negative mutant of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 ____	75
4.2. Compared effects of C7R12 and its <i>hrcC</i> - mutant on the saprophytic growth of <i>Glomus mosseae</i> BEG12 _____	75
4.3. Survival kinetics of C7R12 and its <i>hrcC</i> - mutant in medic rhizosphere _____	76
4.4. Compared effects of C7R12 and its <i>hrcC</i> - mutant on root colonization by indigenous AM fungi and on plant growth _____	76
5. Discussion _____	77
6. Acknowledgements _____	79
7. References _____	79
Bilan _____	83

CHAPITRE IV	85
Avant propos _____	87
Impact of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 type III secretion system on bacterial and fungal communities in the rhizosphere of <i>Medicago truncatula</i> _____	89
1. Summary _____	90
2. Introduction _____	90
3. Material and methods _____	93
3.1. Soil and plant growth conditions _____	93
3.2. Evaluation of plant growth, plant mycorrhization, and nodulation _____	93
3.3. Extraction and purification of total DNA from soil samples _____	94

3.4. Automated RISA fingerprinting _____	95
3.5. PCR amplification of intra-radical AM fungi and nitrogen fixing <i>Ensifer</i> symbionts DNA _____	96
3.6. Cloning, sequencing and analysis of intra-radical LSU rDNA sequences of AM fungi and of IGS _{EXO} sequences of nitrogen fixing <i>Ensifer</i> symbionts _____	97
3.7. Statistical analysis _____	98
4. Results _____	99
4.1. Kinetics of root colonization by AM fungi _____	99
4.2. DNA fingerprints of microbial communities _____	100
4.3. Variation of the genetic structure of microbial communities according to the compartment sampled _____	100
4.4. Impact of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 and of its <i>hrcC</i> - mutant on the genetic structure of microbial communities _____	102
4.5. Intra-radical communities of indigenous AM fungi _____	102
4.6. Intra-radical communities of nitrogen fixing symbionts _____	103
5. Discussion _____	104
6. Acknowledgments _____	107
7. References _____	107
Bilan _____	111

CHAPITRE V 113

Contribution du système de sécrétion de type III à la colonisation rhizosphérique et à l'adaptation de <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 à la vie endophyte _____	115
1. Introduction _____	115
2. Matériels et méthodes _____	116
2.1. Culture gnotobiotique de <i>M. truncatula</i> en boîtes de Pétri sur de l'eau gélosée _	116
2.2. Culture gnotobiotique de <i>M. truncatula</i> en tubes dans du sable de Biot _____	117
2.3. Prélèvements et études microbiologiques _____	118
2.4. Etude de la colonisation de la surface des racines à l'aide du microscope électronique à balayage (MEB) _____	119
2.5. Etude de la colonisation intraradiculaire à l'aide du microscope électronique à transmission (MET) _____	121
3. Résultats _____	123

3.1. Contribution du SST3 à la survie de C7R12 dans la rhizosphère et dans les racines _____	123
3.2. Localisation des bactéries à la surface de la racine _____	124
3.3. Localisation des bactéries dans les tissus de la racine _____	125
3.4. Colonisation de la racine par les bactéries _____	125
4. Discussion _____	127
Discussion générale et perspectives	130
Discussion générale _____	131
Perspectives _____	136
Références bibliographiques	138
Curriculum vitae	168

Introduction générale

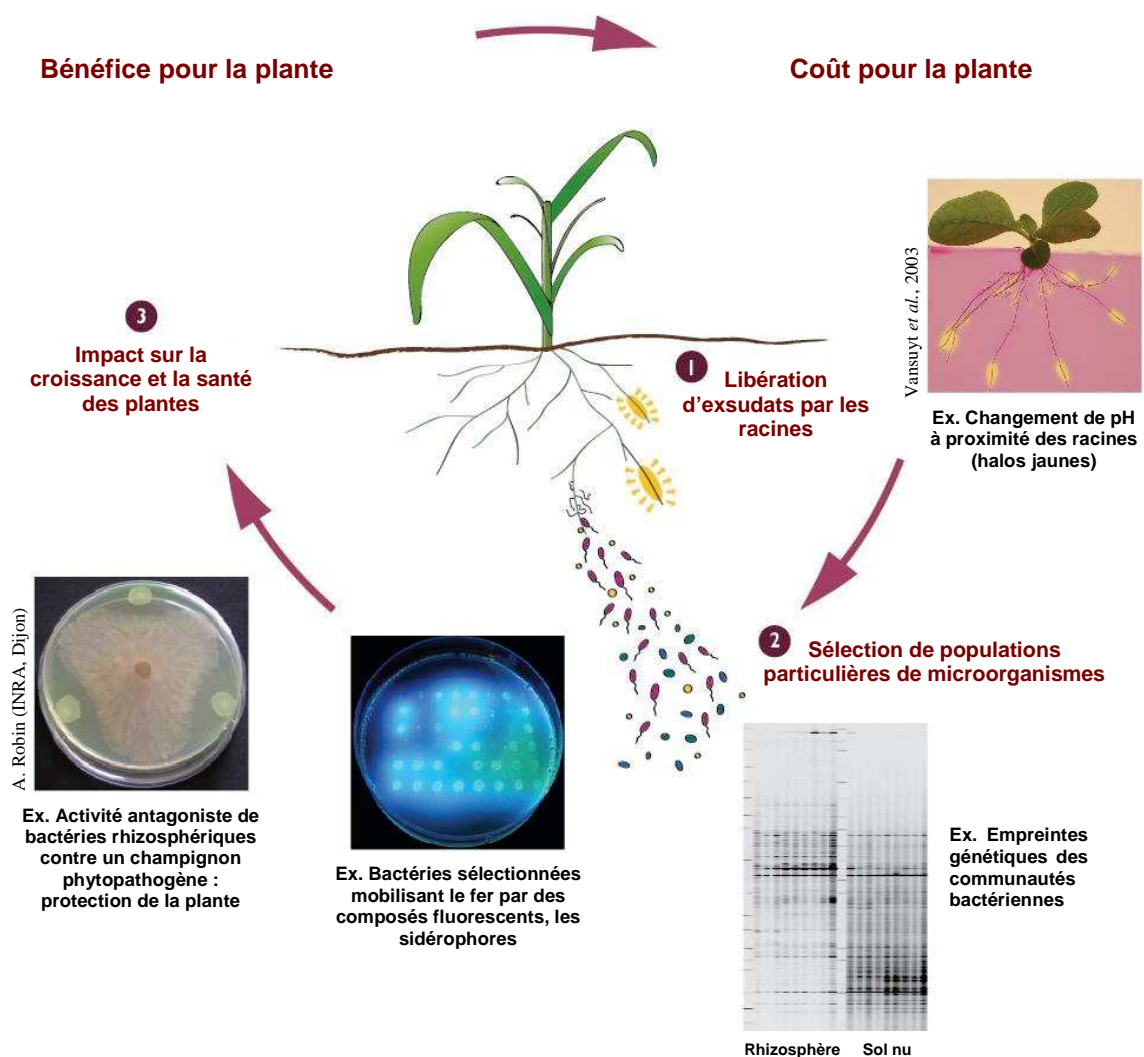
Contexte scientifique

En agriculture, la quête constante d'une amélioration de la productivité et d'une réduction des coûts ont eu des incidences négatives à plusieurs niveaux. Outre les importants bouleversements culturels qui en ont découlé, la qualité de l'environnement a été particulièrement touchée : contamination de l'eau par une utilisation intensive de produits phytosanitaires et d'engrais de synthèse, présence dans les aliments de résidus nocifs pour la santé, appauvrissement des sols, réduction de la biodiversité du fait de la présence de cultures uniques de masse, perturbation de la vie microbienne...

Sur la base de ce constat, le concept d'agroécologie a été développé dans le but d'apporter des alternatives à des méthodes agricoles dangereuses pour notre environnement et notre santé. Miguel Altieri (1986), un des pionniers de ce concept, a défini l'agroécologie comme étant *"une science intégrée qui cherche à comprendre les flux d'énergie, d'information et de matière dans les agroécosystèmes en vue d'optimiser les extrants tout en minimisant l'utilisation d'intrants extérieurs et en évitant l'exploitation minière ou polluante des ressources naturelles"*. L'objectif de l'agroécologie est donc de garantir un développement agricole durable et compétitif, nécessaire pour couvrir des besoins croissants, tout en respectant l'environnement afin de récolter des aliments sains et de préserver les écosystèmes.

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002) et jusqu'à 200 m d'hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Smith et Read, 2008 ; Sprent, 2001), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006). Cependant, alors qu'il est largement reconnu que les microorganismes jouent un rôle indispensable dans les cycles géochimiques, leur impact sur la productivité et la diversité des plantes est encore mal compris.

Figure 1. Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère.



Interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Hiltner (1904) fut le premier à définir la rhizosphère comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne. La rhizosphère est le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La dynamique de ces interactions peut être représentée par une boucle de rétroaction comme celle décrite par Lemanceau *et al.* (2006 ; Fig. 1).

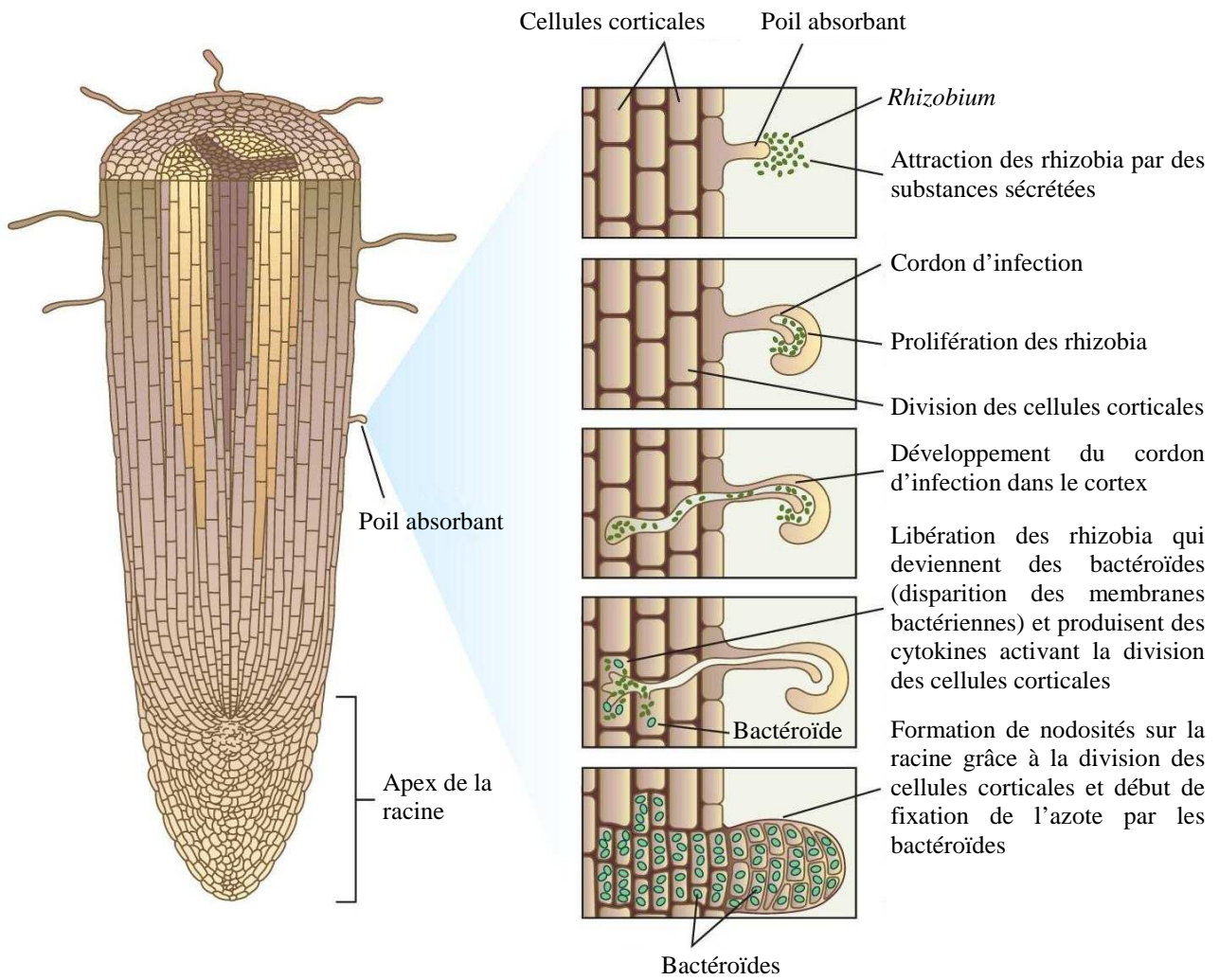
1 Les plantes transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique et la stockent temporairement sous forme de liaisons chimiques riches en énergie dans des molécules organiques par le processus de photosynthèse. La photosynthèse conduit à une accumulation d'énergie d'origine solaire dans les végétaux chlorophylliens (production biologique primaire) et soutient le fonctionnement des écosystèmes en convertissant l'énergie lumineuse et les éléments minéraux en matières organiques utilisables par les niveaux trophiques supérieurs. Une partie significative des photosynthétats de la plante est directement libérée dans le sol sous forme de molécules organiques appelées 'rhizodépôts'. Ces rhizodépôts représentent de 5 à 40% des produits de la photosynthèse (Nguyen, 2009). La plante modifie donc l'environnement rhizosphérique en libérant divers composés dans les rhizodépôts.

2 La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu (Curl et Truelove, 1986 ; Lemanceau et Heulin, 1998 ; Morgan *et al.*, 2005 ; van Loon, 2007). Ces modifications quantitatives de la microflore, ou 'effet rhizosphère', s'accompagnent également de modifications qualitatives. En effet, la diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Cardon et Gage, 2006 ; Garbeva *et al.*, 2008 ; Kowalchuk *et al.*, 2010 ; Latour *et al.*, 2009 ; Lemanceau *et al.*, 1995) et leur activité métabolique (Bending, 2003 ; Nannipieri *et al.*, 2008 ; Pinton *et al.*, 2001) diffèrent de celles du sol nu. Les populations aptes à percevoir les variations de l'environnement rhizosphérique et à adapter leur physiologie, tirent profit de la perturbation et sont favorisées. Les composés organiques exsudés par les plantes dans la rhizosphère activent différents groupes de microorganismes et augmentent leur prolifération (Bais *et al.*, 2006).

3 Les rhizodépôts constituent donc un élément majeur de perturbation de la microflore tellurique qui en retour, influence la croissance et la santé des plantes et donc, à nouveau, l'émission des rhizodépôts... La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes (Cardon et Gage, 2006 ; Kent et Triplett, 2002). Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur influence sur le développement des végétaux ne soit connue (microorganismes commensaux), certains sont favorables aux plantes (mutualistes) alors que d'autres ont des effets délétères sur les plantes (parasites et phytopathogènes). La croissance, la santé des plantes et leur diversité sont donc influencées par la diversité des populations microbiennes présentes dans la rhizosphère (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Lemanceau, 1992 ; van der Heijden *et al.*, 2008 ; Weller *et al.*, 2002 ; Whipps, 2001). Les rhizodépôts jouent un rôle actif dans la régulation des interactions mutualistes et parasites/pathogènes, entre les plantes et les microbes du sol (Hirsch *et al.*, 2003).

Du fait de l'importance du coût énergétique que représente la libération de rhizodépôts pour la plante et de la forte densité de microorganismes bénéfiques pour leur croissance et leur santé dans la rhizosphère, il a été suggéré que la plante influencerait la structure et l'activité des communautés microbiennes en favorisant les populations qui lui sont bénéfiques (Cook *et al.*, 1995 ; Lynch, 1987). Afin de tirer partie de cette situation et ainsi, optimiser les interactions favorables à la croissance et la santé des plantes et développer des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement et moins consommatrices d'intrants de synthèse, il est nécessaire de mieux connaître les mécanismes d'interactions entre les plantes et les microorganismes de la rhizosphère. Actuellement, l'utilisation de microorganismes pour améliorer la croissance et la santé des plantes repose principalement sur l'inoculation. Les microorganismes, tels que les champignons mycorrhizogènes (Elhassan *et al.*, 2010 ; Gianinazzi *et al.*, 2010) et les bactéries fixatrices d'azote (Bhattacharjee *et al.*, 2008 ; Elhassan *et al.*, 2010), représentent un potentiel important pour l'amélioration de la croissance des plantes et la lutte biologique contre les maladies d'origine tellurique. La variabilité des résultats obtenue par l'utilisation d'organismes vivants est souvent supérieure à celle obtenue par l'application de produits de synthèse. De meilleures connaissances des mécanismes d'interaction plantes-microorganismes permettraient d'envisager de développer des pratiques autres que l'utilisation d'inoculants comme, par exemple, favoriser des populations déjà présentes dans la rhizosphère et qui sont bénéfiques pour les plantes.

Figure 2. Etapes simplifiées de la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote entre les rhizobia et les racines des légumineuses (d'après *Evolution* © 2007 Cold Harbor Laboratory Press).

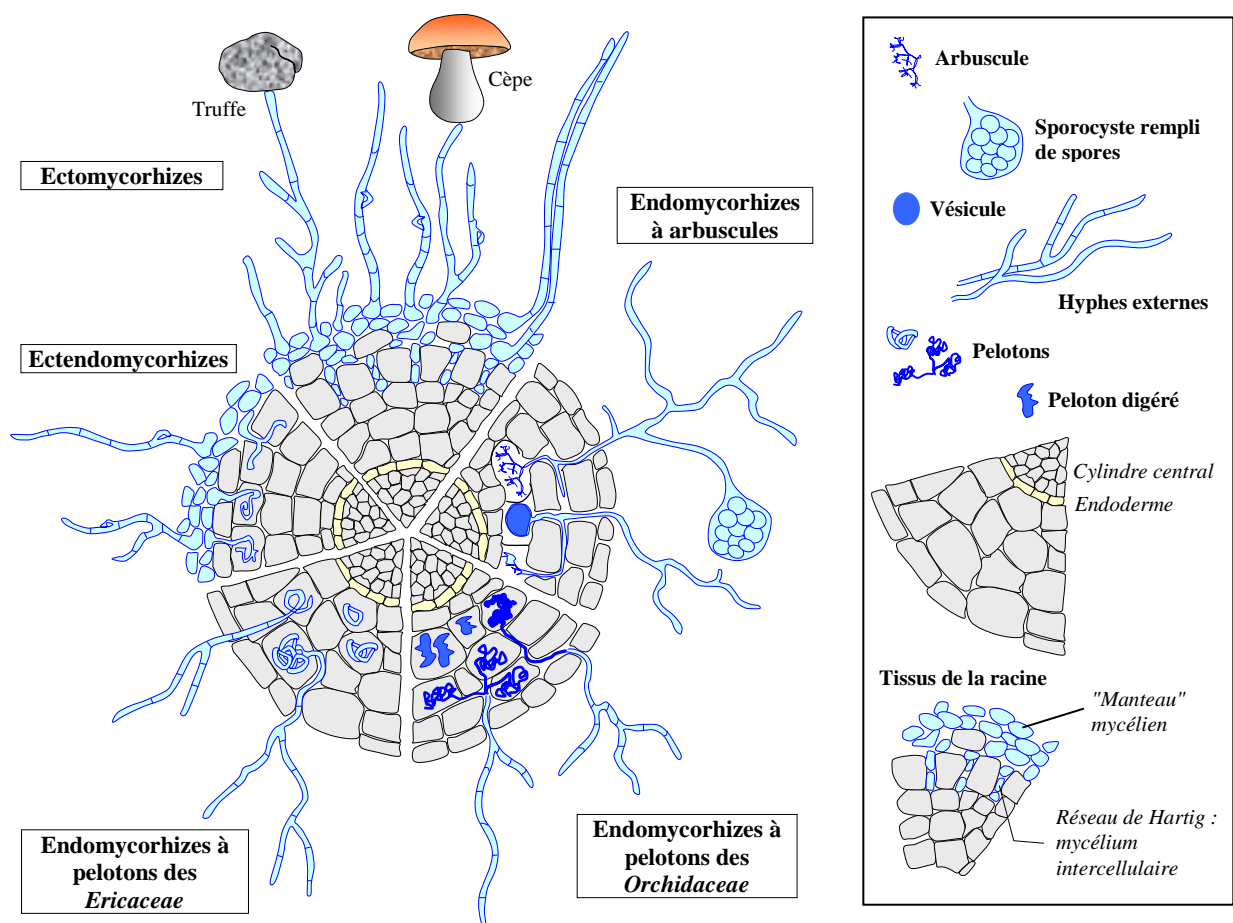


Deux catégories d'effets bénéfiques des microorganismes sur les plantes peuvent être distinguées (van der Heijden *et al.*, 2008) : (i) **les effets directs** *via* les organismes microbiens associés à la racine qui mettent en place des relations mutualistes avec les plantes et (ii) **les effets indirects** *via* l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère qui modifient les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs et la répartition des ressources.

Effets bénéfiques directs des microorganismes sur la croissance et la santé des plantes

Parmi les organismes à effets bénéfiques directs, différents microorganismes de la rhizosphère mettent en place des associations symbiotiques avec les plantes et peuvent stimuler leur productivité et leur diversité. **Les associations symbiotiques entre les plantes et les microorganismes fixateurs d'azote**, tels que les bactéries appartenant au groupe des Actinomycètes et à la famille des *Rhizobiaceae*, sont parmi les plus connues. Ces dernières, collectivement désignées par le terme 'rhizobia', sont particulièrement bien étudiées. Elles établissent des relations symbiotiques avec les plantes appartenant pour la plupart à la famille des légumineuses particulièrement importante dans la production agricole (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Fig. 2). Cette symbiose entre les rhizobia et les légumineuses, se caractérise par la formation sur les racines hôtes, d'organes symbiotiques appelés nodosités dans lesquelles ces bactéries se logent (Dénarié *et al.*, 1992 ; Franssen *et al.*, 1992 ; Perret *et al.*, 2000). L'association symbiotique permet aux rhizobia de bénéficier d'un micro-habitat favorable dans lequel ces bactéries ont accès aux substrats carbonés issus de la photosynthèse. En échange, les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammonium et le rendent ainsi, directement assimilable par les plantes hôtes. Les bactéries fixatrices d'azote sont des régulateurs importants de la productivité des plantes, incapables d'utiliser l'azote atmosphérique sans ces microorganismes. De plus, l'azote est, avec le phosphore et le potassium, l'élément principal qui limite la croissance des plantes (Chapin, 1980). Dans certains habitats dominés par les légumineuses, par exemple la savane, les prairies et les forêts tropicales, les symbiotes bactériens fixateurs d'azote peuvent contribuer à la fourniture d'une part significative de l'azote annuellement utilisé par les plantes (jusqu'à 20% ; van der Heijden *et al.*, 2006a). Ces auteurs ont également montré que ces bactéries symbiotiques influenceraient la composition des communautés et la diversité des plantes. On estime que 15000 espèces de légumineuses forment des associations symbiotiques avec les bactéries fixatrices d'azote (Sprent, 2001). La présence de ces symbiotes ou leur apparition dans les

Figure 3. Principales formes de mycorhizes associées aux racines des plantes supérieures d'après Halle (2008). Les ectomycorhizes sont caractérisées par la non pénétration des filaments du champignon dans les cellules et la formation d'un 'manteau' autour des racines. Les filaments externes sont figurés longitudinalement et les filaments intercellulaires sont figurés en coupe transversale. Chez les endomycorhizes, certains des filaments du champignon pénètrent à l'intérieur des cellules des racines : les endomycorhizes à arbuscules qui sont les plus courantes et les endomycorhizes à pelotons des orchidées et des éricales. Les ectendomycorhizes sont caractérisées par un manteau et par la pénétration des filaments à l'intérieur des cellules sous forme de pelotons.



habitats non colonisés, favorise la croissance et la capacité concurrentielle de leurs plantes hôtes ce qui influencerait indirectement, la succession de la végétation (Vitousek et Walker, 1989), la productivité des plantes (Spehn *et al.*, 2002), la capacité d'invasion des plantes (Parker *et al.*, 2006), la composition des communautés et la diversité des plantes (van der Heijden *et al.*, 2006a).

Parmi les microorganismes produisant des effets directs, **les champignons mycorhizogènes constituent un autre groupe très étudié de symbiotes de plantes**. Les mycorhizes résultent de l'association entre les racines des plantes et les champignons du sol (appartenant aux phyla des Glomeromycota, des Ascomycota et des Basidiomycota). Plusieurs catégories d'associations mycorhiziennes ont été décrites sur la base de critères morphologiques, fonctionnels et évolutifs (Brundrett, 2002 et 2004 ; Smith et Read, 2008 ; Fig. 3). Une classification récente définit 5 types d'associations correspondant aux (i) endomycorhizes à arbuscules, (ii) ectomycorhizes, (iii) endomycorhizes à pelotons intracellulaires des *Orchidaceae*, (iv) mycorhizes éricoïdes ou endomycorhizes à pelotons des *Ericaceae* et (v) mycorhizes subépidermiques ou ectendomycorhizes (Brundrett, 2004). Les symbioses mycorhiziennes sont des associations à bénéfices réciproques fournissant aux plantes des éléments nutritifs limitants, tels que le phosphore, le cuivre, le fer et le zinc, en échange de carbone. Dans certains cas, il a été montré que le champignon pouvait conférer à la plante une résistance au stress hydrique (Abo-Ghalia et Khalafallah, 2008 ; Futai *et al.*, 2008 ; Subramanian *et al.*, 2006) ainsi qu'une protection contre certaines maladies d'origine tellurique (Futai *et al.*, 2008 ; Pozo *et al.*, 2002 ; van Wees *et al.*, 2008), se traduisant par une amélioration de la croissance de la plante, ou dans d'autres cas, par une amélioration de leur fécondité (Brundrett, 2004 ; Calvaruso *et al.*, 2010 ; Richardson *et al.*, 2009). Les ectomycorhizes et les endomycorhizes constituent deux types de symbioses particulièrement importants : (i) les ectomycorhizes, parce qu'elles concernent principalement les végétaux ligneux et sont essentielles dans l'équilibre des écosystèmes forestiers (Courty *et al.*, 2010) et (ii) les endomycorhizes, car elles constituent les associations mycorhiziennes les plus fréquemment rencontrées dans la nature. Les formes les plus répandues sont les endomycorhizes à arbuscules (Smith et Read, 2008). En effet, ces symbioses ont été recensées chez 80% des plantes terrestres (Smith et Read, 2008 ; Wang et Qiu, 2006). Elles sont établies entre les racines des plantes et des champignons appartenant au phylum des Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) encore appelés champignons mycorhizogènes à arbuscules (CMA).

Plusieurs études rapportent que les CMA augmenteraient jusqu'à deux fois la productivité des plantes dans les prairies (van der Heijden *et al.*, 1998 ; Vogelsang *et al.*, 2006). L'amélioration de l'absorption du phosphate est l'un des mécanismes par lequel les CMA peuvent améliorer la productivité des plantes et des expériences ont montré que les CMA contribuent à hauteur de 90% dans l'absorption du phosphate par les plantes (Jakobsen *et al.*, 1992 ; van der Heijden *et al.*, 1998 et 2006b). De plus, les CMA pourraient augmenter la diversité des plantes de 30% dans les prairies européennes (van der Heijden *et al.*, 1998) en favorisant l'établissement des jeunes plantules et en améliorant la capacité compétitive de certaines espèces par rapport aux espèces dominantes (van der Heijden *et al.*, 2006b). Cependant, les CMA peuvent également réduire la diversité des plantes, en particulier dans les écosystèmes où les espèces végétales les plus abondantes ont une forte dépendance mycorhizienne telles que certaines plantes annuelles en Australie (O'Connor *et al.*, 2002).

Effets bénéfiques indirects des microorganismes sur la croissance et la santé des plantes

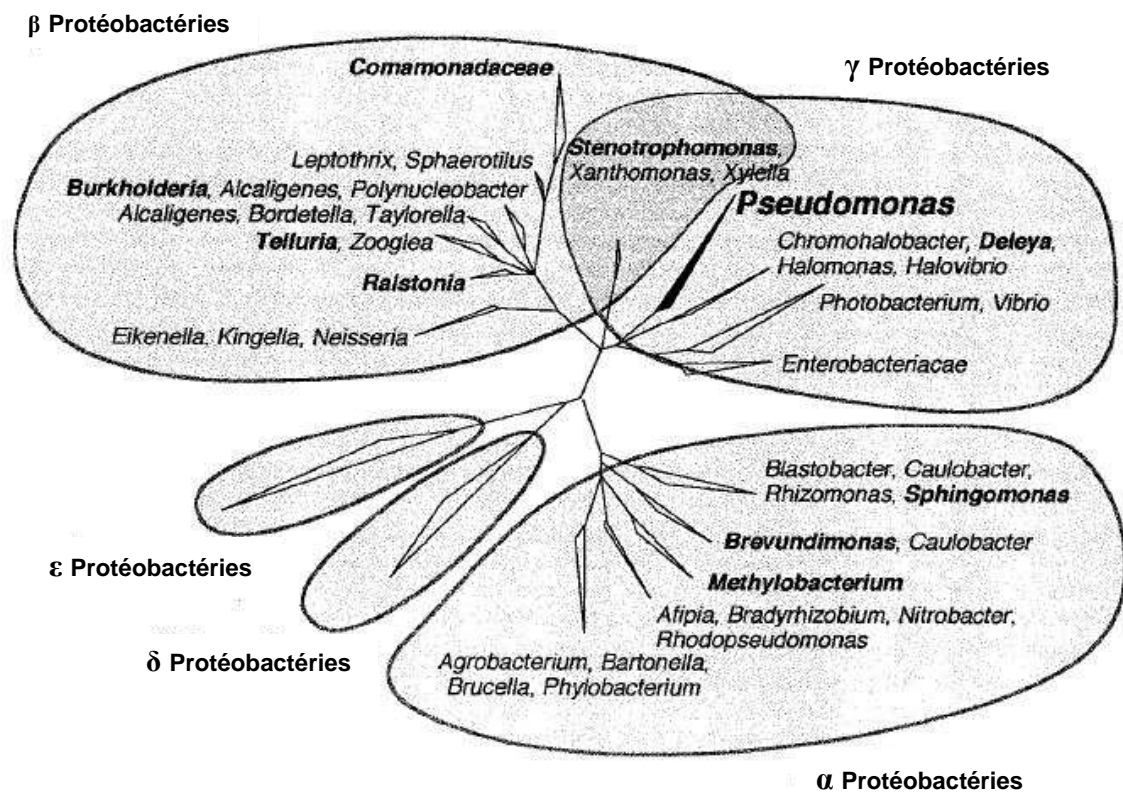
Les microorganismes vivant librement dans la rhizosphère peuvent également avoir un effet bénéfique indirect sur la plante (van der Heijden *et al.*, 2008). D'une manière générale, le processus de minéralisation est une voie importante par laquelle les microorganismes vivant librement influencent la disponibilité des éléments nutritifs et donc la productivité, la santé et la diversité des plantes. Par ce processus, les microorganismes du sol décomposent la matière organique soluble et insoluble et libèrent ensuite des éléments minéraux disponibles pour les plantes.

Parmi les microorganismes à effets bénéfiques indirects, il existe notamment des bactéries libres dont l'effet global favorise la croissance de la plante (Lemanceau, 1992). Ces bactéries sont désignées collectivement par le terme **PGPR** (pour plant growth-promoting rhizobacteria ; Kloepper et Schroth, 1978). Différents mécanismes sont à l'origine des effets PGPR des bactéries rhizosphériques. La fixation de l'azote atmosphérique est un mécanisme par lequel les microorganismes fixateurs dits 'libres', peuvent améliorer la croissance de la plante. Ces bactéries appartiennent à différents genres, tels que *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter* et *Azoarcus* (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000). Chaque année, elles fixent l'azote à des taux relativement faibles mais à des quantités néanmoins significatives ($< 3 \text{ kg ha}^{-1}$; Cleveland *et al.*, 1999). Ces bactéries sont utilisées en agriculture

pour la biofertilisation des sols (Bloemberg et Lugtenberg, 2001) en fixant l'azote atmosphérique qui pourra être par la suite utilisé par les plantes, améliorant leur croissance lorsque l'azote du sol est limitant. Certaines bactéries PGPR sont utilisées dans la filière agricole en tant qu'inoculants pour améliorer le développement de la racine *via* la production de phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg, 2001), telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (Barea *et al.*, 2005 ; Steenhoudt et Vanderleyden, 2000 ; Vessey, 2003). Il a également été montré que certaines bactéries sont capables de favoriser la croissance des plantes *via* l'amélioration de la mise en place ou du fonctionnement des symbioses entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote (Remans *et al.*, 2007) et les champignons mycorhizogènes (Frey-Klett *et al.*, 2007 ; Garbaye, 1994 ; Pivato *et al.*, 2009). Les bactéries qui ont la capacité de promouvoir l'établissement des mycorhizes en améliorant le contact des champignons avec les racines des plantes hôtes et la colonisation de ces racines, sont appelées MHB (pour mycorrhiza helper bacteria ; Garbaye, 1994).

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance saprophyte des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme **agents de lutte biologique** (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Whipps, 2001). Les microorganismes pathogènes sont connus pour pouvoir induire chez les plantes des mécanismes de défense, par l'intermédiaire de la résistance systémique acquise (SAR pour systemic acquired resistance) qui protège les plantes contre les attaques ultérieures d'autres pathogènes. Certaines bactéries sont capables d'avoir un effet protecteur en induisant elles aussi, des mécanismes de défense des plantes *via* la résistance systémique induite (ISR pour induced systemic resistance ; van Loon, 2007) permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes. D'autres bactéries peuvent contrôler la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, la compétition pour le carbone (Lemanceau *et al.*, 1988) et la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau *et al.*, 2009). L'antagonisme microbien, lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques, est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les microorganismes phytopathogènes (Mazurier *et al.*, 2009 ; van Loon, 2007).

Figure 4. Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis *et al.*, 2000 ; adapté de Kersters *et al.*, 1996).



Bactéries du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à coloration Gram négative (Gram-), non sporulés, très généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimioorganotrophes (Palleroni, 2009). Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004 ; Fig. 4). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre. La réorganisation a débuté en 1968 et, actuellement, l'édition de 2005 du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* rapporte une soixantaine d'espèces au genre *Pseudomonas* (Palleroni, 2005). Néanmoins, 188 espèces sont actuellement répertoriées sur le site internet <http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>.

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux pathovars de *P. syringae* qui mettent en place des **interactions pathogènes** avec les plantes (Höfte et de Vos, 2006). *P. syringae*, comme beaucoup d'autres *Pseudomonas* phytopathogènes, est capable d'induire chez les plantes résistantes non hôtes, une réaction hypersensible (HR pour hypersensitive reaction ; Alfano et Collmer, 1997) à l'origine de la SAR. La HR est une réaction rapide de défense des plantes correspondant à une mort programmée des cellules aux sites d'invasion, ou apoptose, qui bloque la progression du pathogène (Hueck, 1998 ; Klement, 1982). Néanmoins, d'autres espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des **interactions mutualistes**. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet promoteur sur la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les MHB et les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes (Dubuis *et al.*, 2007). La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires et à induire l'ISR chez les

plantes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; van Loon, 2007 ; Weller *et al.*, 2002 et 2007 ; Whipps, 2001). Les *Pseudomonas* produisent notamment, de nombreux métabolites antifongiques (AFM pour anti-fungal metabolite ; Weller *et al.*, 2002 et 2007). En effet, la plupart des *Pseudomonas* produisent des AFM, dont les phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (pour 2,4-diacetylphloroglucinol) qui sont les AFM les plus fréquemment détectés (Haas et Défago, 2005 ; Rezzonico *et al.*, 2007). Ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes (Lemanceau *et al.*, 2009) et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux (Vansuyt *et al.*, 2007). Elles élicitent les réactions de défenses des plantes et, de par leur forte affinité pour le fer, elles limitent la croissance saprophyte de certains microorganismes phytopathogènes (Lemanceau *et al.*, 2009).

Depuis les années 2000, différentes études ont mis en évidence l'existence de **systèmes de sécrétion de type III** (SST3) chez des *Pseudomonas* non pathogènes saprotrophes et mutualistes (Jackson *et al.*, 2005 ; Mazurier *et al.*, 2000 et 2004 ; Mulya *et al.*, 1996 ; Preston *et al.*, 2001 ; Preston, 2007 ; Rainey, 1999 ; Rezzonico *et al.*, 2004 et 2005 ; Warmink *et al.*, 2008 ; Warmink et van Elsas, 2008). Les SST3 sont présents chez la plupart des pathogènes Gram- et sont liés à la pathogénie de ces organismes (Büttner et Bonas, 2006 ; He *et al.*, 2004). A l'origine, ces systèmes ont été identifiés chez le pathogène d'animaux *Yersinia* (Michiels *et al.*, 1990). Les SST3 ont ensuite été mis en évidence chez d'autres pathogènes d'animaux (*Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas* et *Escherichia*), puis chez des bactéries phytopathogènes (*Erwinia*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* et *Pseudomonas*) (Büttner et Bonas, 2006 ; Cornelis, 2006 ; He *et al.*, 2004). Les SST3 constituent des systèmes spécifiques de micro-injection de facteurs de virulence de cellules procaryotes et permettent aux bactéries d'injecter des protéines effectrices directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes animales ou végétales (Cornelis, 2006 ; da Cunha *et al.*, 2007). Différentes études rapportant la présence de SST3 chez des bactéries non pathogènes, telles que les *Pseudomonas* saprotrophes et mutualistes, tendent à montrer que ces systèmes pourraient être largement distribués dans les environnements telluriques. Ce groupe bactérien, défini par ce système de communication cellulaire avec les eucaryotes, constitue un groupe fonctionnel potentiel. Néanmoins, aucune fonction associée aux SST3 de ces bactéries n'a encore été clairement identifiée et les connaissances actuelles concernant leur présence chez les

Pseudomonas non pathogènes restent encore assez limitées. Au cours de ces dernières années, les SST3 ont été identifiés comme étant impliqués dans les interactions commensales et mutualistes entre des bactéries non pathogènes et les plantes (Coombes, 2009), ce qui élargit le rôle connu de ces systèmes de sécrétion (Preston, 2007). Cependant, même si les travaux de Rezzonico *et al.* (2004), Warmink *et al.* (2008) et Warmink et van Elsas (2008) suggèrent que les *Pseudomonas* possédant un SST3 pourraient interagir avec d'autres organismes eucaryotes que les plantes, tels que les organismes fongiques, aucune étude n'a encore permis de mettre en évidence le rôle de ces systèmes dans les interactions multitrophiques bénéfiques pour les plantes dans la rhizosphère.

Objectif du travail de thèse

L'objectif de cette thèse est de progresser dans la connaissance des interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes en évaluant la contribution des systèmes de sécrétion de type III. La stratégie d'étude de ce travail a consisté (i) à étudier l'influence de la rhizosphère d'une plante sur une population bactérienne spécifique, naturellement présente et possédant un SST3 (SST3+), (ii) à analyser en retour, les effets induits par une souche bactérienne modèle SST3+ sur la plante hôte et les autres microorganismes indigènes qui sont associés naturellement à la plante dans la rhizosphère et (iii) à effectuer un travail exploratoire afin de dégager des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'interaction mutualiste entre les plantes et les bactéries SST3+.

Pour cela, une synthèse des principales informations relatives aux SST3 chez les *Pseudomonas* spp. non pathogènes, saprotrophes ou mutualistes, a été réalisée (**chapitre I**). Plusieurs approches expérimentales ont ensuite été développées.

La première partie de l'étude expérimentale repose sur une approche sans *a priori* basée sur l'étude de populations des *Pseudomonas* spp. fluorescents (**chapitre II**). La fréquence des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ a été estimée. La diversité de cette population a ensuite été analysée ainsi que la diversité de gènes caractéristiques du SST3 des isolats SST3+. Ce travail a permis de comparer la population de *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ associée au sol nu naturel, la rhizosphère et le compartiment racines-rhizoplane de la

plante modèle *Medicago truncatula*. Pour la plante, trois génotypes ont été comparés : *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5, génotype sauvage capable d'établir des mycorhizes à arbuscules ainsi que des symbioses fixatrices d'azote (Myc+/Nod+) et ses mutants TRV48 (Myc+/Nod-) et TRV25 (Myc-/Nod-) (Catoira *et al.*, 2000 ; Morandi *et al.*, 2005 ; Sagan *et al.*, 1995).

La seconde partie a reposé sur une approche ciblée, basée sur des travaux effectués avec la souche modèle *Pseudomonas fluorescens* C7R12. Cette souche est connue pour posséder un SST3 (Mazurier *et al.*, 2004), avoir des effets de type PGPR (Sanchez *et al.*, 2005), des effets antagonistes à l'encontre de pathogènes fongiques d'origine tellurique (Lemanceau et Alabouvette, 1991) et des propriétés de bactéries MHB (Pivato *et al.*, 2009). La stratégie d'étude a consisté à comparer, après inoculation, les effets de la souche sauvage *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) à ceux induits par son mutant *hrcC*- C7SM7 (SST3-). Cette étude a permis de déterminer (i) la contribution du SST3 dans l'effet bénéfique de C7R12 sur la croissance, les paramètres de mycorhization et de nodulation de *M. truncatula* J5 (**chapitre III**) et (ii) les effets de la présence du SST3 de C7R12 sur les communautés fongiques et bactériennes qui sont naturellement associées aux racines de la plante (**chapitre IV**).

Enfin, une étude exploratoire en microbiologie pasteurienne et en microscopie a été entreprise afin d'évaluer le rôle du SST3 de *P. fluorescens* C7R12 sur (i) la capacité de la bactérie à la vie endophyte et (ii) son aptitude à la colonisation des différents tissus de la racine (**chapitre V**). Cette étude a eu pour objectif d'identifier les hypothèses les plus probables concernant le mode d'action intervenant lors de l'interaction bénéfique *M. truncatula*-*P. fluorescens* C7R12 via le SST3.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique relative aux systèmes de sécrétion de type III des *Pseudomonas* non pathogènes

Viollet, A., Lemanceau, P. et Mazurier, S. (**en prévision**). The type III secretion system of plants-associated non pathogenic pseudomonads in the rhizosphère.

Synthèse bibliographique relative aux systèmes de sécrétion de type III des <i>Pseudomonas non pathogènes</i>	15
1. Introduction	15
2. Différents types de système de sécrétion	15
2.1. Système de sécrétion de type I	
2.2. Système de sécrétion de type II	
2.3. Système de sécrétion de type IV	
2.4. Système de sécrétion de type V	
2.5. Système de sécrétion de type VI	
3. Système de sécrétion de type III	19
3.1. SST3 des bactéries pathogènes	
3.2. SST3 des bactéries non pathogènes	
3.3. SST3 des <i>Pseudomonas non pathogènes</i>	
4. Organisation génétique et structure du SST3	22
4.1. SST3 des bactéries pathogènes	
4.2. SST3 du phytopathogène <i>Pseudomonas syringae</i>	
4.3. SST3 des <i>Pseudomonas non pathogènes</i>	
5. Protéines chaperonnes	26
5.1. Définition et classification des protéines chaperonnes	
5.2. Protéines chaperonnes des bactéries pathogènes	
5.3. Protéines chaperonnes des <i>Pseudomonas non pathogènes</i>	
6. Régulation des gènes de SST3	28
6.1. Facteurs environnementaux	
6.2. Contact entre les cellules hôtes eucaryotes et les bactéries pathogènes	
6.3. Régulation transcriptionnelle de type Hrp-I	
6.4. Régulation transcriptionnelle de type Hrp-II	
6.5. Induction et régulation des gènes de SST3 des <i>Pseudomonas non pathogènes</i>	
7. Protéines sécrétées <i>via</i> le SST3	33
7.1. Protéines effectrices des bactéries pathogènes d'animaux	
7.2. Protéines effectrices des bactéries phytopathogènes	
7.3. Protéines effectrices des <i>Pseudomonas non pathogènes</i>	
8. Signal de sécrétion des protéines effectrices	36
9. Origine et évolution des SST3	36
9.1. Origine des SST3	
9.2. Evolution des SST3	
10. Conclusion	40

Tableau 1. Comparaison des différents types de systèmes de sécrétion chez les bactéries Gram-.

	Type I	Type II	Type III	Type IV	Type V			Type VI
					Va ou AT-1	Vb ou TPS	Vc ou AT-2	
Sec-dépendant	non	oui (ou Tat-dépendant)	non	non (oui- <i>Bordetella pertussis</i>)	oui	oui	oui	nd
Séquence signal terminale	non	oui	oui (signal non clivable)	oui/non	oui	oui	oui	nd
Nombre de gènes codant le système	3	12-16	20-25	≥ 11	1	2	1	12-25
Sécrétion contact-dépendante	non	non	oui	oui (non- <i>Bordetella pertussis</i>)	non	non	non	nd
Appendice de surface (référence)	non	(pilus de type IV)	pilus Hrp aiguille	pilus T pilus F	non	non	non	nd
Protéines sécrétées (référence)	HlyA	PulA Exotoxine (ETA) Phospholipase (Plc)	Harpines (HrpZ) protéines Avr	VirB Toxine pertussique (Ptx) ADNt	IgA1	ShlA FHA	YadA Hia	Hcp VgrG HIS-I
Localisation bactérienne	MI-ME	CP-MI-ME	CP-MI-ME	CP-MI-ME	PP-ME	PP-ME	PP-ME	nd
ATP-dépendante (ME)	oui	oui	oui	oui	non	non	non	nd

nd, donnée non disponible. CP, cytoplasme bactérien. MI, membrane interne bactérienne. ME, membrane externe bactérienne. PP, périplasme.

Synthèse bibliographique relative aux systèmes de sécrétion de type III des *Pseudomonas non pathogènes*

1. Introduction

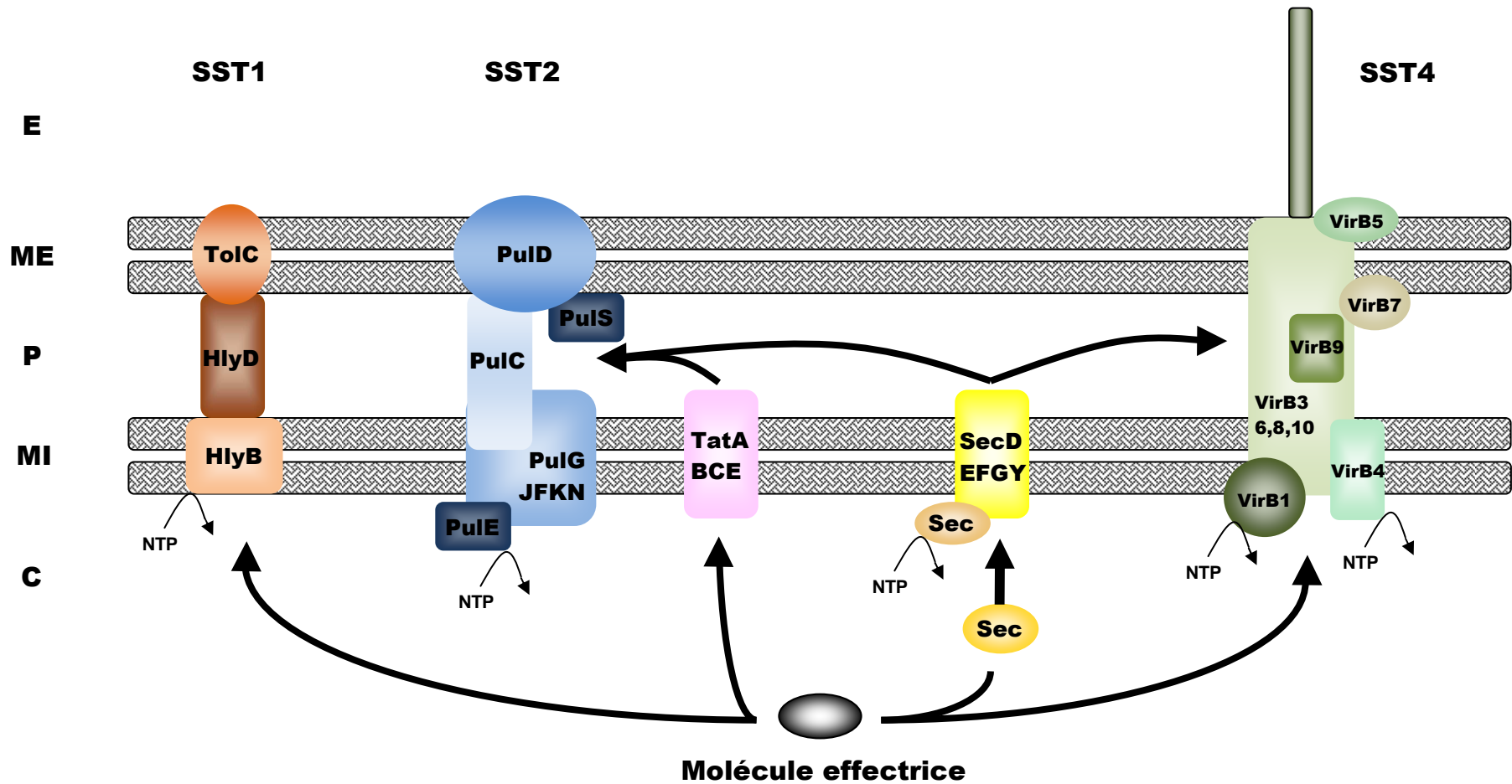
Les systèmes de sécrétion permettent le transport de macromolécules (protéines ou nucléoprotéines) entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur, à travers les membranes internes et externes des bactéries. Cinq types de systèmes de sécrétion sont couramment décrits chez les bactéries : type I (SST1), type II (SST2), type III (SST3), type IV (SST4) et type V (SST5). Ils sont classés selon leur composition en protéines, leurs similitudes en acides aminés et leurs mécanismes de fonctionnement (Baron et Coombes, 2007 ; Pallen *et al.*, 2003). Très récemment, un sixième type de système, SST6, a été décrit mais très peu de données le concernant sont encore disponibles (Bingle *et al.*, 2008 ; Filloux *et al.*, 2008). Les principales caractéristiques des différents systèmes de sécrétion sont présentées ci-dessous et résumées dans le tableau 1. Le SST3, objet principal de cette synthèse bibliographique, est considéré chez les *Pseudomonas* comme un facteur déterminant du pouvoir pathogène. Sa présence chez des bactéries non pathogènes a soulevé de nombreuses questions quant à son importance et son rôle. L'objectif de cette synthèse bibliographique, est de faire le point sur les connaissances actuelles concernant les SST3 des *Pseudomonas non pathogènes* en s'appuyant notamment sur les connaissances disponibles concernant les SST3 des bactéries pathogènes mieux étudiées, telles que le phytopathogène *P. syringae*.

2. Différents types de système de sécrétion

2.1. Système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I a une structure relativement simple et est composé de seulement trois sous-unités protéiques (Baron et Coombes, 2007 ; Fig. 1). Il est composé d'une protéine OMP (pour outer membrane protein) et d'une protéine MFP (pour membrane fusion protein). La protéine MFP forme un complexe dans l'espace périplasmique avec une protéine ABC (pour ATP-binding cassette ; Angkawidjaja et Kanaya, 2006).

Figure 1. Représentation schématique du système de sécrétion de type I, type II et type IV, d'après Henderson *et al.* (2004). Le SST1 (*Escherichia coli*) est composé de 3 protéines : ABC (HlyB) dans la membrane interne bactérienne (MI), MFP (HlyD) dans le périplasma (P) et OMP (TolC) dans la membrane externe bactérienne (ME). Les molécules effectrices sécrétées par le SST2 (*Klebsiella oxytoca*) sont tout d'abord transportées, du cytoplasme bactérien (C) vers le périplasma, par le système Sec ou Tat. Une fois dans le périplasma, les molécules effectrices sont sécrétées *via* le SST2 dans le milieu extracellulaire (E). Les molécules effectrices sont directement transportées par le SST4 (*Agrobacterium tumefaciens*) du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Le transport des molécules peut également se faire en deux étapes en passant tout d'abord par le système Sec (cas de *Bordetella pertussis*). Le SST4 est dépendant d'un contact avec les cellules hôtes et forme une structure de type 'pilus' qui traverse les deux membranes des cellules hôtes eucaryotes.



L' α -hémolysine (HlyA) de *Escherichia coli* est la première protéine découverte comme étant sécrétée par le SST1 (Goebel et Hedgpeth, 1982 ; Henderson *et al.*, 2004). Par ailleurs, ce système est connu pour être responsable de la sécrétion d'enzymes extracellulaires, comme par exemple, des protéases chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. syringae* pv. tomato DC3000 et *P. putida* KT2440 (Delepelaire, 2004).

2.2. Système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II consiste en un assemblage de 12 à 16 protéines différentes comprenant notamment une ATPase, une protéine chaperonne et une peptidase (Cianciotto, 2005 ; Filloux, 2004 ; Fig. 1). Le SST2 met en jeu d'autres systèmes de transport moléculaires et est appelé système Sec-dépendant et/ou Tat-dépendant. La sécrétion des protéines est un processus en deux étapes par lequel les protéines sont d'abord transférées à travers la membrane interne de la bactérie par les systèmes de transport Sec ou Tat (Cianciotto, 2005). Une fois dans le périplasma, les protéines sont ensuite transportées vers l'extérieur par le SST2 (Cianciotto, 2005). Le SST2 est un facteur important de virulence des bactéries pathogènes et sécrète des protéines dans l'environnement extracellulaire où elles sont capables de dégrader des composés des cellules hôtes, tels que des protéines, des lipides et des sucres de la matrice extracellulaire (Baron et Coombes, 2007 ; Cianciotto, 2005). Des ressemblances ont été observées entre l'architecture du SST2 et celle du pilus de type IV jouant un rôle dans la mobilité bactérienne et la formation de biofilm chez certaines bactéries (Baron et Combes, 2007 ; Mattick, 2002). En effet, des homologues de protéines constitutives du SST2 ont été identifiés chez le pilus de type IV à la surface des cellules de *P. aeruginosa* (Mattick, 2002 ; Peabody *et al.*, 2003).

Ce système de sécrétion a d'abord été découvert chez *Klebsiella pneumoniae* où il est impliqué dans la sécrétion d'une lipoprotéine, l'enzyme pullulanase (PulA ; d'Enfert *et al.*, 1987). Aujourd'hui, le SST2 de référence est celui de *K. oxytoca* également impliqué dans la sécrétion de la protéine PulA (Henderson *et al.*, 2004). Par ailleurs, ces systèmes sont, par exemple, responsables de la sécrétion d'enzymes pectiques et de cellulase par *Erwinia* (Hueck, 1998 ; Pallen *et al.*, 2003) et de phosphatases et de lipases par *P. aeruginosa* (Cianciotto, 2005).

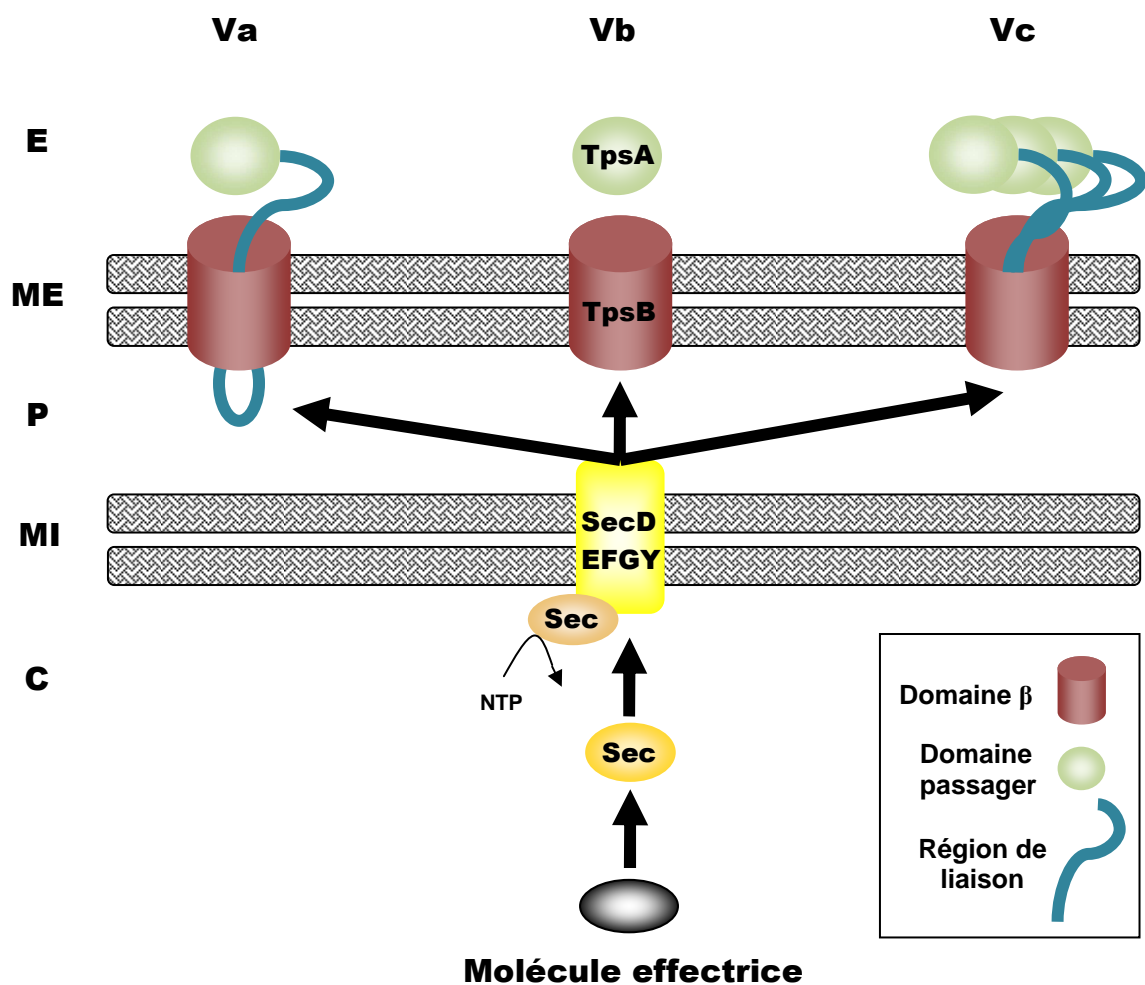
Le processus de sécrétion par l'intermédiaire du SST2 n'est pas dépendant de la présence des cellules hôtes (Baron et Coombes, 2007). En revanche, SST3 et SST4 sont dépendants d'un contact avec les cellules hôtes (Baron et Coombes, 2007) et présentent la particularité d'être impliqués dans des interactions cellulaires directes entre les bactéries et d'autres organismes vivants (Pallen *et al.*, 2003). Le SST3 est l'objet principal de ce travail de synthèse et sera présenté plus particulièrement ci-après.

2.3. Système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV n'est pas aussi largement distribué chez les bactéries Gram- que les autres types de systèmes de sécrétion (Pallen *et al.*, 2003) et la sécrétion des protéines *via* le SST4 est la moins bien comprise (Henderson *et al.*, 2004). Il s'agit d'un système protéique complexe composé d'au moins 11 protéines (Christie, 2001) qui, comme pour les SST3, forment une structure de type 'pilus' qui est capable de traverser les membranes des cellules eucaryotes. Le SST4 permet la sécrétion de complexes protéiques ou nucléoprotéiques à travers les membranes des bactéries, directement dans le cytosol des cellules eucaryotes (Ding *et al.*, 2003 ; Pallen *et al.*, 2003 ; Fig. 1). La sécrétion des molécules effectrices peut s'effectuer, soit directement par le SST4, soit en deux étapes, en passant tout d'abord par le système de transport Sec (Henderson *et al.*, 2004). La seule exception connue concerne le SST4 de *Bordetella pertussis* qui sécrète des toxines *via* le processus de translocation en deux étapes, en absence de contact avec les cellules hôtes (Baron et Coombes, 2007 ; Burns, 2003).

Le SST4 le plus anciennement décrit et le mieux connu est le système VirB d'*Agrobacterium tumefaciens* (Burns, 2003), pathogène induisant une tumeur chez la plante par transfert de son plasmide dans les cellules végétales après infection (Abajy *et al.*, 2007 ; Ding *et al.*, 2003). Il a été ainsi montré l'implication de ce système dans la virulence chez les bactéries pathogènes d'animaux et de végétaux (Foulongne *et al.*, 2002). D'une manière générale, les SST4 liés de façon ancestrale aux systèmes de conjugaison bactérienne (Backert et Meyer, 2006), contribuent à d'importants processus, tels que l'échange de matériel génétique (augmentation de la plasticité du génome), l'échange de plasmides au cours de la conjugaison (augmentation de la résistance aux antibiotiques), la colonisation bactérienne et

Figure 2. Représentation schématique du système de sécrétion de type V d'après Henderson *et al.* (2004). Il existe 3 formes différentes de SST5 : AT-1 ou autotransporteur (Va), TPS ou système à 2 protéines (Vb) et AT-2 ou autotransporteur trimérique (Vc). La sécrétion de protéines *via* ce système est Sec-dépendant et le transport des molécules effectrices se fait en deux étapes. Les protéines sont d'abord transférées du cytoplasme (C) vers le périplasm (P) par le système Sec à travers la membrane interne de la bactérie (MI). Les protéines sont ensuite transportées vers le milieu extracellulaire (E), à travers la membrane externe bactérienne (ME) par le SST5.



la formation de biofilm, et enfin, l'injection de facteurs de virulence dans le cytoplasme des cellules hôtes (Backert et Meyer, 2006).

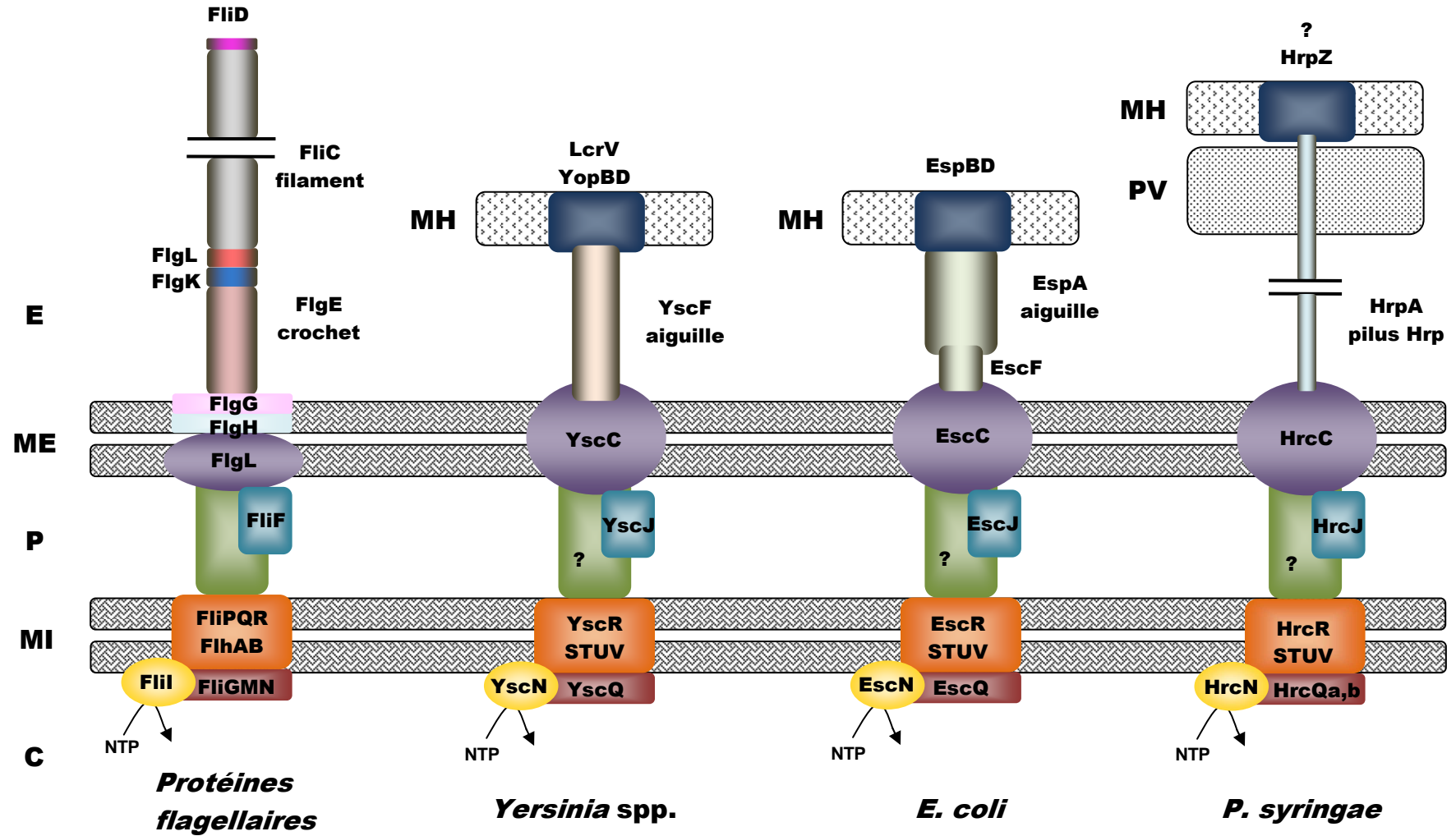
2.4. Système de sécrétion de type V

Le système de sécrétion de type V est Sec-dépendant et inclus les systèmes appelés autotransporteurs (AT) et les systèmes à deux partenaires (TPS pour two-partner secretion) (Henderson *et al.*, 2004 ; Yen *et al.*, 2002 ; Fig 2). Les AT sont constitués d'une seule protéine comprenant plusieurs domaines : un domaine β qui traverse la membrane externe bactérienne, un domaine extracellulaire appelé domaine 'passager' et une région de liaison située entre ces deux domaines (Henderson *et al.*, 2004). Les TPS diffèrent des AT, par l'absence de la région de liaison et dans ce cas, les domaines passager et β deviennent deux protéines indépendantes qui sont appelées respectivement TpsA ou exoprotéine et TpsB ou domaine transporteur (Henderson *et al.*, 2004 ; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001).

La protéase IgA1 chez *Neisseria gonorrhoeae*, est la première protéine identifiée comme étant sécrétée *via* un autotransporteur (Pohlner *et al.*, 1987). Les TPS peuvent être illustrés par la sécrétion de FHA (pour filamentous haemagglutinin) de *Bordetella pertussis*, qui est une adhésine majeure de surface (Brown et Parker, 1987). Le SST5 représente le système de sécrétion le plus simple (Baron et Coombes, 2007). Cependant, les protéines sécrétées par ce système constituent la plus large famille de facteurs de virulence chez les bactéries Gram- (Yen *et al.*, 2002) et les SST5 sont très largement distribués parmi les protéobactéries (Pallen *et al.*, 2003).

Plus récemment, les protéines de la famille OCA (pour oligomeric coiled coil adhesin), telles que YadA de *Yersinia enterocolitica* (Roggenkamp *et al.*, 2003) et Hia de *Haemophilus influenzae* (St-Geme et Cutter, 2000), ont été décrites comme des protéines sécrétées par un système identifié comme étant une sous-famille d'autotransporteurs. Actuellement, il existe donc deux familles d'autotransporteurs qui diffèrent de part la région qui relie les deux principaux domaines : le système AT-1 classique et le système trimérique AT-2 (Scott-Tucker et Henderson, 2009).

Figure 3. Représentation schématique du système flagellaire bactérien et du système de sécrétion de type III de *Yersinia*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas syringae*, d'après Tampakaki *et al.* (2004). Le SST3 permet la sécrétion de protéines, du cytoplasme de la bactérie (C), à travers la membrane interne (MI), le périplasma (P) et la membrane externe (ME). Le SST3, comme le SST4, est dépendant d'un contact avec les cellules hôtes. Le SST3 forme dans le milieu extracellulaire (E), une structure de type 'pilus' ou aiguille capable de traverser la paroi des cellules végétales (PV) et la membrane des cellules hôtes (MH).



2.5. Système de sécrétion de type VI

Récemment, un système de sécrétion de type VI de 12 à 25 protéines a été détecté chez plusieurs pathogènes, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Vivrio cholerae* (Bingle *et al.*, 2008 ; Filloux *et al.*, 2008). Ce système de sécrétion a été identifié et nommé en tant que SST6 par Pukatzki *et al.* (2006) chez *V. cholerae* avec la sécrétion des protéines Hcp et VgrG (gènes *VAS* pour virulence-associated secretion) et par Mougous *et al.* (2006) chez *P. aeruginosa* avec un appareil de sécrétion similaire codé par le locus *HIS-I*. Pourtant, l'existence de la sécrétion des protéines Hcp par *V. cholerae* a été observée dix ans avant que ce système soit identifié (Williams *et al.*, 1996). De même, chez *Rhizobium leguminosarum*, des travaux avaient montré qu'un locus chromosomique, nommé plus tard locus *imp* et relié aujourd'hui au SST6, affectait la nodulation des pois (Roest *et al.*, 1997). A l'heure actuelle, peu de choses sont connues concernant l'architecture et la fonction des SST6.

3. Système de sécrétion de type III

3.1. SST3 des bactéries pathogènes

Le système de sécrétion de type III est caractéristique des bactéries Gram-. Il est décrit comme un système de micro-injection de facteurs de virulence et permet la sécrétion de protéines du cytosol bactérien directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes hôtes (Cornelis, 2006 ; da Cunha *et al.*, 2007). D'abord décrits chez les pathogènes animaux du genre *Yersinia* (Michiels *et al.*, 1990 ; Fig. 3), puis *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella* et *Salmonella*. Les SST3, très conservés, ont également été découverts chez les phytopathogènes tels que *Erwinia*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* et *Xanthomonas* (Büttner et Bonas, 2006 ; Cornelis, 2006 ; He *et al.*, 2004). La première structure filamenteuse associée aux SST3 d'une bactérie phytopathogène a été découverte chez *P. syringae* (Roine *et al.*, 1997).

3.2. SST3 des bactéries non pathogènes

Plus récemment, et en grande partie grâce au développement de la génomique, des SST3 ont été décrits chez des bactéries symbiotiques d'animaux. *Photorhabdus luminescens*, un endosymbiote d'un nématode pathogène et *Sodalis glossinidius* et SZPE (pour *Sitophilus*

zeamais primary endosymbiont), deux endosymbiotes d'insectes sont ainsi porteurs de SST3 (Dale et Moran, 2006).

La majorité des travaux rapportant la présence de SST3 chez des bactéries non pathogènes concerne des bactéries d'origine tellurique. Des espèces telluriques n'impliquant aucune pathogénie, telles que *Desulfovibrio vulgaris* (réductrice de sulfate), *Myxococcus xanthus*, *Verruimicrobium spinosum* et des bactéries du genre *Burkholderia*, possèdent ainsi un SST3 dont le rôle reste encore inconnu (Pallen *et al.*, 2005). Plus récemment, la présence d'un gène de SST3 a été identifiée chez d'autres souches du genre *Burkholderia* (Warminck et van Elsas, 2008).

Le séquençage total d'un plasmide de grande taille portant les gènes nécessaires à la mise en place et au fonctionnement d'une symbiose fixatrice d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses a d'abord permis de mettre en évidence un SST3 chez *Sinorhizobium* sp. NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997). Depuis, des SST3 ou des séquences homologues à des gènes codant des SST3 ont été décrits chez d'autres souches de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote atmosphérique, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Göttfert *et al.*, 2001 ; Krause *et al.*, 2002), *Sinorhizobium fredii* HH103 (de Lyra *et al.*, 2000) et USDA257 (Meinhardt *et al.*, 1993). Par la suite, des travaux ont montré que des séquences codantes de SST3 ne sont pas seulement présentes chez *B. japonicum* USDA110 mais chez toutes les souches de *Bradyrhizobium* isolées du soja (Mazurier *et al.*, 2006). Un SST3 a également été détecté récemment chez *Rhizobium etli* (González *et al.*, 2006).

3.3. SST3 des *Pseudomonas* non pathogènes

Des SST3 ou des séquences homologues à des gènes codant des SST3 ont également été décrits chez des bactéries non symbiotiques appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents et connues pour être non pathogènes voire bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes.

Un SST3 a été détecté chez *P. fluorescens* PflG32R (Mulya *et al.*, 1996). Cette souche, isolée de la rhizosphère de plantes de la famille des *Solanaceae* et de l'oignon, est capable de

supprimer l'établissement de la BWT (pour bacterial wilt disease of tomato ; Ogiso *et al.*, 1991). Il a également été montré que PfG32R est capable de produire une large variété d'antibiotiques et de sidérophores (Mulya *et al.*, 1992).

La présence de séquences d'ADN caractéristiques du SST3 a été mise en évidence par Mazurier *et al.* (2000 et 2004) chez *P. fluorescens* C7R12, une bactérie mutualiste connue pour ses effets bénéfiques sur la croissance et la santé des plantes. C7R12 possède des propriétés antagonistes de pathogènes d'origine tellurique, tels que *Fusarium oxysporum* responsable de la fusariose vasculaire (Lemanceau et Alabouvette, 1991) et *Pythium ultimum* provoquant des nécroses de la racine (données non publiées). Sanchez *et al.* (2005) ont montré que C7R12 était capable d'induire un effet de type PGPR par la mise en évidence d'une promotion de croissance sur des plantules de *Medicago truncatula*. Plus récemment, Pivato *et al.* (2009) ont montré que cette bactérie possédait également des propriétés promotrices de la mycorhization et pouvait donc être considérée comme une bactérie MHB.

La recherche de gènes de *P. fluorescens* SBW25 dont l'expression est induite dans la rhizosphère a permis à Rainey (1999) et Preston *et al.* (2001) de mettre en évidence la présence d'un SST3 chez cette bactérie. SBW25 est une bactérie à effet PGPR et possède des propriétés antagonistes de pathogènes. Cette bactérie est capable d'inhiber la croissance du phytopathogène *P. ultimum* (Ellis *et al.*, 2000).

Des travaux de Mazurier *et al.* (2004) ont montré que près de la moitié des souches d'une collection de *Pseudomonas* spp. fluorescents saprotrophes isolée de la rhizosphère possédait des gènes caractéristiques de la présence d'un SST3. Rezzonico *et al.* (2004) ont également décrit la présence d'un gène de SST3 chez de nombreuses souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents de la rhizosphère. Ces souches comprenaient des bactéries non pathogènes saprotrophes, mais aussi des agents potentiels de lutte biologique, tels que *P. fluorescens* F113, Pf1 et KD. Notamment, *P. fluorescens* KD, est une souche connue pour être capable de protéger les plantes contre des pathogènes : le concombre contre *P. ultimum* et la tomate contre *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998). Plus récemment, un gène marqueur de SST3 a été identifié chez plusieurs *Pseudomonas* non pathogènes, tels que *P. poae* BS053, isolés de la mycosphère de champignons ectomycorhizogènes (Warmink *et al.*, 2008 ; Warmink et van Elsas, 2008). Ces différents

Tableau 2. Présentation des différentes familles de SST3 des bactéries Gram- d'après Foulter *et al.* (2002) et Sorg et Cornelis (2009).

Famille	Principales espèces bactériennes	Description des espèces bactériennes
Ysc	<i>Yersinia pestis</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Photobacterium luminescens</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Pathogène de l'Homme et de rongeurs Pathogène de l'Homme et de rongeurs Pathogène de l'Homme Pathogène d'animaux Pathogène de poissons Mutualiste de nématodes Pathogène de l'Homme Pathogène de l'Homme Bactérie réductrice de sulfate
Chlamydiales	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	Pathogène de l'Homme intracellulaire Pathogène de l'Homme intracellulaire
Rhizobium	<i>Mesorhizobium loti</i> <i>Rhizobium</i> sp.	Symbiote de plante fixateur d'azote Symbiote de plante fixateur d'azote
Hrp-I	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>Erwinia amylovora</i> <i>Pantoea agglomerans</i> (anciennement <i>Enterobacter agglomerans</i>) <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Phytopathogène Phytopathogène Commensal de l'Homme et de l'environnement (rarement pathogène) Pathogène de l'Homme
Hrp-II	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Xanthomonas campestris</i>	Pathogène de l'Homme Phytopathogène Phytopathogène
SPI-I Inv-Mxi-Spa	<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium <i>Shigella flexneri</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Sodalis glossinidius</i>	Pathogène de l'Homme Pathogène de l'Homme Pathogène de l'Homme Pathogène de l'Homme émergent Pathogène de l'Homme Symbiote de la mouche tsé-tsé
SPI-II Esc-Ssa	EPEC (enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>) EHEC (enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>) <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium <i>Citrobacter rodentium</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Edwardsiella tarda</i>	Pathogène de l'Homme Pathogène de l'Homme Pathogène de l'Homme Pathogène de la souris Pathogène de l'Homme émergent Pathogène de l'Homme et de rongeurs Pathogène de l'Homme et de rongeurs Pathogène de l'Homme

travaux mettent en évidence une forte représentation des séquences homologues aux gènes codant les SST3 au sein du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol.

4. Organisation génétique et structure du SST3

4.1. SST3 des bactéries pathogènes

Chez les bactéries Gram- pathogènes d'animaux et de végétaux, les gènes codant les SST3 sont regroupés dans un cluster d'environ 20 à 25 gènes (Tampakaki *et al.*, 2004). Chez les phytopathogènes, les SST3 sont codés par des gènes du cluster *hrp* (pour HR and pathogenicity ; Bogdanove *et al.*, 1996). En effet, la présence des SST3 est nécessaire (i) à l'expression du pouvoir pathogène et la maladie chez les plantes hôtes ou sensibles mais aussi (ii) à l'observation d'une HR chez les plantes non hôtes ou résistantes (Büttner et He, 2009 ; Lindgren *et al.*, 1986). La HR est une réaction rapide de défense de la plante induisant la mort programmée des cellules et la production de divers agents antimicrobiens bloquant ainsi la progression du pathogène (Klement 1982 ; Hueck 1998).

Neuf des gènes *hrp* sont très conservés parmi les bactéries pathogènes d'animaux et de végétaux et sont appelés gènes *hrc* (pour *hrp* conservés ; Bogdanove *et al.*, 1996). Les analyses phylogénétiques des gènes conservés permettent de classer les différents SST3 en sept familles différentes (Sorg et Cornelis, 2009 ; Tab. 2). Les clusters *hrp* de *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans* et *Vibrio parahaemolyticus* constituent un premier groupe de clusters : les clusters de la famille Hrp-I. Un deuxième groupe rassemble les clusters *hrp* de *Burkholderia pseudomallei*, *Ralstonia solonacearum* et *Xanthomonas campestris*, correspondant aux clusters de la famille Hrp-II. Les deux familles de clusters Hrp-I et Hrp-II, ont été établies à partir de l'organisation génétique des régions *hrp*, des séquences nucléotidiques des gènes *hrp* et des systèmes de régulation des gènes *hrp*.

4.2. SST3 du phytopathogène *Pseudomonas syringae*

Les gènes conservés codent les neuf protéines Hrc qui constituent le corps basal du SST3. Les protéines constitutives du corps basal du phytopathogène *P. syringae* sont présentées dans le tableau 3. L'assemblage du corps basal permet le passage des protéines du

Tableau 3. Comparaison des neuf protéines constitutives du corps basal du système flagellaire bactérien et du système de sécrétion de type III d'après He *et al.* (2004) et Tampakaki *et al.* (2004).

Protéines flagellaires	<i>Yersinia</i> spp.	<i>E. coli</i> (EPEC)	<i>P. syringae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> (SPI-I)	<i>Shigella flexneri</i>
FliN / FliY	YscQ	EscQ	HrcQa,b	PscQ	SpaO	Spa33
FliI	YscN	EscN	HrcN	PscN	InvC	Spa47
FliP	YscR	EscR	HrcR	PscR	SpaP	Spa24
FliQ	YscS	EscS	HrcS	PscS	SpaQ	Spa9
FliR	YscT	EscT	HrcT	PscT	SpaR	Spa29
FlhB	YscU	EscU	HrcU	PscU	SpaS	Spa40
FlhA	YscV	EscV	HrcV	PcrD	InvA	MxiA
FliF	YscJ	EscJ	HrcJ	PscJ	PrgK	MxiJ
(FlgI-FlgH-FlgG)	YscC	EscC	HrcC	PscC	InvG	MxiD

Les protéines se trouvant sur une même ligne présentent de fortes similarités de séquences sauf pour les protéines flagellaires FlgI, FlgH et FlgG qui ne présentent pas d'homologues chez les différentes bactéries présentées.

cytosol bactérien au milieu extracellulaire, à travers la membrane interne, le périplasme et la membrane externe de la bactérie (Cornelis et van Gijsegem, 2000 ; He *et al.*, 2004 ; Tampakaki *et al.*, 2004). La protéine HrcC du corps basal, est un polymère constitué d'un assemblage de plusieurs protéines qui forme un anneau permettant le passage des molécules effectrices à travers la membrane externe de la bactérie. La protéine HrcJ se trouve dans le périplasme. L'assemblage des protéines HrcR, S, T, U et V, forme un anneau de transport dans la membrane interne bactérienne. HrcQa,b et N sont des protéines cytoplasmiques. HrcN est une ATPase permettant la libération d'énergie nécessaire à la sécrétion (Tampakaki *et al.*, 2004). Huit de ces protéines (toutes sauf HrcC) possèdent de fortes similarités de séquence avec les protéines des structures flagellaires (He, 1998). La protéine HrcC est une protéine homologue de la protéine PulD des SST2 et de la protéine pIV de coliphages filamenteux (Huang *et al.*, 1992 ; Lin *et al.*, 2006).

Certains gènes du cluster *hrp* des phytopathogènes codent les protéines constituant la partie extracellulaire du SST3 ou appareil de translocation, tels que les gènes *hrpO*, *hrpJ*, *hrpA* et *hrpZ*. Les protéines le constituant sont parfois considérées comme des protéines sécrétées ne faisant pas partie du système de sécrétion en lui-même (He et Jin, 2003 ; Pallen *et al.*, 2005). L'appareil de translocation est constitué de deux parties, un pilus nommé pilus Hrp chez les phytopathogènes ou aiguille chez les pathogènes d'animaux et une partie nommée translocon qui permet l'ancrage et le passage à travers les enveloppes de la cellule de l'hôte eucaryote (Büttner et Bonas, 2002 ; He et Jin, 2003). Les protéines composant ces parties sont différentes selon les espèces (He et Jin, 2003). Chez *P. syringae*, le pilus est constitué par les protéines HrpA qui s'assemblent entre elles en dimères, eux-mêmes assemblés selon une structure en hélice (He et Jin, 2003). Le translocon est constitué par la protéine HrpZ aussi appelée harpine (He et Jin, 2003). Les harpines possèdent la capacité d'induire la réaction hypersensible lorsqu'elles sont infiltrées dans des plantes non hôtes (Collmer, 1998). La différence structurale entre les SST3 des pathogènes d'animaux et de végétaux se fait essentiellement par cet appareil de translocation. On observe ainsi une différence de longueur entre l'aiguille (80 nm) et le pilus Hrp (200 nm) car l'appareil de translocation des phytopathogènes doit traverser la paroi végétale en plus de la membrane cytoplasmique (Büttner et Bonas, 2003 ; Büttner et He, 2009). Il est à noter que ces différences de construction primaire (nature des protéines constitutives) doivent refléter une adaptation des bactéries pour contourner sans cesse la surveillance de l'hôte (He et Jin, 2003).

Figure 4. Comparaison de l'organisation du cluster *rsp* de *P. fluorescens* SBW25 avec le cluster *hrp* de *P. syringae* pv. *syringae* 61 d'après Preston *et al.* (2001). La longueur des opérons a été déterminée approximativement d'après l'échelle et est indiquée en kilo-paires de bases. Les flèches noires indiquent l'organisation des différents opérons.

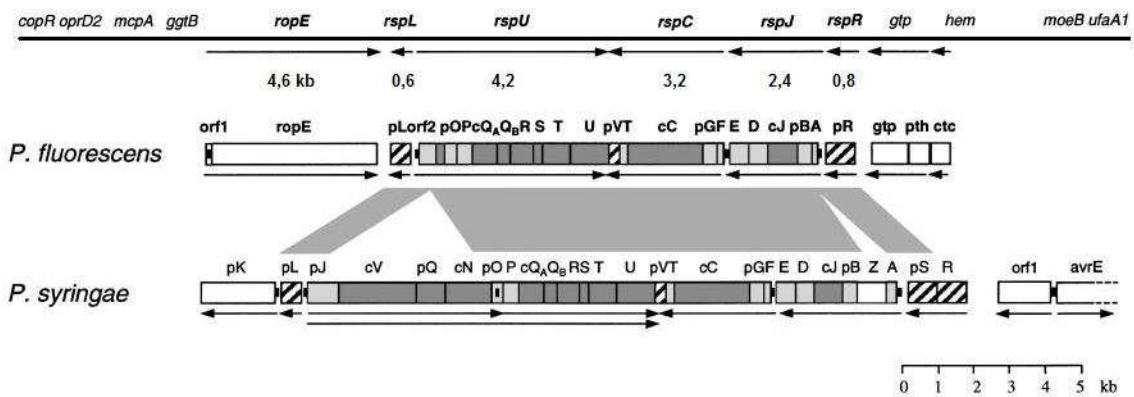
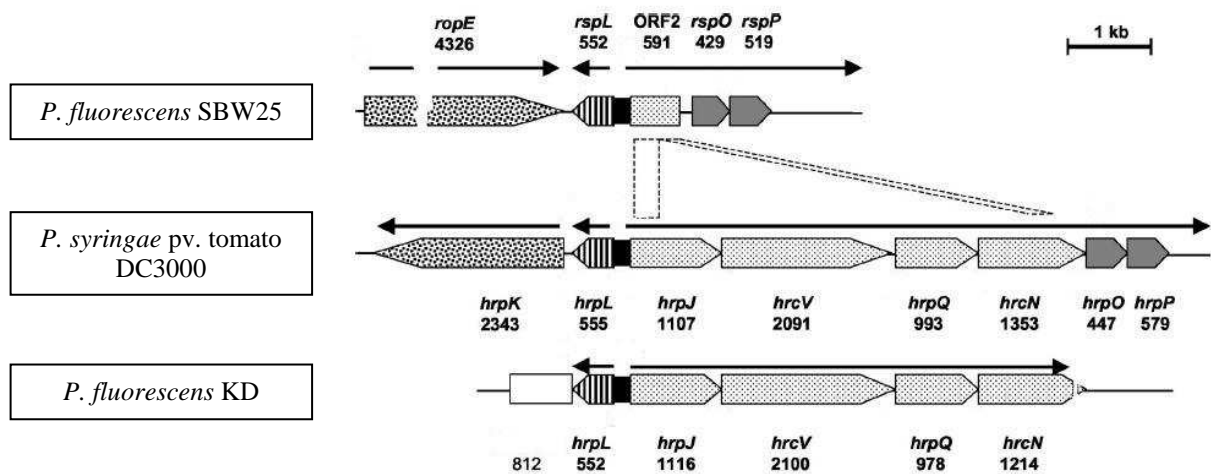


Figure 5. Comparaison de l'organisation du cluster *hrp* de *P. fluorescens* KD avec le cluster *hrp* de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 d'après Rezzonico *et al.* (2004). La longueur des gènes est indiquée en paires de bases et les flèches noires indiquent l'organisation des différents opérons.



Outre les gènes codant l'appareil de translocation, le cluster *hrp* des phytopathogènes contient également d'autres gènes, plus variables selon les espèces, et dont les fonctions, liées au du système sécrétoire, sont moins bien connues. Certains d'entre eux sont impliqués dans la régulation des gènes codant le SST3 (Alfano *et al.*, 2000).

4.3. SST3 des *Pseudomonas non pathogènes*

Des séquences complètes des gènes codant les SST3 pour *P. fluorescens* SBW25 sont disponibles (Jackson *et al.*, 2005 ; Preston *et al.*, 2001 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). Preston *et al.* (2001) ont comparé l'organisation du cluster *hrp* d'une souche de *Pseudomonas* pathogène, *P. syringae* pv. *syringae* 61, avec celle de SBW25 (Fig. 4). Les ORF (pour open reading frame) de SBW25 ayant un fort degré de similarité avec les gènes *hrp* de *P. syringae* ont été nommés *rsp* (pour rhizosphere-expressed secretion). Il a été montré que le cluster *rsp* de SBW25 présentait de fortes homologues avec le cluster *hrp* de *P. syringae*. En effet, l'arrangement et l'orientation des ORF de SBW25 sont très proches de ce qui a été décrit chez *P. syringae* pv. *syringae* 61. Toutefois, 4 différences principales ont été observées. Ainsi, une partie importante de l'opéron *hrcV* ainsi que l'intégralité de *hrpZ* du cluster *hrp* de *P. syringae* ne possèdent pas d'équivalent au sein du cluster *rsp* de *P. fluorescens* SBW25. De même, SBW25 ne possède qu'un seul homologue de régulateurs de réponse (*rspR*), au lieu de *hrpR* et *hrpS* chez *P. syringae*. Enfin, sur le cluster *rsp*, *ropE* se trouve à une localisation totalement opposée de son homologue *avrE* chez *P. syringae*.

Seule une partie du cluster *hrp* est disponible pour *P. fluorescens* KD correspondant à une séquence de 4499 bp allant de *hrpJ* à *hrcN* (Rezzonico *et al.*, 2004). Cette portion du cluster *hrp* de *P. fluorescens* KD est très similaire à la portion correspondante du cluster *hrp* de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Fig. 5). L'intégralité des gènes de SST3 détectés chez *P. fluorescens* KD (*hrpJ*, *hrcV*, *hrpQ*, et *hrcN* ; Rezzonico *et al.*, 2004) est organisée comme chez d'autres pathogènes de plantes tels que *Erwinia amylovora* Ea321 (Bogdanove *et al.*, 1998) et *P. syringae* pv. *syringae* 61 (Alfano *et al.*, 2000).

Pour d'autres souches de *P. fluorescens* saprotrophes ou bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes, différentes séquences ont été décrites dans diverses études, mais elles ne

Figure 6. Représentation de la succession des gènes *hrcR*, *S* et *T* de *P. fluorescens* C7R12 amplifiés par PCR avec le couple d'amorces HRCR8092 et HRCT8986 d'après Mazurier *et al.* (2004). La séquence d'ADN amplifiée correspond à un fragment de 897 paires de bases.

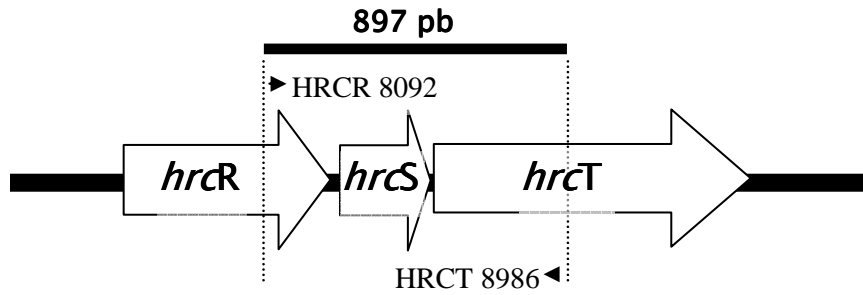
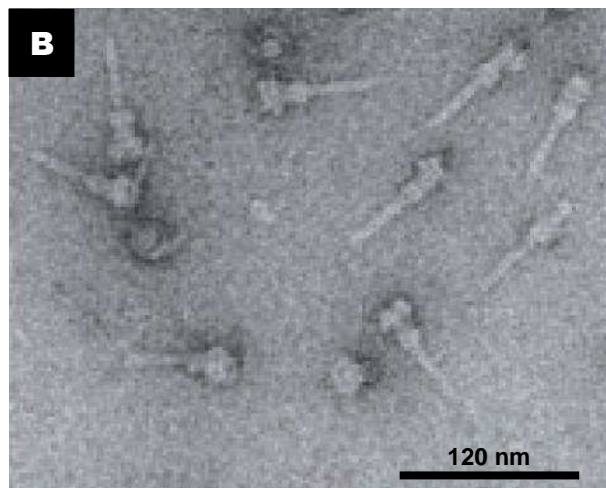
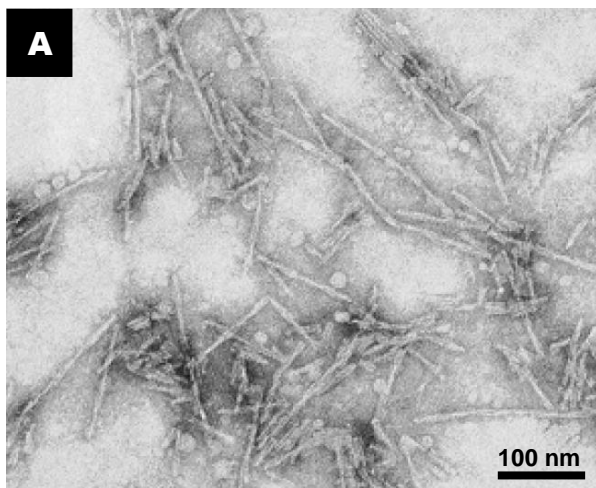


Figure 7. Images obtenues par microscopie électrique. Observation par Krishnan *et al.* (2003) d'appendices s'apparentant à des pili chez *Sinorhizobium fredii* USDA257 (A) ressemblant fortement à l'aiguille du système de sécrétion de type III observée par Enninga et Rosenshine (2009) chez *Shigella flexneri* (B).



concernent qu'un nombre réduit des gènes codant les SST3 et ne permettent pas de comparer leur organisation. Mulya *et al.* (1996) ont montré par hybridation, que *P. fluorescens* PfG32R possédait des séquences présentant de fortes homologues avec plusieurs régions du cluster *hrp* de phytopathogènes : *hrpRS* et *hrpF* de *P. syringae* pv. phaseolicola (signaux de forte intensité) et *hrpC* et *hrpD* de *P. syringae* pv. tabaci (signaux d'intensité moyenne). Des études ont permis de détecter par PCR et hybridation, la présence des gènes *hrcR* (partiel), *hrcS*, et *hrcT* (partiel) chez *P. fluorescens* C7R12 et F113 (Mazurier *et al.*, 2004 ; Fig. 6). Il est intéressant de noter que la succession des gènes *hrcRST*, caractéristique des clusters *hrp* de la famille Hrp-I décrits pour les *Pseudomonas* pathogènes (Hueck, 1998) a été retrouvée chez un grand nombre de *Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes (*P. fluorescens* et *P. putida* ; Mazurier *et al.*, 2004). Une séquence partielle du gène *hrcN* a été détectée chez *P. fluorescens* F113, KD, Pf1 et d'autres souches de *Pseudomonas* non pathogènes (Rezzonico *et al.*, 2004). Une séquence partielle du gène *hrcR* a également été détecté par PCR chez plusieurs bactéries cultivables et notamment, chez *P. fluorescens* SBW25 et *P. poae* BS053 (Warmink *et al.*, 2008 ; Warmink et van Elsas, 2008).

L'organisation structurale du SST3 des bactéries telluriques non pathogènes du sol est encore mal connue. Très peu d'études portent sur la structure de l'appareil de sécrétion des *Pseudomonas* non pathogènes et aucun SST3 n'a encore été visualisé en microscopie chez ces bactéries. Chez les pathogènes, au contraire, le SST3 a déjà été observé en microscopie comme par exemple, l'aiguille du SST3 du pathogène d'animaux *Shigella flexneri* (Enninga et Rosenshine, 2009 ; Fig. 7). Seuls à ce jour les pili de *Sinorhizobium fredii* USDA257 et *Sinorhizobium* sp. NGR234 ont été observés par microscopie électronique (Krishnan *et al.*, 2003 ; Saad *et al.*, 2005) pour des bactéries non pathogènes interagissant avec les plantes. L'observation de *S. fredii* USDA257 en microscopie électronique révèle la présence de plusieurs appendices s'apparentant à des pili d'un diamètre plus mince que les flagelles compris entre 6 et 8 nm (Krishnan *et al.*, 2003). L'observation de la surface de *Sinorhizobium* sp. NGR234 a permis de visualiser avec plus de certitude des pili de type Hrp (Saad *et al.*, 2005). Comme rapporté précédemment, les gènes codant les protéines structurales de l'appareil de sécrétion sont conservés entre pathogènes (animaux et végétaux) et non pathogènes. Ces observations tendent à nous conforter dans l'idée que l'appareil de sécrétion des *Pseudomonas* non pathogènes pourrait être très proche, voire identique dans sa

forme, à celui des pathogènes. Néanmoins ce point reste à étudier d'autant plus que l'aspect du pilus peut orienter sur le type d'hôte avec lequel les bactéries sont capables d'interagir.

5. Protéines chaperonnes

5.1. Définition et classification des protéines chaperonnes

Les chaperonnes associées aux SST3 sont des protéines bactériennes acides ($pI < 5$) de petite taille (15 kDa) qui ne présentent pas de fortes similarités de séquences entre elles (Tampakaki *et al.*, 2004). Elles ne sont jamais exportées à l'extérieur de la cellule bactérienne et sont susceptibles d'être recyclées (Sorg et Cornelis, 2009). Chez les bactéries pathogènes, l'assemblage et le fonctionnement des SST3 requièrent l'assistance de ces protéines chaperonnes (Sorg et Cornelis, 2009). En effet, il a été montré que les chaperonnes étaient indispensables pour le fonctionnement des SST3 et que sans elles, la sécrétion des molécules effectrices *via* le SST3 était réduite ou impossible (Pallen *et al.*, 2005). Les chaperonnes se lient aux protéines sécrétées et évitent que celles-ci soient dégradées et qu'elles s'agrègent entre elles ou avec d'autres protéines (Page et Parsot, 2002 ; Pallen *et al.*, 2005). Il a été montré que les chaperonnes pourraient intervenir pour faciliter le passage de grosses molécules à travers le pilus des SST3 (Akeda et Galán, 2005).

Les chaperonnes sont regroupées en 3 catégories selon les protéines auxquelles elles se fixent (Parsot *et al.*, 2003 ; Sorg et Cornelis, 2009 ; Tampakaki *et al.*, 2004). Les chaperonnes de type I assistent les protéines effectrices et sont capables de se lier à une (type Ia) ou plusieurs protéines (type Ib) (Tampakaki *et al.*, 2004). Malgré l'absence de similarités de séquences, toutes les chaperonnes de la classe Ia montrent des structures vraiment similaires (Parsot *et al.*, 2003). Les protéines constitutives de l'appareil de translocation peuvent être toxiques pour les cellules bactériennes. Les protéines chaperonnes de type II se fixent préférentiellement à ces protéines permettant de neutraliser leur toxicité (Neyt et Cornelis, 1999). Les chaperonnes de type III se lient aux sous-unités protéiques et masquent les domaines impliqués dans les phénomènes de polymérisation prématurée qui doivent être évités lors de l'assemblage des structures extracellulaires, telles que l'aiguille des SST3 chez les pathogènes (Sorg et Cornelis, 2009).

Tableau 4. Chaperonnes des *Pseudomonas* pathogènes et non pathogènes d'après He *et al.* (2004) et Büttner et Bonas (2006).

Chaperonne	Protéine	Type*	Contribution à la sécrétion stabilité		Référence
<i>P. aeruginosa</i>					
PcrH	PopB	II	+	+	Broms <i>et al.</i> , 2003 ; Faudry <i>et al.</i> , 2007 ; Job <i>et al.</i> , 2010
	PopD		+	+	
PscE-PscG [≈]	PscF	III	+	+	Quinaud <i>et al.</i> , 2005 et 2007 ; Plé <i>et al.</i> , 2010
SpcS (Orf1)	ExoS	nd	+	+	Shen <i>et al.</i> , 2008 ; Yahr <i>et al.</i> , 1995
	ExoT		+	nd	
SpuC	ExoU	nd	+	nd	Finck-Barbançon <i>et al.</i> , 1998
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>					
ShcA	HopPsyA	Ia	+	-	van Dijk <i>et al.</i> , 2002
ShcB1	HopPsyB1	Ia	nd	+	Losada et Hutcheson, 2005
HrpG [∞]	HrpV [#]	nd	-	-	Wei <i>et al.</i> , 2005
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>					
AvrF (CEL ORF2)	AvrE	Ia	nd	nd	Bogdanove <i>et al.</i> , 1998 ; van Dijk <i>et al.</i> , 2002
ShcS1 [§]	HopS1	Ia [∇]	+	nd	Guo <i>et al.</i> , 2005 ; Kabisch <i>et al.</i> , 2005
	HopO1-1		+	-	
	HopO1-2		nd	nd	
ShcS2 [§]	HopS1	Ia [∇]	nd	nd	Guo <i>et al.</i> , 2005
	HopS2		nd	nd	
	HopO1-1		+	+	
	HopO1-2		nd	nd	
ShcO1 [§]	HopS1	Ia [∇]	+	+	Guo <i>et al.</i> , 2005 ; Kabisch <i>et al.</i> , 2005
	HopS2		nd	nd	
	HopO1-1		+	+	
	HopO1-2		nd	nd	
ShcF	HopF	Ia	-	+	Shan <i>et al.</i> , 2004
ShcV	HopPtoV	Ia	+	+	Losada et Hutcheson, 2005 ; Wehling <i>et al.</i> , 2004
ShcM	HopPtoM	Ia	+	+	Badel <i>et al.</i> , 2003 ; Losada et Hutcheson, 2005

nd, donnée non disponible. *, classification d'après Sorg et Cornelis (2009). ∞, HrpG est une chaperonne putative de régulation. §, chaperonnes homologues. #, HrpV n'est pas une protéine sécrétée par le SST3. ≈, PscE est une co-chaperonne nécessaire au bon fonctionnement de PscG. ∇, en contraste avec les chaperonnes de type Ia, ShcS et ShcO se lient à plusieurs protéines effectrices différentes qui ne présentent pas d'homologies de séquence significatives, mais comme elles sont codées dans le voisinage de leurs partenaires, elles sont regroupées avec les chaperonnes de type Ia.

5.2. Protéines chaperonnes des bactéries pathogènes

Les principales chaperonnes connues chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, pathogènes d'animaux et de végétaux, sont décrites et résumées dans le tableau 4. Concernant les pathogènes d'animaux, nous avons choisi de décrire deux chaperonnes importantes identifiées chez *P. aeruginosa*. Chez cette bactérie, il existe deux protéines membranaires impliquées dans la formation du translocon du système de sécrétion : PopB et PopD (Faudry *et al.*, 2006 ; Schoehn *et al.*, 2003). La chaperonne de type II, PcrH de *P. aeruginosa*, est responsable de la reconnaissance et de la stabilisation de ces deux protéines constitutives (Faudry *et al.*, 2007 ; Job *et al.*, 2010). PcrH forme un complexe avec ces protéines partenaires et la stabilité de cette interaction doit être strictement maintenue pour garantir la capacité d'infection de la bactérie (Job *et al.*, 2010). Avant la sécrétion et la polymérisation à l'extérieur de la cellule bactérienne de PscF, une protéine constitutive de l'aiguille du SST3 de *P. aeruginosa*, celle-ci est maintenue dans sa forme monomérique à l'intérieur du cytoplasme bactérien par une chaperonne bimoléculaire de type III, PscE-PscG (Quinaud *et al.*, 2005 et 2007). PscE est une co-chaperonne qui interagit directement avec la chaperonne principale PscG et assure la stabilité de cette dernière (Plé *et al.*, 2010). Le complexe PscF-PscE-PscG est nécessaire pour la formation de l'aiguille et la cytotoxicité de la bactérie (Quinaud *et al.*, 2007).

La plupart des chaperonnes de SST3 des bactéries pathogènes de végétaux ont été identifiées chez *Erwinia amylovora* et *P. syringae* (famille Hrp-I des bactéries pathogènes) comme étant des chaperonnes de type Ia (Büttner et Bonas, 2006 ; Tab. 4). HrpG de *P. syringae* pv. *syringae* est un cas particulier de chaperonne putative de régulation qui se lie et inhibe l'activité de la protéine cytoplasmique HrpV (Wei *et al.*, 2005). HrpV est un régulateur négatif qui réprime l'expression du cluster *hrp* (Preston *et al.*, 1998). Ces protéines chaperonnes participent à la mise en place de cascades de régulation complexes.

5.3. Protéines chaperonnes des *Pseudomonas non pathogènes*

Actuellement, nous ne disposons d'aucune donnée concernant les protéines chaperonnes chez les bactéries non pathogènes telles que les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

6. Régulation des gènes de SST3

6.1. Facteurs environnementaux

Les conditions environnementales peuvent influencer l'expression des gènes de SST3. L'expression des gènes codant les SST3 de pathogènes peut être induite par la variation de différents facteurs environnementaux, tels que la température, le pH, l'osmolarité et la disponibilité des nutriments ou des cations divalents (Francis *et al.*, 2002 ; Galán et Collmer, 1999 ; He *et al.*, 2004 ; Hueck, 1998 ; Tang *et al.*, 2006). Il a été montré *in vitro*, à l'aide de milieux de culture synthétiques, que les conditions d'expression des gènes codant les SST3 des bactéries pathogènes correspondent aux conditions spécifiques rencontrées chez l'hôte durant l'infection (Hueck, 1998). L'expression des gènes de SST3 chez les bactéries phytopathogènes est réprimée dans un milieu synthétique riche et induite dans un milieu minimum. Les milieux inducteurs des gènes de SST3 sont acides, pauvres en nutriments et contiennent certains sucres comme source de carbone, comme par exemple le milieu minimum de Huynh *et al.* (1989). Les facteurs influençant l'expression des gènes de SST3 des milieux inducteurs diffèrent selon les pathogènes et reflètent les diverses conditions apoplasmiques pouvant être rencontrées chez des espèces distinctes de plantes hôtes. Par exemple, la nature de la source de carbone joue un rôle important dans l'activation des gènes de SST3 notamment chez *Ralstonia solanacearum* (Arlat *et al.*, 1992). Le fructose et le saccharose sont apparus être les meilleurs inducteurs chez *P. syringae* parmi différentes sources de carbone testées (Huynh *et al.*, 1989). Le mannitol et le fructose induisent l'expression du gène *avrB* chez *P. syringae* pv. *glycinea* (Huynh *et al.*, 1989).

Rahme *et al.* (1992) ont montré que l'expression du gène *hrpL* de *P. syringae* pv. *phaseolicola* est plus forte *in planta* que l'expression du gène lorsque la bactérie est cultivée dans un milieu synthétique inducteur. Ces résultats montrent qu'il ne suffit pas de recréer les conditions physico-chimiques des cellules hôtes pour induire l'expression des gènes de SST3. En effet, chez les plantes, il existe d'autres facteurs qui régulent l'expression des gènes de SST3 des bactéries. Par exemple, l'expression du gène *att1*, chez *Arabidopsis*, réprime l'expression des gènes de SST3 de *P. syringae* (Xiao *et al.*, 2004). Le gène *att1* code pour un cytochrome P450 catalysant l'hydroxylation des acides gras. Chez les plantes, les acides gras hydroxylés sont impliqués dans la biosynthèse de la cutine dont la présence réprime

l'induction des gènes de SST3 (Xiao *et al.*, 2004). Les mécanismes qui permettent à *P. syringae* de percevoir ce polymère lipidique chez la plante reste à élucider.

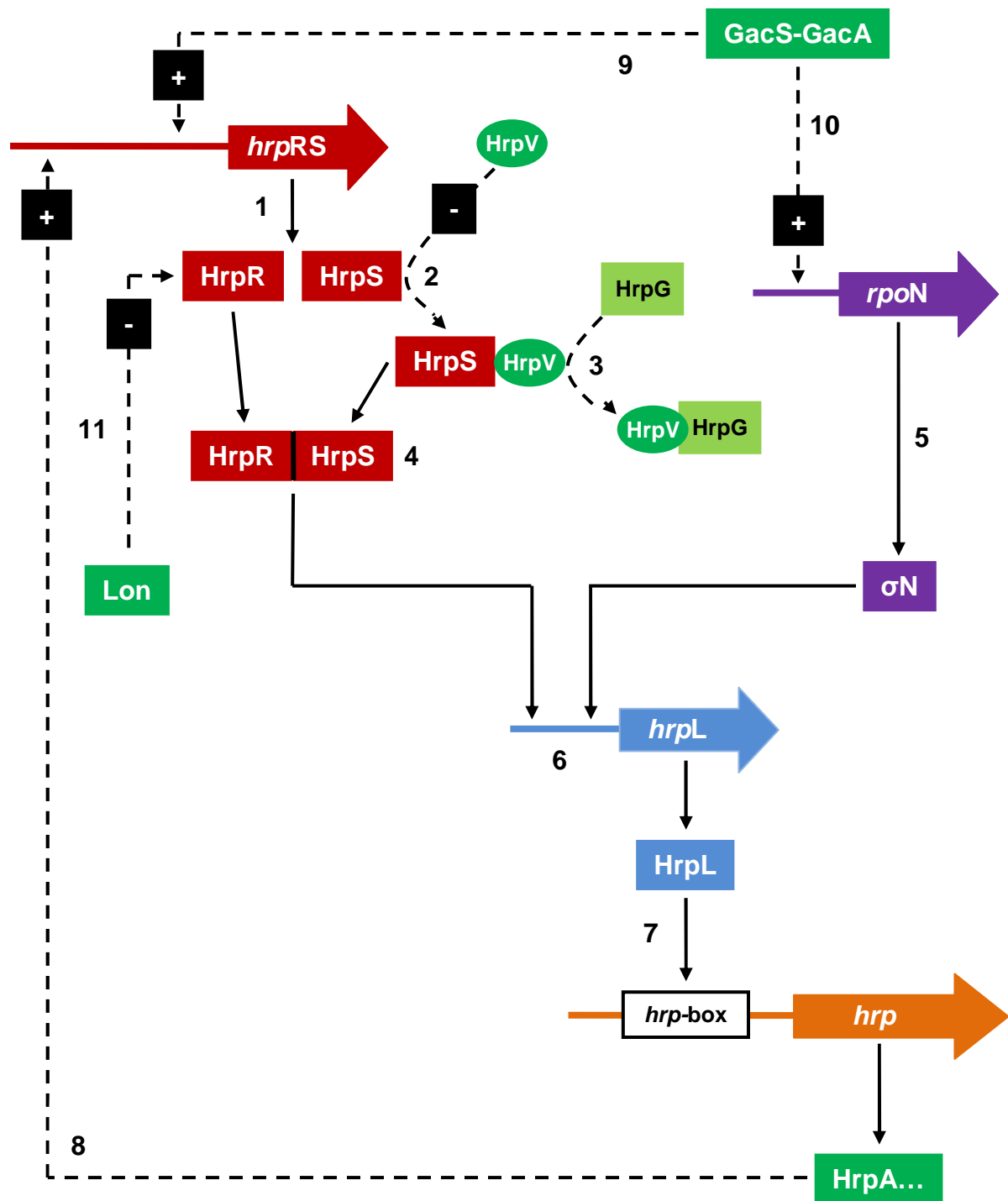
6.2. Contact entre les cellules hôtes eucaryotes et les bactéries pathogènes

De nombreuses études portant sur l'induction de l'expression des gènes codant les SST3 ont montré la nécessité d'un contact entre les cellules hôtes eucaryotes et les bactéries pathogènes (Aldon *et al.*, 2000 ; Brencic et Winans, 2005 ; Cornelis, 2000 ; Francis *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2006). Néanmoins, les mécanismes permettant à la bactérie de percevoir ce contact sont encore mal compris. Une hypothèse proposée et qui reste à vérifier est l'implication de l'aiguille ou du pilus Hrp du SST3 des pathogènes dans la détection du contact avec l'hôte (He *et al.*, 2004).

Chez les pathogènes d'animaux, des études plus récentes apportent une nuance à ces affirmations. Le contact avec l'hôte est effectivement une des conditions pour enclencher l'assemblage de l'appareil de sécrétion. Cependant, ce n'est pas uniquement au contact que la bactérie est sensible, mais également au cholestérol présent dans la membrane des cellules eucaryotes (Mota *et al.*, 2005). Hayward *et al.* (2005) ont montré en effet, que les bactéries du genre *Shigella*, *Salmonella* et EPEC (pour enteropathogenic *Escherichia coli*), ne délivrent pas de protéines sécrétées par les SST3 en présence de cellules déficientes en cholestérol. De même chez *P. aeruginosa*, l'assemblage de son SST3 est dépendant de la présence du cholestérol (Schoehn *et al.*, 2003) ainsi que la sécrétion de la protéine ExoS *via* ce système de sécrétion (Deng *et al.*, 2007 ; Deng et Barbieri, 2008).

Pour les phytopathogènes, les cellules végétales étant dépourvues de cholestérol, il ne peut être un facteur de régulation de l'expression du SST3. Si une molécule présente dans la paroi des cellules végétales régule l'expression des gènes codant les SST3 (comme le cholestérol chez les pathogènes d'animaux) elle reste à ce jour inconnue. Chez *Ralstonia solanacearum*, plusieurs études ont également montré que le contact avec les cellules de la plante est nécessaire à l'induction des gènes de SST3 (Aldon *et al.*, 2000 ; Francis *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2006). Cependant, si l'implication de l'aiguille du SST3 a été identifiée chez les pathogènes d'animaux, Marena *et al.* (1998) ont montré chez *R. solanacearum*, que l'induction de l'expression du cluster *hrp* par la présence des cellules de plantes est

Figure 8. Système de régulation transcriptionnelle des gènes de SST3 de la famille Hrp-I des bactéries pathogènes d'après Tang *et al.*, 2006 : exemple de *Pseudomonas syringae*. Le gène *hrpRS* code pour les protéines HrpR et HrpS (1). La fonctionnalité de HrpS est réprimée par HrpV (2). La protéine chaperonne HrpG se lie à HrpV *via* une interaction protéine-protéine ce qui libère HrpS (3). HrpR et HrpS forment un hétérodimère (4). Le gène *rpoN* code un facteur σ (5). Le complexe formé par HrpR et HrpS interagit avec le facteur σ pour activer la transcription de *hrpL* (6). La protéine HrpL est reconnue par la *hrp*-box ce qui permet la transcription des différents gènes de SST3 (7). La protéine HrpA est un régulateur positif de *hrpRS* (8). Le système GacS-GacA est également un régulateur positif de *hrpRS* (9) mais aussi un régulateur positif de *rpoN* (10). La protéase Lon est un régulateur négatif des gènes de SST3 en altérant la stabilité de HrpR (11).



contrôlée par le gène *prhA* (pour plant regulator *hrp* genes). Ce gène code pour la protéine PrhA de la membrane externe de *R. solanacearum*, une protéine TonB-dépendante qui agit comme une sonde de contact avec un composé non identifié de la paroi des cellules végétales (Aldon *et al.*, 2000). Si la mutation au niveau du gène *prhA* de *R. solanacearum* perturbe l'induction des gènes de SST3 dépendante du contact hôte-phytopathogènes, elle ne modifie pas l'induction des gènes de SST3 par le milieu de culture (Marenda *et al.*, 1998). Ce résultat suggère que les cellules hôtes et les composés du milieu de culture sont perçus différemment par cette bactérie.

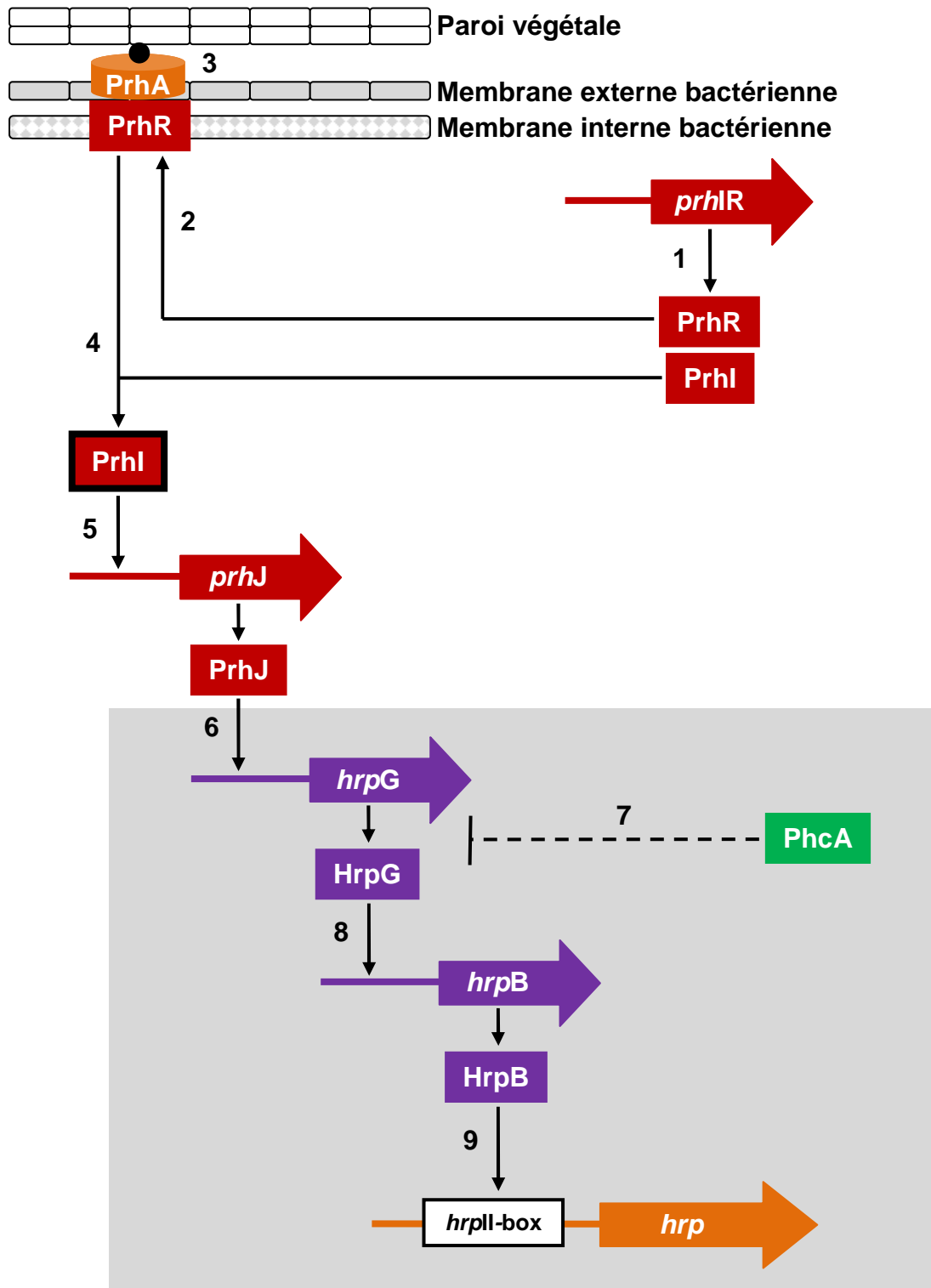
Chez les bactéries phytopathogènes, les systèmes de régulation transcriptionnelle des gènes *hrp*, diffèrent selon que ces gènes appartiennent à la famille des clusters Hrp-I ou des clusters Hrp-II (Tab. 2).

6.3. Régulation transcriptionnelle de type Hrp-I

Les gènes de SST3 de la famille Hrp-I de *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans* et *Vibrio parahaemolyticus* (Tab. 2), sont régulés par HrpL (facteur σ), un membre de la famille ECF (pour extra cytoplasmic functions ; Frederick *et al.*, 2001 ; Wei et Beer, 1995 ; Xiao et Hutcheson, 1994 ; Fig. 8). HrpL est fortement conservée chez ces bactéries et est reconnue par la séquence 5'-GGAACC-N15/16-CCACNNA-3' nommée '*hrp*-box' située dans la région promotrice des gènes de SST3 (Fouts *et al.*, 2002 ; Frederick *et al.*, 2001 ; Nissan *et al.*, 2005). La séquence *hrp*-box apparaît être un important marqueur génomique pour l'identification des gènes de SST3 de la famille Hrp-I des bactéries pathogènes.

L'induction de *hrpL* requiert *hrpS* et *hrpR* chez *P. syringae* (Hutcheson *et al.*, 2001). Les gènes *hrpS* et *hrpR* sont organisés en un opéron contrôlé par un promoteur en amont de *hrpR* (Grimm *et al.*, 1995 ; Hutcheson *et al.*, 2001 ; Xiao *et al.*, 1994). Le gène *hrpS* seul, est capable d'activer le gène *hrpL* mais faiblement et l'induction maximale de *hrpL* requiert *hrpR* et *hrpS* (Bretz *et al.*, 2002 ; Grimm *et al.*, 1995 ; Hutcheson *et al.*, 2001). HrpR et HrpS forment un hétérodimère au niveau du promoteur de *hrpL* pour la stimulation de la transcription de *hrpL* qui nécessite le facteur σ codé par *rpoN* (Hutcheson *et al.*, 2001). L'induction de *hrpRS* précède l'induction de l'expression du gène *hrpL*. Cette induction a été

Figure 9. Système de régulation transcriptionnelle des gènes de SST3 de la famille Hrp-II des bactéries pathogènes d'après Tang *et al.*, 2006 : exemple de *Ralstonia solanacearum*. Les protéines PrhI et PrhR sont codées par l'opéron *prhIR* (1). La protéine PrhR est localisée dans la membrane interne de la bactérie (2). La protéine PrhA, localisée dans la membrane externe perçoit un composé présent au niveau de la paroi des cellules végétales et transfère le signal à PrhR (3). La protéine PrhR active PrhI (4). La protéine PrhI active la transcription de *prhJ* (5). La protéine PrhJ active la transcription de *hrpG* (6). La protéine PhcA réprime *hrpG* au niveau post-transcriptionnel (7). La protéine HrpG active la transcription de *hrpB* (8). La protéine HrpB active le promoteur *hrpII*-box (9).



décrite chez des souches de *P. syringae* pv. phaseolicola (Rahme *et al.*, 1992 ; Thwaites *et al.*, 2004) et chez *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Lan *et al.*, 2006).

De multiples composés ont été identifiés comme régulant les gènes *hrpS* et *hrpR* chez *P. syringae* à différents niveaux. Le système GacS-GacA joue un rôle important dans la régulation de l'expression de *hrpRS* (Chatterjee *et al.*, 2003). Chez *P. syringae* pv. tomato DC3000, la mutation *gacA* atténue significativement la transcription de *hrpRS*, *rpoN* et *hrpL* (Chatterjee *et al.*, 2003). HrpA, le composé majeur du pilus Hrp de *P. syringae*, joue également un rôle dans la régulation de *hrpRS* (Wei *et al.*, 2000). En effet, un mutant *hrpA* réduit fortement la transcription de *hrpRS*, *hrpL* et d'autres gènes de SST3 (Wei *et al.*, 2000). La protéase Lon ATP-dépendante, est un régulateur négatif de la protéine HrpR (Bretz *et al.*, 2002). La mutation *lon* chez *P. syringae* augmente la stabilité de HrpR mais pas de HrpS (Bretz *et al.*, 2002).

Plus récemment, il a été montré qu'il existait un système de régulation particulier entre HrpS, HrpV et HrpG, suivant un mécanisme similaire au mécanisme anti-anti-activateur de *P. aeruginosa* (Wei *et al.*, 2005). Chez *P. syringae*, *hrpG* et *hrpV* sont localisés dans l'opéron *hrcC* et sont spécifiques du cluster gènes de SST3 de la famille Hrp-I. HrpV est un régulateur négatif des gènes de SST3 en amont de HrpR-HrpS (Preston *et al.*, 1998). Les gènes *hrp* sont fortement exprimés chez les mutants *hrpV* alors que la surexpression de *hrpV* réprime l'expression des gènes de SST3. HrpG, une protéine chaperonne (Tab. 4), annule la répression des gènes de SST3 par la surexpression de *hrpV* sans en affecter sa transcription (Wei *et al.*, 2005). HrpG (anti-anti-activateur) se lie à HrpV (anti-activateur de HrpS) *via* une interaction protéine-protéine libérant HrpS.

6.4. Régulation transcriptionnelle de type Hrp-II

Les gènes de SST3 de la famille Hrp-II de *Burkholderia pseudomallei*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris* (Tab. 2), sont régulés par un AraC activateur désigné par HrpX chez *Xanthomonas* spp. (Kamdar *et al.*, 1993) ou par HrpB chez *R. solanacearum* (Genin *et al.*, 1992 ; Fig. 9). Le promoteur des gènes de SST3 est régulé par un motif conservé 5'-TTCG-N16-TTCG-3' qui est appelé '*hrpII*-box' (Cunnac *et al.*, 2004). Le gène *hrpB* est activé par la protéine HrpG (Brito *et al.*, 1999). La protéine PhcA régule

négativement HrpG probablement par un mécanisme post-transcriptionnel (Genin *et al.*, 2005). La mutation *phcA* ne modifie pas la transcription de *hrpG* mais augmente l'expression des gènes de SST3 (Genin *et al.*, 2005).

HrpG est le point convergeant d'une cascade de régulation spécifique à *R. solanacearum* concernant la famille Hrp-II des SST3 impliquant *prhA*, *prhIR* et *prhJ*. Les protéines codées par ces gènes sont requises lors de l'induction par les cellules de la plante hôte. Les gènes *prhR* et *prhI* se trouvent sur le même opéron et codent pour une protéine transmembranaire (PrhR) et un facteur σ (PrhI) de la famille des ECF (Brito *et al.*, 2002). Comme décrit dans le paragraphe 6.2., PrhA agit comme une sonde de contact avec un composé non identifié de la paroi des cellules végétales (Aldon *et al.*, 2000 ; Marena *et al.*, 1998). Par la suite, PrhA transfère le signal de la plante à PrhR qui active PrhI qui induit la transcription de *prhJ* et qui aboutit à la transcription de *hrpG* (Brito *et al.*, 2002).

6.5. Induction et régulation des gènes de SST3 des *Pseudomonas non pathogènes*

Chez les *Pseudomonas non pathogènes*, on dispose de données concernant les facteurs d'activation de l'expression des gènes codant les SST3 pour deux souches mutualistes, *P. fluorescens* SBW25 et KD. Comme pour les bactéries pathogènes, la présence d'un hôte eucaryote apparaît nécessaire à l'induction des gènes codant le SST3. Chez *P. fluorescens* SBW25, l'expression des gènes de SST3 est induite en présence des racines de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* ; Jackson *et al.*, 2005 ; Rainey, 1999). En revanche, celle-ci est induite plus faiblement que ce soit en présence des feuilles de la plante ou dans un milieu minimum synthétique (Jackson *et al.*, 2005 ; Preston *et al.*, 2001). L'expression du cluster *rsp* de SBW25 serait donc induite en réponse à des signaux spécifiques aux racines (Preston *et al.*, 2001).

Cependant, la nature des hôtes eucaryotes avec lesquels la bactérie interagit n'est pas encore connue précisément. En effet, Rezzonico *et al.* (2005) ont montré que ce ne serait pas avec la plante que le SST3 de *P. fluorescens* KD interagirait mais avec un organisme fongiforme pathogène. La présence du SST3 induit une forte diminution de la production d'une polygalacturonase par *Pythium ultimum* ce qui protège le concombre contre la maladie induite par cet oomycète (Rezzonico *et al.*, 2005). En effet, les pectinases, comme la

polygalacturonase, contribuent à détériorer les pectines de la paroi cellulaire des plantes et sont importantes pour l'induction des maladies par les phytopathogènes (Agrios, 1997).

Chez les *Pseudomonas non pathogènes*, la régulation transcriptionnelle des gènes de SST3 est proche du schéma de régulation des clusters Hrp-I du phytopathogène *P. syringae* (Jackson *et al.*, 2005). En effet, chez *P. fluorescens* SBW25, l'étude de l'expression des gènes de régulation a montré que la protéine RspR contrôle la transcription du facteur σ *rspL* et que la protéine RspL contrôle l'expression du cluster des gènes codant pour les protéines de SST3 (Jackson *et al.*, 2005). L'organisation des gènes de SST3 des *Pseudomonas non pathogènes* étant similaire à celle des gènes de SST3 des *Pseudomonas phytopathogènes* (paragraphe 4.3.), il n'est pas surprenant qu'il y ait des similarités dans la régulation de ces gènes chez ces bactéries.

7. Protéines sécrétées via le SST3

Les bactéries pathogènes utilisent les SST3 pour permettre une communication de cellule à cellule avec leur hôte eucaryote. Une fois le contact établi, le SST3 permet la sécrétion et la translocation directe de protéines bactériennes, appelées protéines effectrices, à l'intérieur des cellules de l'hôte (Hogenhout *et al.*, 2009 ; Mudgett, 2005). Les activités des protéines effectrices sont requises pour la pathogénie des bactéries, comme montré par une faible virulence de mutants dont le SST3 a été inactivé. De nombreux effecteurs contribuent à la virulence en supprimant les défenses spécifiques de l'hôte eucaryote (da Cunha *et al.*, 2007 ; Speth *et al.*, 2007).

7.1. Protéines effectrices des bactéries pathogènes d'animaux

Chez les bactéries pathogènes d'animaux, les SST3 sécrètent des protéines variées dont les différents effets sur la cellule hôte (modification du squelette d'actine, cytotoxicité, induction de l'apoptose, inhibition de la phagocytose des macrophages...), sont à l'origine de la virulence de ces bactéries (Cornelis, 2002 ; Cornelis et van Gijsegem, 2000).

Quatre protéines effectrices ont été identifiées chez *P. aeruginosa* (Engel et Balachandran, 2009) : ExoU, une phospholipase (Sato et Frank, 2004) ; ExoY, une

adénylcyclase (Yahr *et al.*, 1998) ; ExoT et ExoS, qui sont des protéines bifonctionnelles avec une activité GAP N-terminale (pour GTPase-activating protein) et une activité ADPRT C-terminale (pour ADP ribosyltransferase) (Barbieri et Sun, 2004). Il a été montré que ExoS était nécessaire et suffisante pour induire une apoptose caspase-3-dépendante (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2006 ; Jia *et al.*, 2006) alors qu'une apoptose nécrotique résulte dans la sécrétion de ExoU (Sato et Frank, 2004).

7.2. Protéines effectrices des bactéries phytopathogènes

D'une manière générale, les protéines effectrices des pathogènes sont décrites selon leur mode d'action. Chez les phytopathogènes, il existe cinq grands groupes principaux : (i) les suppresseurs de la mort programmée des cellules, (ii) les activateurs de la voie métabolique de l'acide jasmonique, (iii) les inhibiteurs des modifications membranaires, (iv) les activateurs de transcription chez la plante et (v) les inhibiteurs de l'activation des protéines de résistance (Mudgett, 2005). Les protéines effectrices sécrétées par les SST3 des bactéries pathogènes de plantes font l'objet de nombreuses revues notamment, Block *et al.* (2008), da Cunha *et al.* (2007), Hogenhout *et al.* (2009) et Lewis *et al.* (2009).

Les protéines effectrices sécrétées par le SST3 peuvent être reconnues par des protéines végétales de résistance aux maladies, les protéines-R (Hogenhout *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2009). De nombreux gènes d'effecteurs ont été identifiés par leur capacité à provoquer la résistance aux maladies, plutôt que par leur capacité à augmenter la virulence des bactéries. Ces gènes ont donc été nommés gènes *avr* (pour avirulence) dont le premier a été découvert par Staskawicz *et al.* (1984). Les protéines Avr jouent un rôle clé dans les interactions plantes-pathogènes et sont impliquées dans la spécificité d'hôte du pathogène (Alfano et Collmer, 1997). En effet, l'interaction entre une protéine Avr et une protéine-R est une relation spécifique dite 'gène pour gène' qui est à l'origine de la restriction du spectre d'hôtes des plantes qui vont développer des résistances spécifiques à certaines maladies. Les protéines Avr induiront l'expression du gène-R aboutissant à l'induction d'une réaction de résistance ou HR, chez une plante porteuse de la protéine-R correspondante à la protéine Avr en question (Alfano et Collmer, 2004 ; Keen, 1990). L'expression des protéines-R qui n'aboutit pas à une HR peut tout de même provoquer l'induction des défenses de la plante qui permettent de limiter efficacement la croissance des pathogènes (Gassmann, 2005 ; Ham *et al.*, 2007).

Malgré cette spécialisation pointue des protéines sécrétées en fonction d'un type d'hôte, on observe une conservation importante des fonctions remplies dans la cellule hôte où différentes protéines peuvent viser la même fonction physiologique (Büttner et Bonas, 2003). Ainsi certaines espèces généralistes, telles que *P. aeruginosa* PA14 utilisent des protéines aux fonctions similaires afin d'infecter un large spectre d'hôtes, aussi bien des animaux (souris) que des végétaux (*Arabidopsis*) (Rahme *et al.*, 2000).

Certaines protéines constitutives du SST3, les protéines du pilus Hrp et du translocon de l'appareil de translocation (paragraphe 4.2.) sont parfois considérées comme des protéines sécrétées. Parmi ces protéines, les harpines constituent un groupe de protéines effectrices chez les phytopathogènes (Galán et Collmer, 1999 ; Kjemtrup *et al.*, 2000). Les gènes codant pour ces protéines ont été identifiés chez (i) *Erwinia amylovora* et *E. chrysanthemi* (*hrpN* ; Wei *et al.*, 1992), (ii) *P. syringae* pvs. *syringae*, tomato et glycinea (*hrpZ* ; He *et al.*, 1993 ; Preston *et al.*, 1995) et (iii) *Ralstonia solanacearum* (*popA* ; Arlat *et al.*, 1994). Les harpines des différents genres bactériens induisent les réponses de défense de la plante associées à la résistance contre les maladies, telles que la HR, et activent le système de surveillance des plantes (Alfano et Collmer, 2004 ; Lee *et al.*, 2001).

7.3. Protéines effectrices des *Pseudomonas non pathogènes*

L'analyse des séquences du cluster *rsp* de *P. fluorescens* SBW25, a révélé la présence de deux protéines putatives sécrétées : RspA et RopE (Preston *et al.*, 2001). Ce travail a également permis de suggérer l'existence d'une troisième protéine sécrétée non identifiée sur le cluster *rsp*, au vu de l'observation de l'induction de la HR par la souche sauvage et les mutants *ropE* de SBW25. Greenberg et Vinatzer (2003) ont montré que SBW25 possédait plusieurs gènes ayant des homologies avec des gènes de protéines effectrices d'autres pathogènes de plantes et d'animaux. Plus tard, Vinatzer *et al.* (2005) ont confirmé que deux de ces gènes sont bien des gènes codant pour des protéines effectrices putatives : un gène homologue de *avrA* et un gène homologue de *exoY* de *P. syringae*. A notre connaissance, ces résultats sont les seuls existants concernant les protéines effectrices chez les bactéries non pathogènes non symbiotiques.

8. Signal de sécrétion des protéines effectrices

Les protéines sécrétées *via* le SST3 possèdent un signal de sécrétion non clivable, au niveau de la région N-terminale, mais aucune similarité de séquences n'a été trouvée entre les différentes protéines (Arnold *et al.*, 2009 ; Samudrala *et al.*, 2009). Deux hypothèses sont discutées concernant le signal reconnu par les SST3, une séquence d'acides aminés ou une séquence d'ARNm. Ce serait la nature amphiphile et la composition en acides aminés de la région N-terminale des protéines qui serviraient de signal de sécrétion (Arnold *et al.*, 2009 ; Galán et Wolf-Watz, 2006 ; Samudrala *et al.*, 2009). Cette hypothèse est compatible avec les caractéristiques physico-chimiques spécifiques présentes dans les 50 premiers acides aminés des protéines effectrices, notamment chez *P. syringae* : (i) la présence d'acides aminés exposés aux solvants dans les cinq premiers acides aminés, (ii) l'absence de résidus aspartate ou glutamate dans les 12 premiers acides aminés et (iii) le caractère amphiphile et l'enrichissement en résidus polaires dans les 50 premiers acides aminés (Guttman *et al.*, 2002 ; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Des analyses bioinformatiques récentes des protéines effectrices de bactéries pathogènes de végétaux et d'animaux ont révélé que les 25 acides aminés de leur région N-terminale sont riches en sérine et que les régions en spirale sont pauvres en leucine (Arnold *et al.*, 2009 ; Samudrala *et al.*, 2009).

9. Origine et évolution des SST3

9.1. Origine des SST3

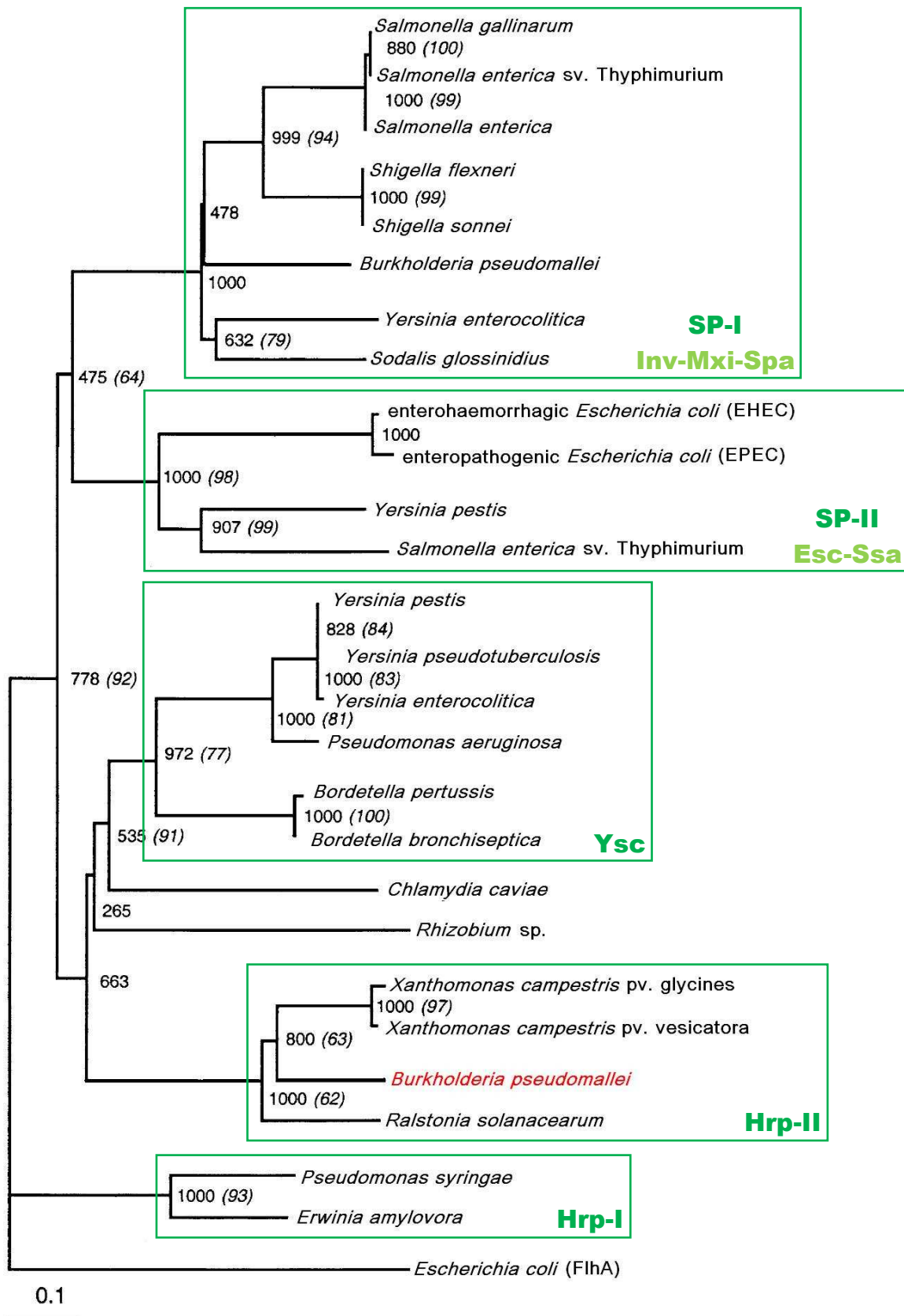
Deux théories différentes ont été proposées concernant l'origine des SST3. Huit des neuf gènes *hrc* (*hrcJ*, R, S, T, U, V, Qa,b et N) présentent des homologies avec les gènes codant le système flagellaire bactérien (*fli* ; Tab. 3). Sur la base de ces homologies certains auteurs ont émis l'hypothèse que le système flagellaire pourrait être à l'origine des SST3, alors que d'autres penchent pour la thèse d'une origine commune de ces deux systèmes.

L'hypothèse selon laquelle les SST3 constitueraient une évolution du système flagellaire (Nguyen *et al.*, 2000 ; Aizawa, 2001) s'appuie principalement sur l'observation d'une faible distribution des SST3 chez les bactéries, par rapport au système flagellaire. En effet le système flagellaire est plus répandu que les SST3 dans la nature : dans 2 phyla

pour le SST3 contre 6 ou 8 phyla sur 19 pour le système flagellaire. De même les SST3 sont limités aux bactéries Gram-. Selon les auteurs de cette hypothèse, il serait également plus facile d'admettre que le phénotype de mobilité soit plus ancien que la subversion des cellules eucaryotes. Enfin, Nguyen *et al.* (2000) et Aizawa (2001) appuient leur hypothèse sur le fait que les SST3 permettent d'interagir avec les eucaryotes. Or, les eucaryotes supérieurs ne sont apparus qu'au cours de ce dernier billion d'années alors que les bactéries flagellées datent d'au moins 4 billions d'années.

Des travaux plus récents sont en désaccord avec cette théorie concernant l'origine des SST3. Ils soutiennent la thèse selon laquelle les SST3 et le système flagellaire descendraient d'un ancêtre commun et auraient divergés il y a 100 millions d'années, bien avant l'apparition du premier eucaryote multicellulaire (Foultier *et al.*, 2002 ; Gophna *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2004 ; Pallen *et al.*, 2005). Dans la théorie précédente, pas moins de 7 étapes seraient indispensables pour passer du système flagellaire au SST3. En admettant l'origine commune de ces deux systèmes seuls, 4 étapes sont nécessaires. Cette hypothèse est donc en accord avec le principe de parcimonie appliqué en biologie évolutive (Pallen *et al.*, 2005). D'après Gophna *et al.* (2003), la présence de SST3 chez les *Chlamydia* (parasites intracellulaires obligatoires des animaux), aussi distants phylogénétiquement des protéobactéries (Gram-) que des firmicutes (Gram+), renforce la thèse d'une origine bien plus ancienne que ce que proposent Nguyen *et al.* (2000) et Aizawa (2001). En effet, dans différentes études phylogénétiques portant sur les gènes de SST3, la branche des *Chlamydia* se différencie très tôt de la branche des SST3 des bactéries Gram- (Kim, 2001 ; Foultier *et al.*, 2002 ; Gophna *et al.*, 2003). Chez ces microorganismes, contrairement à ce qui est connu pour les bactéries Gram-, les gènes codant les SST3 ne sont pas réunis en un cluster mais dispersés sur 3 clusters conservés distincts (Peters *et al.*, 2007). De plus la composition en guanine et cytosine (G+C%) de ces gènes (environ 40%) est identique à celle du reste du génome (Peters *et al.*, 2007). Pour ces différentes raisons, il a été envisagé que les SST3 seraient originaires de ce groupe bactérien (Kim, 2001 ; Pallen *et al.*, 2005). Néanmoins, des analyses du cluster des gènes codant le SST3 de *Chromobacterium violaceum* (également un pathogène d'animaux) par Betts *et al.* (2004), révèlent une concordance des bases avec le reste du génome de cette bactérie. Ceci suggère que le cluster réside dans le génome de la bactérie depuis très longtemps et le SST3 pourrait également être originaire de cette espèce (Pallen *et al.*, 2005).

Figure 10. Arbre phylogénétique des gènes de SST3 conservés d'après Foultier *et al.* (2002) et Sorg et Cornelis (2009). Les SST3 ont été classés en sept familles différentes (Tab. 2).



9.2. Evolution des SST3

Sur la base de la phylogénie des SST3, les branches regroupant les pathogènes d'animaux et de végétaux sont bien différenciées malgré quelques exceptions telles que *Burkholderia pseudomallei*, pathogène d'animaux qui se trouve regroupé avec les phytopathogènes (Foultier *et al.*, 2002 ; Sorg et Cornelis, 2009 ; Fig. 10 ; Tab. 2). Par la comparaison d'arbres phylogénétiques réalisés à partir des gènes de SST3 et de l'ADNr 16S et par des comparaisons de G+C%, Gophna *et al.* (2003) suggèrent que des transferts horizontaux (HGT pour horizontal gene transfer) de gènes de SST3 ont eu lieu fréquemment au cours de l'évolution entre différents genres de bactéries Gram-. Les HGT sont considérés comme une force majeure de l'évolution des SST3 chez les bactéries pathogènes (Gophna *et al.*, 2003 ; Pallen *et al.*, 2005). Ces transferts ont eu lieu pour la plupart entre espèces partageant la même écologie d'hôtes c'est-à-dire plutôt entre pathogènes de végétaux - pathogènes de végétaux qu'entre pathogènes de végétaux - pathogènes d'animaux (Gophna *et al.*, 2003). D'après ces auteurs, ces événements seraient plus fréquents que ce que l'on pouvait penser. Des observations faites sur des *Pseudomonas* pathogènes montrent que les HGT ne sont pas des événements récents dans l'histoire évolutive des SST3 car la spécialisation à l'hôte due à une longue coévolution réduirait la fréquence de transferts horizontaux plus récents (Araki *et al.*, 2006 ; Gophna *et al.*, 2003). L'importance des HGT dans l'évolution des SST3 est parfois mise en évidence par la présence de deux SST3 fonctionnels codés par deux clusters de gènes différents chez une même souche, par exemple *Salmonella* SPI-I et SPI-II (Pallen *et al.*, 2005). De même, *Escherichia coli* dispose de deux SST3 distincts mais l'un d'eux est dégénéré et non fonctionnel (Pallen *et al.*, 2005). La présence de deux SST3 chez une même souche bactérienne fait penser qu'au moins l'un des deux systèmes sécrétoires a été acquis par transfert horizontal ou transposition, offrant un avantage sélectif à la bactérie porteuse (Pallen *et al.*, 2005).

Chez les bactéries phytopathogènes, la localisation du cluster *hrp* sur des éléments génétiques mobiles est étroitement liée à l'histoire évolutive des SST3. Le cluster *hrp* se trouve sur des îlots génomiques (GEI pour genomic island) permettant une évolution accélérée par transfert horizontal (Juhás *et al.*, 2009). Les îlots génomiques portant des gènes impliqués dans la pathogénie sont appelés PAI (pour pathogenicity island ; Dobrindt *et al.*, 2001 ; Hacker et Kaper, 2000 ; Hsiao *et al.*, 2005). Hacker *et al.* (1997) ont défini les PAI

comme des clusters incluant divers gènes de virulence et donc sélectivement présents chez les souches pathogènes. Les PAI ont en général, une composition en G+C% différente du reste du génome de la bactérie hôte montrant l'intégration dans le passé d'éléments génétiques étrangers (Gophna *et al.*, 2003). Ils sont souvent flanqués par des séquences répétées et bordés par des gènes ARNt ou des éléments génétiques mobiles. Tous ces éléments rendent les PAI très instables (Alfano *et al.*, 2000).

Même si les SST3 sont beaucoup plus distribués parmi les souches saprotrophes de *Pseudomonas* que ce que laissait penser une association systématique au pouvoir pathogène, la présence de ces SST3 chez ces bactéries est cependant moins systématique que chez les *Pseudomonas* pathogènes. Cette absence de SST3 chez une grande partie des bactéries non pathogènes peut être le signe d'une perte de gènes. Il se peut aussi que les gènes codant les SST3 aient été acquis par ascendance (transfert vertical) ou par des événements de transferts horizontaux avec les souches pathogènes proches. Ceci semble confirmé par les G+C% et l'organisation des clusters très conservée entre le phytopathogène *P. syringae* et les bactéries à effet PGPR telles que *P. fluorescens* SBW25 et KD. L'organisation et les séquences du cluster *rsp* de *P. fluorescens* SBW25 sont très similaires au cluster *hrp* de *P. syringae* (Preston *et al.*, 2001) qui est considéré comme un cluster ancestral chez cette bactérie pathogène (Sawada *et al.*, 1999). Ceci suggère qu'un HGT a bien eu lieu entre des *Pseudomonas* pathogènes et non pathogènes. Néanmoins, certains gènes de SST3 présents chez *P. syringae* ne sont pas présents chez *P. fluorescens* SBW25 comme par exemple *hrcN* (Pozidis *et al.*, 2003 ; Preston *et al.*, 2001). Ceci peut s'expliquer par un transfert de gène incomplet ou une perte ultérieure de gène (Rezzonico *et al.*, 2004). L'acquisition des gènes de SST3 semble être ancienne dans la plupart des cas car l'arbre phylogénétique construit à partir de *hrcN* (codant l'ATPase du SST3) est congruent avec celui construit *via* le gène *rrs* (codant l'ADNr16S) (Rezzonico *et al.*, 2004). Toutefois *P. fluorescens* KD quant à lui, semble avoir subi un transfert horizontal récent de *P. syringae* qui apparaît comme l'espèce ancestrale (Rezzonico *et al.*, 2004). Les gènes de phytovirulence ont été ainsi rapidement recyclés comme arsenal de protection de la plante (Rezzonico *et al.*, 2005). Des incongruences ont également été observées entre les séquences ADNr16S et les séquences *hrcRST* de SST3 (Mazurier *et al.*, 2004). Ces incongruences impliquent notamment, une souche saprotrophe (*P. fluorescens* CFBP11362) et suggèrent que certains gènes de SST3 pourraient avoir subi un transfert horizontal récent (Mazurier *et al.*, 2004).

Tableau 5. Résumé de l'état des principales connaissances sur les SST3 des pathogènes d'animaux, pathogènes de végétaux et des bactéries non pathogènes.

	Pathogènes d'animaux	Pathogènes de végétaux	Rhizobia	Autres bactéries non pathogènes
Bactéries	<i>Yersinia</i> , <i>Samolnella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Sinorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Mesorhizobium loti</i> , <i>Rhizobium etli</i>	- <i>Photorhabdus luminescens</i> , <i>Sodalis glossinidius</i> , <i>Sitophilus zeamais</i> (SZPE) - <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Myxococcus xanthus</i> , <i>Verrumicrobium spinosum</i> , <i>Burkholderia</i> - <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents
Composition	<i>Yersinia</i> : -9 protéines Ysc conservées (corps) -Protéines sécrétées Ysc (aiguille) et Yop (appareil de translocation) <i>P. aeruginosa-Salmonella-S. flexneri</i> : -9 protéines conservées (corps) -Protéines sécrétées Psc-Prg-Mxi (aiguille) et Pop-SipB-IpaB (appareil de translocation)	<i>P. syringae</i> : -9 protéines Hrc conservées (corps) -Protéines Hrp sécrétées (pilus Hrp et appareil de translocation)	-9 protéines Rhc conservées (corps) -D'après les homologues de séquences des gènes correspondants aux SST3 des pathogènes	(<i>P. fluorescens</i> SBW25) : -9 protéines Hrc (Rsc) conservées (corps) -Quelques protéines sécrétées Hrp (Rsp) -D'après les homologues de séquences des gènes correspondants aux SST3 des pathogènes
Visualisation et organisation	<i>Shigella-Salmonella</i> : -Forme d'aiguille d'injection -Longueur: 80 nm -Diamètre : 6-8 nm -Assemblage des protéines en hélice	-Pilus Hrp -Longueur : 200 nm -Diamètre : 6-8 nm -Assemblage des protéines en hélice	<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234- <i>S. fredii</i> : -Très proche du pilus de pathogènes -Organisation hypothétique du corps basal sur la base d'homologies des gènes codant les SST3 des pathogènes	-Organisation hypothétique du corps basal sur la base d'homologies des gènes codant les SST3 des pathogènes
Protéines effectrices sécrétées	<i>Yersinia</i> : protéines Yop (virulence) <i>P. aeruginosa</i> : protéines ExoU, Y, T, S (virulence)	-Harpines (induction de la HR) -Protéines effectrices dont Avr (induction de la HR, pathogénie et spécificité d'hôte)	-Protéines de type Avr (rôle encore mal connu) -Protéines Nop (maintien de l'interaction symbiotique et spécificité d'hôte)	<i>P. fluorescens</i> SBW25 : -RspA et RopE -Présence de gènes homologues codant pour des effecteurs chez les pathogènes
Translocation	-Démontrée mais mécanisme de sécrétion à préciser	-Démontrée indirectement et mécanisme de sécrétion à préciser	-Non démontrée	-Non démontrée
Chaperonnes	<i>P. aeruginosa</i> : PcrH, PscE-PscG, SpcS (Orf1), SpcU	<i>P. syringae</i> : HrpG, AvrF, famille des protéines Shc	-Aucune chaperonne connue	-Aucune chaperonne connue
Régulation positive	-Conditions mimant l'hôte -Contact avec l'hôte -Détection du cholestérol dans la membrane des cellules eucaryotes	-Conditions mimant l'hôte -Contact avec l'hôte	<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234 : -Flavonoïdes -Facteur de transcription des facteurs Nod pour	-Conditions mimant l'hôte -Rhizosphère pour <i>P. fluorescens</i> SBW25 -Présence du pathogène <i>P. ultimum</i> de la plante hôte pour <i>P. fluorescens</i> KD
Régulation transcriptionnelle	-Type Hrp-I : HrpL (facteur σ) -Type Hrp-II : HrpB/HrpX	- Type Hrp-I : HrpL (facteur σ) - Type Hrp-II : HrpB/HrpX	-Aucune donnée	-Ressemblance avec la régulation des clusters de type Hrp-I
Signal de sécrétion	-Signal non clivable N-terminal (séquence d'acides aminés ou d'ARNm)	-Signal non clivable N-terminal (séquence d'acides aminés ou d'ARNm)	-Aucune donnée	-Aucune donnée

10. Conclusion

Les systèmes de sécrétion de type III sont longtemps restés associés à la virulence des bactéries et sont considérés, chez les *Pseudomonas*, comme des facteurs déterminants de leur pouvoir pathogène. La présence de ces systèmes chez de nombreux *Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes, saprotrophes ou mutualistes, élargit le rôle connu des SST3 et soulève de nombreuses questions quant à leur importance dans les écosystèmes. Les connaissances actuelles les concernant chez les bactéries saprotrophes ou mutualistes, restent cependant encore assez peu étendues par rapport aux SST3 des bactéries pathogènes. Un résumé de l'état des connaissances est présenté dans le tableau 5.

Aujourd'hui, il est admis que les SST3 ne sont pas uniquement impliqués dans les interactions pathogènes entre les bactéries et les plantes. En effet, les gènes de SST3 ont été détectés chez des souches saprotrophes de *Pseudomonas* et notamment, chez des *Pseudomonas* spp. fluorescents capables de protéger les plantes contre des maladies d'origine tellurique. Cette observation soulève l'hypothèse de la possible implication des SST3 dans l'élicitation de réactions de défense de la plante, connue pour jouer un rôle majeur dans la suppression des maladies par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (van Loon *et al.*, 1998). Rezzonico *et al.* (2005) ont montré que l'expression des gènes de SST3 de *P. fluorescens* KD, réduisait la capacité de biocontrôle de la bactérie contre *Pythium ultimum* chez le concombre. A notre connaissance, ce sont les seuls résultats rapportant l'implication du SST3 dans la protection des plantes contre les maladies. Les connaissances concernant leur implication dans la rhizosphère et dans l'effet bénéfique des bactéries pour la croissance et la santé des plantes mériteraient d'être développées.

Si l'organisation génétique des SST3 des *Pseudomonas* saprotrophes ou mutualistes, très proche de celles des souches pathogènes, par exemple entre *P. fluorescens* SBW25 et *P. syringae*, a permis d'orienter les recherches et d'émettre des hypothèses, de nombreuses interrogations restent sans réponses. L'objectif principal de ce travail de thèse est donc de faire avancer les connaissances disponibles concernant le rôle des SST3 dans les interactions entre les *Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes et les eucaryotes.

CHAPITRE II

Promotion par les mycorhizes de l'abondance des *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un système de sécrétion de type III dans la rhizosphère de *Medicago truncatula*

Viollet, A., Corberand, T., Mougel, C., Robin, A., Lemanceau, P. et Mazurier, S. **(accepté)**. Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiology Ecology*.

Avant propos	43
Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of <i>Medicago truncatula</i>	45
1. Abstract	45
2. Introduction	46
3. Materials and methods	48
3.1. Plant growth conditions and bacterial strains	
3.2. Evaluation of plant mycorrhization, nodulation and growth	
3.3. PCR amplifications	
3.4. RFLP of <i>hrcRST</i> -PCR fragments	
3.5. DNA cloning, sequencing and analysis	
3.6. Statistical analysis	
4. Results	52
4.1. Growth, development, mycorrhization and nodulation of the plant genotypes	
4.2. Comparison of fluorescent pseudomonads harboring <i>hrcRST</i> genes in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots	
4.3. Genotypic diversity of <i>hrcRST</i> ⁺ fluorescent pseudomonads	
5. Discussion	55
6. Acknowledgments	59
7. References	59
Bilan	62

Avant propos

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre précédent, a permis de réaliser une synthèse des principales informations relatives aux systèmes de sécrétion de type III chez les *Pseudomonas* non pathogènes, saprotrophes et mutualistes. Ces données montrent que les systèmes de sécrétion ne sont pas cantonnés aux interactions parasites ou pathogènes avec les plantes. En effet, les SST3 sont de plus en plus souvent identifiés comme impliqués dans les interactions commensales et mutualistes entre les bactéries non pathogènes et les plantes (Coombes, 2009) ce qui élargirait le rôle connu de ce système de sécrétion bactérien (Preston, 2007). Les *Pseudomonas* étant ubiquistes, ces données montrent également que les bactéries porteuses de ces systèmes sont très largement distribuées dans l'environnement. Toutefois, la fonction des SST3 chez ces bactéries dans les écosystèmes n'est pas connue.

Les travaux de Rainey (1999), Mazurier *et al.* (2004) et Rezzonico *et al.* (2004) ont montré qu'il pourrait y avoir un lien entre la présence des SST3 des *Pseudomonas* spp. fluorescents et la rhizosphère. Par ailleurs, les travaux de Rezzonico *et al.* (2005), Warmink *et al.* (2008) et Warmink et van Elsas (2008) suggèrent que les SST3 pourraient avoir un fonctionnement lié aux champignons présents naturellement dans le sol. Si les plantes sont à l'origine de la mise en place de l'environnement rhizosphérique, d'autres eucaryotes participent également à l'équilibre de ce milieu. C'est le cas des champignons mycorhizogènes qui ont un rôle très important dans les milieux naturels. Ces champignons établissent naturellement avec les plantes des associations bénéfiques pour leur croissance et leur santé. Les symbioses mycorhiziennes les plus fréquemment rencontrées dans la nature, sont les associations qui se mettent en place entre les plantes et les champignons mycorhizogènes à arbuscules appartenant au phylum des Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001 ; Smith et Read, 2008 ; Wang et Qiu, 2006). Ces dernières ont été recensées chez 80% des plantes terrestres (Brundrett, 2009 ; Smith et Read, 2008).

L'objectif de cette étude est de déterminer si la présence accrue des *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3 dans la rhizosphère est liée à la plante seule ou si les champignons mycorhizogènes peuvent jouer un rôle. La démarche choisie pour cette étude est une approche sans *a priori* basée sur l'étude des populations de *Pseudomonas* spp.

fluorescents SST3+. Pour cela, une étude expérimentale a été développée avec la plante modèle *Medicago truncatula*. Cette légumineuse diploïde possède un grand nombre de caractéristiques intéressantes telles qu'un petit génome (500-600 Mbp/1C), une reproduction autogame permettant de stabiliser le génome et un cycle reproductif court (Young *et al.*, 2003). Elle possède une synténie avec diverses légumineuses cultivées (pois, féveroles, soja, trèfle...) qui justifie son intérêt dans le domaine agronomique (Thoquet *et al.*, 2002). *M. truncatula* est aussi connu pour ses interactions avec de nombreux microorganismes. En effet, en plus des symbioses mycorhiziennes, *M. truncatula* est également capable de mettre en place des relations avec les bactéries fixatrices d'azote (collectivement appelées rhizobia), dans des associations à bénéfices réciproques (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Boisson-Dernier *et al.*, 2001).

Cette étude a été effectuée dans le sol nu naturel de Châteaurenard (France) mais aussi, dans la rhizosphère et le compartiment racines-rhizoplan de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 (Myc+/Nod+) et de ses mutants TRV48 (Myc+/Nod-) et TRV25 (Myc-/Nod-) (Catoira *et al.*, 2000 ; Morandi *et al.*, 2005 ; Sagan *et al.*, 1995). Ce travail expérimental a donc été entrepris afin de déterminer s'il existait une association préférentielle des *Pseudomonas spp. fluorescentes* SST3+ avec les racines de la plante et ce, en tenant compte ou non des différents acteurs principaux de la relation plante-CMA-rhizobia présents naturellement dans la rhizosphère. Parmi les isolats SST3+, la diversité des gènes *hrcRST*, gènes marqueurs des SST3, a été déterminée. Enfin, la diversité du fond génétique des isolats a été étudiée afin de caractériser les populations de *Pseudomonas spp. fluorescentes* qui possèdent ces systèmes de sécrétion.

Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of *Medicago truncatula*

Amandine Viollet, Thérèse Corberand, Christophe Mougel, Agnès Robin†, Philippe Lemanceau, Sylvie Mazurier*

INRA, Université de Bourgogne, UMR 1229 'Microbiologie du Sol et de l'Environnement', CMSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France

†Current address: CIRAD, INRA, IRD, SupAgro, UMR 1222 'Eco&Sol Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols', 2 place Viala, 34060 Montpellier, France

Running title: pseudomonads harboring T3SS are enriched in the mycorrhizosphere

Total number of tables: 3

Total number of figures: 2

Total number of references: 50

Number of pages: 30

***Corresponding author:** Sylvie Mazurier

Address: UMR 1229 MSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France

Phone: +33 3 80 69 30 93

Fax: +33 3 80 69 32 24

E-mail: sylvie.mazurier@dijon.inra.fr

1. Abstract

Type III secretion systems (T3SSs) of Gram negative bacteria mediate direct interactions with eukaryotic cells. *Pseudomonas* spp. harboring T3SS genes (T3SS+) were previously shown to be more abundant in the rhizosphere than in bulk soil. In order to discriminate the contribution of roots and associated arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on

the enrichment of T3SS+ fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of *Medicago truncatula*, their frequency was assessed among pseudomonads isolated from mycorrhizal and non-mycorrhizal roots, and from bulk soil. T3SS genes were identified by PCR targeting a conserved *hrcRST* DNA fragment. Polymorphism of *hrcRST* in T3SS+ isolates was assessed by PCR-RFLP and sequencing. Genotypic diversity of all pseudomonads isolated, whether or not harboring T3SS, was described by BOX-PCR. T3SS+ pseudomonads were significantly more abundant in mycorrhizal than in non-mycorrhizal roots and in bulk soil, and all were shown to belong to the phylogenetic group of *P. fluorescens* on the basis of 16S rRNA gene identity. Four *hrcRST* genotypes were described; two only included isolates from mycorrhizal roots. T3SS+ and T3SS- pseudomonads showed different genetic backgrounds as indicated by their different BOX-PCR types. Taken together, these data suggest that T3SS are implicated in the interactions between fluorescent pseudomonads and AM in medic rhizosphere.

2. Introduction

Non flagellar type III secretion systems (hereafter designated by type III secretion systems or T3SSs) were first discovered in Gram negative bacterial pathogens and thus have long been associated with their virulence. They have been described as molecular syringes delivering virulence factors directly into the cytoplasm of eukaryotic host cells (Hueck, 1998). T3SSs have been more recently described in symbiotic bacteria such as rhizobia (Mazurier *et al.*, 2006) and are now considered as also mediating mutualist and commensal interactions between bacteria and eukaryotes (Preston, 2007). It is now assumed that these protein delivery structures represent a general communication conduit between bacteria and their eukaryotic hosts: animals, plants, fungi, and protoctists (Coombes, 2009). Type III secretion systems appear thus as central players in the adaptation of both parasites and mutualists to diverse hosts (Preston, 2007).

In pseudomonads, knowledge on T3SS mostly concerns animal pathogens belonging to the species *P. aeruginosa*, and phytopathogens to the species *P. syringae* (Sorg & Cornelis, 2009). In the context of acute infections due to *P. aeruginosa*, four T3SS effectors directly injected into human host cell are known to contribute to bacterial virulence (Engel & Balachandran, 2009). In plant pathogenic bacteria, T3SSs are associated with (i) elicitation of

the hypersensitive response (HR) in resistant host and non-host plants, and with (ii) disease induction in susceptible host plants (Büttner & Bonas, 2006). In animal- and plant-pathogenic pseudomonads, the T3SS needle complex is a key determinant of pathogeny, and T3SSs are therefore mostly regarded as virulence factors. However, *Pseudomonas* genus also include non-pathogenic species which are ubiquitous and widespread in the environment (Bossis *et al.*, 2000), especially in soils (Spiers *et al.*, 2000). These saprophytic populations of soilborne pseudomonads were shown to carry cryptic T3SSs (Mazurier *et al.*, 2004), indicating that the presence of T3SS is clearly not confined to pathogenic bacteria. Among saprophytic pseudomonads harboring T3SS, some strains appear to promote plant growth and/or health (Mulya *et al.*, 1996; Preston *et al.*, 2001; Mazurier *et al.*, 2004; Rezzonico *et al.*, 2004). In the plant growth promoting (PGPR) *P. fluorescens* SBW25, expression of T3SS genes was higher in the rhizosphere than in the bulk soil (Jackson *et al.*, 2005), and T3SS was shown to be involved in the rhizosphere competence by the use of mutants affected in T3SS genes. T3SS was also reported to be implicated in the suppression, achieved by the PGPR strain *P. fluorescens* KD, of the disease caused by *Pythium ultimum* (Rezzonico *et al.*, 2005). These studies point out a possible involvement of these secretion systems in the reciprocal interactions between fluorescent pseudomonads and eukaryotic organisms in the rhizosphere. This hypothesis is supported by our previous observations of a significant higher frequency of fluorescent pseudomonads harboring T3SS in the rhizosphere compared to bulk soil (Mazurier *et al.*, 2004). A positive selection of T3SS+ pseudomonads was also reported in the mycosphere of ectomycorrhizal and saprophytic fungi (Warmink *et al.*, 2008; Warmink & van Elsas, 2008). These observations are in favor of specific interactions in the rhizosphere promoting T3SS+ pseudomonads, however these interactions need to be further analyzed. More specifically, the contribution of T3SS, in the complex multitrophic interactions between fluorescent pseudomonads and rhizospheric fungi, remains to be explored.

Most plant species (75%) establish arbuscular mycorrhizal associations with fungi belonging to Glomeromycota (Brundrett, 2009). In the mycorrhizosphere, corresponding to the soil zone surrounding and being influenced by mycorrhizas (Rambelli, 1973), interactions are known to occur between AM fungi and fluorescent pseudomonads (de Boer *et al.*, 2005; Bonfante & Anca, 2009). The possible involvement of T3SS in these interactions was assessed in the present study. More specifically, the promotion of T3SS+ pseudomonads in the mycorrhizosphere of *Medicago truncatula* was evaluated and the contribution to the

promotion of AM fungi and the host-plant was differentiated. This was achieved by comparing the frequency and the diversity of T3SS+ fluorescent pseudomonads in isolates from (i) mycorrhizal roots (*M. truncatula* Jemalong J5 wild-type, Myc+/Nod+), (ii) non-mycorrhizal roots of a mutant impaired in its ability to establish AM symbiosis (Myc-/Nod-), and (iii) bulk soil. Since the non-mycorrhizal plant genotype also differed from the mycorrhizal wild-type by its inability to establish a nitrogen fixing symbiosis (Nod- vs Nod+), a mycorrhizal mutant impaired in its ability to nodulate (Myc+/Nod-) was included as a control to discriminate the possible influence of the fungal and bacterial symbioses on T3SS+ pseudomonad frequency.

3. Materials and methods

3.1. Plant growth conditions and bacterial strains

Medicago truncatula Gaertn. cv. Jemalong line J5 (Myc+/Nod+), and its symbiosis-defective mutants TRV48 (Myc+/Nod-) and TRV25 (Myc-/Nod-) (Sagan *et al.*, 1995) were grown in a calcic silt-clay soil (Châteaurenard, France). The main soil characteristics were as follows: clay 26.6%, silt 49.6%, sand 26.8%, pH 7.9, CaCO₃ 27.9%, total organic matter 51.4 g kg⁻¹, total N 2.79 g kg⁻¹, C/N ratio 10.7, P₂O₅ 0.801 g kg⁻¹. TRV25 is mutated for the *DMI3* (*DMI*=Doesn't Make Infection) gene (Sagan *et al.*, 1995; Catoira *et al.*, 2000) and the mutation of TRV48 has been ascribed to gene *Mtsym15* (Morandi *et al.*, 2005). Soil and germinated seeds were prepared as previously described (Pivato *et al.*, 2007). Briefly, soil was sieved at 4 mm; seeds were scarified and surface sterilized by gently shaking them in 98% sulfuric acid for 2 min, 95% ethanol for 5 min and 3.5% sodium hypochlorite solution for 10 min, and rinsed successively six times for 5 min in sterile demineralized water. Seeds were germinated on 0.7% agar (wt/vol) plates at 25°C for 48 h. One germinated seed was transplanted per cylindrical polyvinylchloride container (diameter, 7 cm; height, 20 cm) filled with 380 g of soil. After transplantation in cylindrical containers, germinated seeds were covered by 10 g of sterilized Terragreen (OilDri-US special, Mettmann, Germany). Seven containers were prepared per plant genotype. Three additional containers were filled with soil and were kept uncultivated (bulk soil). All containers were placed randomly in a growth chamber with a 16:8 h light:dark photoperiod, a 23:18°C light:dark thermoperiod, photosynthetically active radiation (PAR) of 500 μmol m⁻² s⁻¹ at pot height and 50% relative

humidity. Containers were weighed each day and water was added to maintain humidity at 55% soil water-holding capacity. They were moved randomly each day after watering.

Bacteria were isolated after 35 days of plant growth from bulk soil, rhizosphere, and rhizoplane+root tissue of the three medic genotypes (J5, TRV48, TRV25). For bulk soil, three replicates corresponding to the three containers kept uncultivated were analyzed; 10 g of soil per replicate were suspended in 100 mL of sterile water and agitated at 200 rpm for 15 min. For rhizosphere, and rhizoplane+root tissue compartments, seven replicates corresponding to the seven plants grown per plant genotype were analyzed. Each type of sample was processed as follows. Rhizosphere soil adhering to the roots was suspended in 100 mL of sterile water and agitated at 200 rpm for 15 min, 100 mL of sterile water were added, and the suspension was agitated again for 15 min. The roots were removed from the suspension and kept for the preparation of the rhizoplane+root tissue samples. The soil suspensions were mixed with a Waring Blender for 60 s. Root samples, including bacteria adhering to the root surface (rhizoplane) plus those present in the root tissues, were homogenized by blending for 2 min in 20 mL of sterile water with an Ultra-turrax homogenizer. Suspensions derived from the three different compartments were dilution-plated on King's medium B (KMB; King *et al.*, 1954) supplemented with cycloheximide (100 mg L⁻¹), chloramphenicol (13 mg L⁻¹) and ampicillin (40 mg L⁻¹) (Geels *et al.*, 1985) and incubated for 48 h at 25°C. For each suspension, three dilutions and three replicates per dilution were plated. Colonies displaying fluorescence under UV light (365 nm) were counted after 48 h. Results correspond to the means computed from the enumeration data obtained from each sample treated separately. To compare characteristics of bacterial isolates showing a similar level of occurrence, bacterial isolations from each compartment were always performed from samples diluted to the same level. Altogether, 350 bacterial fluorescent colonies were collected: 50 from the bulk soil (three replicates, 16-17 isolates per replicate), and 50 from the rhizosphere and from rhizoplane+root tissue of each plant genotype (seven plant replicates, seven to eight isolates per plant genotype replicate from the two compartments sampled, resulting in 14-16 isolates per plant genotype replicate). These 350 isolates were subjected to single colony isolation and cryopreserved at -80°C in 25% glycerol. After isolation, all *Pseudomonas* strains were cultivated on KMB agar at 25°C.

3.2. Evaluation of plant mycorrhization, nodulation and growth

Assessment of root colonization by AM fungi was performed on thirty root pieces (1 cm long each) per root system of each plant replicate. These pieces were cleared for 30 min at 60°C in 10% KOH, stained with 1% methyl blue in lactic acid and finally mounted on slides (Pivato *et al.*, 2007). The percentages of root fragments colonized by fungi (F%), the intensity of colonization of the root cortex (M%), and the arbuscular abundance in the mycorrhized root cortex (A%) of AM fungi were evaluated microscopically using the notation scale described by Trouvelot *et al.* (1986) and freely available (<http://www.dijon.inra.fr/Mychintec/Mycocalc-prg/download.html>). The presence of root nodules was checked visually on each plant replicate. Plant growth was evaluated by measuring the dry mass of shoots (80°C for 48h) for each of the seven plant replicates per treatment.

3.3. PCR amplifications

For each of the 350 bacterial isolates obtained as described previously, PCR amplifications were performed on total bacterial genomic DNA extracted and purified by using the DNeasy™ Tissue Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturers' instructions.

Presence of *hrcRST* genes coding structural components of type III secretion systems was detected by PCR using the method described previously by Mazurier *et al.* (2004). PCR reactions were conducted in a programmable thermal cycler (PTC-200, MJ Research). Primers HRCR8092 5'-CCITT(C/T)ATCGT(C/T)AT(C/T)GA(C/T)(C/T)T-3' and HRCT 8986 5'-CTGTCCCAGATIAICTGIGT-3' (where I indicates inosine) were synthesized by Eurogentec (Angers, France). Aliquots (5 µL) of the PCR products were analyzed by electrophoresis in 0.9% agarose gels stained with ethidium bromide and photographed under UV illumination.

Genomic background of the isolates was assessed by a whole-cell rep-PCR fingerprinting method. This was achieved using the primer BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') which targets the BOX repetitive DNA sequences in bacterial genomes (Versalovic *et al.*, 1994). BOX-PCR reactions were performed according to the

protocol described by Rademaker *et al.* (1997), except for the *Taq* Polymerase. Four units of *Taq* DNA polymerase (Qbiogene, Illkirsch, France) were used in each 25 μ L BOX-PCR reaction. BOX-PCR fragments were separated overnight at 40 V in a 1.5% w/v Seakem LE agarose gel in TAE buffer. For each BOX-PCR fingerprint, the presence (1) or the absence (0) of 263 bands was scored visually and a binary data matrix was established. The matrix was imported as a text file for subsequent similarity and cluster analysis in the program NTSYS-pc. A similarity matrix was calculated using the pair-wise Pearson product-moment correlation coefficient. Cluster analysis was performed by UPGMA. Isolates presenting Pearson product-moment correlation coefficients ≥ 0.75 were assigned to a BOX-PCR genotype named with a same letter (a-y).

Amplification of 16S rRNA was performed commercially by 1 MacroGen Inc. (Seoul, South Korea) using universal primers 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3'), 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'), and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') in the frame of the "16S rRNA full sequencing" service.

3.4. RFLP of *hrcRST*-PCR fragments

RFLP analysis of the *ca* 930-bp *hrcRST* PCR product amplified from the bacterial isolates was performed using the restriction enzymes *AluI*, *RsaI*, and *TaqI*. These three endonucleases were chosen for their ability to discriminate *hrcRST* genotypes previously described (Mazurier *et al.*, 2004). Restriction patterns were determined by electrophoresis at 80 V in TAE buffer with 3.5% Metaphor agarose (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France).

3.5. DNA cloning, sequencing and analysis

Before cloning, *hrcRST* PCR fragments were purified by electrophoresis in a 0.9% agarose gel in TAE, excised and extracted from the gel using the DNA Gel Extraction Kit (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) according to the instructions of the manufacturer. The pGEM-T Easy vector System II (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) was used for cloning as recommended. Nucleotide sequences of the cloned *hrcRST*

PCR fragments and of the 16S rRNA PCR fragments were determined by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

hrcRST sequences of twenty-one *Pseudomonas* strains (i) *P. aeruginosa* PAO1 and UCBPP-P14, representative of *P. aeruginosa* pathogenicity islands (PAI) PAPI T3SS (Qiu *et al.*, 2006), (ii) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, *P. viridiflava* LP23.1a and PNA3.3a, representative of *P. viridiflava* pathogenicity island T-PAI T3SS and of orthologous sequences (Araki *et al.*, 2006), (iii) *P. cichorii* 83-1, *P. viridiflava* RMX3.1b, RMX23.1a and ME3.1b, representative of *P. viridiflava* pathogenicity island S-PAI T3SS and of orthologous sequences (Araki *et al.*, 2006), (iv) *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, *P. gingeri* CFBP2810^T and *P. fluorescens* C7R12 representative of *hrcRST* cluster I previously described (Mazurier *et al.*, 2004), *P. fluorescens* CFBP11364, F113, and CFBP11367 representative of cluster II (Mazurier *et al.*, 2004), *P. fluorescens* CFBP11355, CFBP11348, SBW25, and CFBP11386, representative of cluster III (Mazurier *et al.*, 2004), were included in the analysis as references. *hrcRST* sequence of *P. mendocina* ymp, recently sequenced, was included for comparison.

Nucleotide sequence homology searches against major sequence databases were performed with program BLAST 2.2.18+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). DNA and amino acid sequences were aligned, and phylogenetic trees were reconstructed by the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987) as implemented in ClustalW2 (Thompson *et al.*, 1994). DNA distances were calculated with Kimura's two-parameter correction (Kimura, 1980). In all cases, positions with gaps in the multiple alignments were excluded from the analysis. The sequences have been deposited in EMBL and assigned accession numbers from FN666507 to FN666523 inclusive and from FN666543 to FN666559 inclusive.

3.6. Statistical analysis

Data on plant mycorrhization, root nodulation, plant growth and enumeration of fluorescent pseudomonads were submitted to a one-way ANOVA followed by pair-wise comparisons with Fisher's least significant difference test using the program StatView. A p-value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

Table 1. Quantification of mycorrhization parameters [∇].

Plant genotypes	Mycorrhization parameters [#]		
	F%	M%	A%
J5 (Myc+/Nod+)	67 a	34 x	29 α
TRV48 (Myc+/Nod-)	64 a	29 x	26 α
TRV25 (Myc-/Nod-)	0 b	0 y	0 β

[∇], mycorrhization parameters include: (i) the percentages of root fragments colonized by the fungi (F%), (ii) the intensity of colonization of the root cortex (M%), and (iii) the abundance of arbuscules in the root cortex (A%). [#], mycorrhization parameters were submitted to angular transformation of percentage values prior to statistic analyses. Within a given column, mean values with the same letter were not significantly different ($p \leq 0.05$) according to the Fisher's least significant difference test.

Kruskal-Wallis test (program JMP 7.0.1, SAS Institute, Cary, N.C.) was performed to compare, in the four experimental treatments, the proportion of T3SS+ isolates among total pseudomonads from pooled rhizosphere and root-tissue compartments. Proportions expressed as percentages were submitted to arcsine transformation prior to statistical analysis.

Chi-squared test was applied to assess differences in the occurrence frequencies of T3SS+ and T3SS- pseudomonads according to their origin (soil, plant genotype and compartment) with SAS (proc freq) software (SAS Institute, Cary, N.C.). The Yate's correction for continuity was applied to the Chi-squared test when T3SS+ theoretical frequencies of occurrence were below five.

4. Results

4.1. Growth, development, mycorrhization and nodulation of the plant genotypes

At the sampling date (35 days of plant growth), plants all reached the same development stage (shoot ramification of order 2; vegetative stage, VS3; Mougél *et al.*, 2006) and did not show any significant differences (Fisher's PLSD, p-values ranged from 0.083 to 0.697) in their growth with shoot dry weight of J5, TRV48 and TRV25 being equal to 1.86 g, 1.81 g, and 1.63 g, respectively. The absence of mycorrhizal colonization in the Myc- mutant (TRV25) and of nodule in the Nod- mutants (TRV48 and TRV25) was confirmed. The mycorrhization level of both mycorrhizal genotypes J5 and TRV48 did not differ significantly (Table 1).

4.2. Comparison of fluorescent pseudomonads harboring *hrcRST* genes in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots

Densities of the total fluorescent pseudomonad populations did not differ significantly (Fisher's PLSD, p-values ranged from 0.665 to 0.906) in the rhizosphere of the plant genotypes, 1.25×10^6 , 1.49×10^6 and 1.6×10^6 CFU g⁻¹, respectively. In the rhizoplane+root tissue compartment, there were no significant differences between the non-mycorrhizal genotype TRV25 (1×10^5 CFU g⁻¹), and each of the two mycorrhizal genotypes: J5 (2.3×10^5 CFU g⁻¹, Fisher's PLSD, p = 0.312) and TRV48 (5.14×10^4 CFU g⁻¹, Fisher's PLSD,

Table 2. Occurrence frequencies of fluorescent pseudomonads harboring *hrcRST* genes (T3SS+) or not (T3SS-). Comparison of the occurrence frequencies of T3SS+ and T3SS- fluorescent pseudomonads in mycorrhized *M. truncatula* (J5, TRV48), non-mycorrhized *M. truncatula* (TRV25), and bulk soil (A). Pairwise comparisons of the corresponding occurrence frequencies (B).

Origin	Number of isolates		Total	Pairwise comparison	Chi-square	Probability
	T3SS+ ^a	T3SS- ^b				
J5 (Myc+/Nod+)	28	72	100	J5/TRV25	21.99	< 0.0001 (S)
TRV48 (Myc+/Nod-)	20	80	100	J5/TRV48	1.34	0.2465 (NS)
TRV25 (Myc-/Nod-)	3	97	100	J5/Bulk soil	15.42	< 0.0001 (S)
Bulk soil	0	50	50	TRV48/TRV25	12.58	0.0004 (S)
				TRV48/Bulk soil	9.87	0.0017 (S)
				TRV25/Bulk soil	0.38 ^a	0.5362 (NS)
Total	51	299	350			

a, Yate's correction was applied. NS, non significant. S, significant.

$\chi^2 = 36.138$, d.f. = 3, N = 350, $p < 0.0001$. a, +, PCR product of expected size and hybridizing with the probe C7*hrcRST* as described previously (Mazurier *et al.*, 2004). b, -, no PCR visible product and no hybridization signal.

Table 3. Distribution of 49 (T3SS+) isolates of fluorescent *Pseudomonas* spp. in the *hrcRST*-RFLP groups and BOX-PCR types according to their origin.

PCR <i>hrcRST</i>	<i>hrcRST</i> -RFLP groups [∇]	BOX-PCR types	Number of T3SS+ isolates			Bulk soil
			Myc+		Myc-TRV25	
			J5	TRV48		
+	1	p	6 ₍₂₎ [∞]			
+	2	j		6 ₍₂₎		
		a	8 ₍₄₎	4 ₍₂₎		
+	3	b	1 ₍₁₎	5 ₍₂₎	2 ₍₂₎	
		Uncl.#	1 ₍₁₎			
+	4	l	9 ₍₂₎	5 ₍₁₎		
		Uncl.	1 ₍₁₎		1 ₍₁₎	
			26 ₍₆₎	20 ₍₄₎		
			46 ₍₁₀₎		3 ₍₃₎	0

∇, numbers designate the *hrcRST*-RFLP groups obtained with three restriction enzymes: 1(AAA), 2(ADA), 3(BBB) and 4 (CCC), letters designate restriction patterns obtained with *AluI*, *RsaI*, and *TaqI*, respectively. #, Uncl., unique BOX-PCR patterns that remained unclustered. ∞, numbers in brackets designate the number of plants from which the isolates originate.

$p = 0.098$). Bacterial densities were significantly the lowest in bulk soil (3.78×10^3 CFU g⁻¹, Fisher's PLSD, all p -values < 0.001), indicating an enrichment of soilborne fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of all plant genotypes.

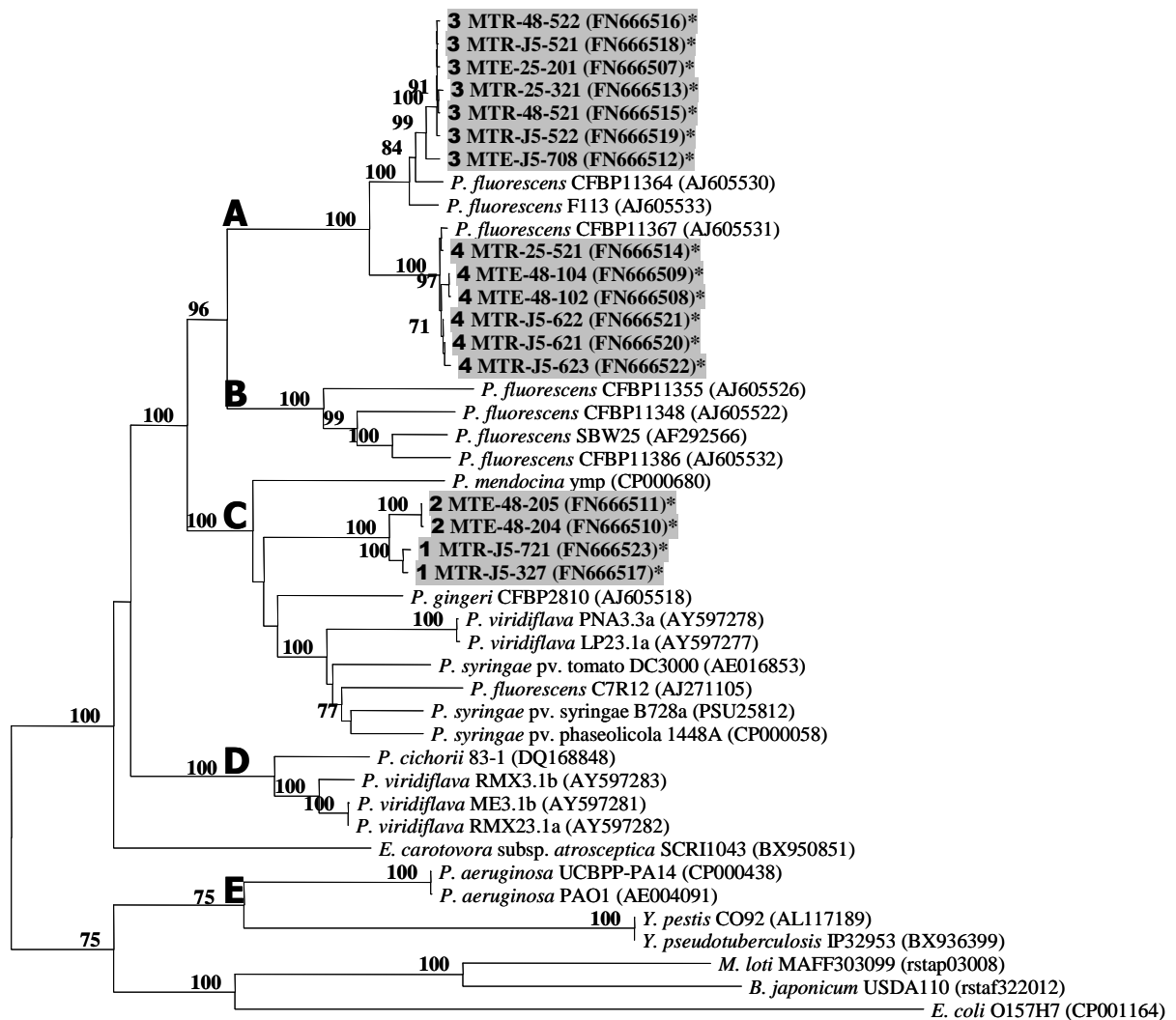
Altogether, 350 isolates of indigenous fluorescent pseudomonads were screened for the presence of three T3SS genes, *hrcR*, *hrcS*, and *hrcT*, using a PCR method previously developed for the detection of these genes in a wide range of *Pseudomonas* (Mazurier *et al.*, 2004). *hrcRST* sequences were detected by PCR in 51 of the 350 fluorescent *Pseudomonas* spp. analyzed. The proportion of these T3SS+ isolates among total populations of fluorescent pseudomonads differed significantly in mycorrhized plants, non-mycorrhized plants and bulk soil (Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 7.909$, d.f. = 3, $p = 0.048$). The distribution of the T3SS+ isolates according to the plant genotypes differed significantly upon their ability to establish mycorrhizal symbiosis (Table 2A). Forty-eight out of the 51 T3SS+ pseudomonads were detected in the mycorrhized genotypes J5 and TRV48, and only three in the non-mycorrhized genotype TRV25. None of the fluorescent pseudomonads isolated from bulk soil harbored *hrcRST* sequences. No significant difference was found between the distribution of *hrcRST*+ fluorescent pseudomonads in the mycorrhized plant genotypes, whether nodulated (J5) or not (TRV48) (Table 2B). For a given plant genotype, the occurrence frequency of T3SS+ pseudomonads did not differ significantly between the two compartments sampled, rhizosphere and rhizoplane+root tissue (17 and 11 in J5, 8 and 12 in TRV48, 2 and 1 in TRV25; $\chi^2 = 2.25$, d.f. = 1, $p = 0.325$).

4.3. Genotypic diversity of *hrcRST*+ fluorescent pseudomonads

Diversity of *hrcRST* sequences. Two of the 51 *hrcRST* positive isolates gave PCR products that were too weak to allow RFLP analysis. Analysis of the PCR fragments was performed on the 49 remaining isolates. Results are presented in Table 3. Among the *hrcRST*+ isolates, four distinct *hrcRST*-RFLP groups were delineated: group 1 (6 isolates), group 2 (6 isolates), group 3 (21 isolates), and group 4 (16 isolates). *hrcRST*+ isolates belonging to a given group originated from at least two distinct plants (Table 3). The groups 1 and 2 were closely related, as the isolates belonging to these groups shared two of the three restriction patterns.

Figure 1. Neighbour-joining tree based on alignment of 890-bp *hrcRST* sequences of *Pseudomonas* isolates obtained from *M. truncatula* roots (indicated in grey shading), and of reference strains available in genome databases. Accession numbers are indicated under brackets. Sequences obtained in this study are indicated by an asterisk (*). Bootstrap values from 1000 re-samplings are indicated for each branch as percentages, and values below 70% are not shown. For *M. truncatula* isolates, *hrcRST*-RFLP groups are indicated in bold in front of the strains name. Scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.

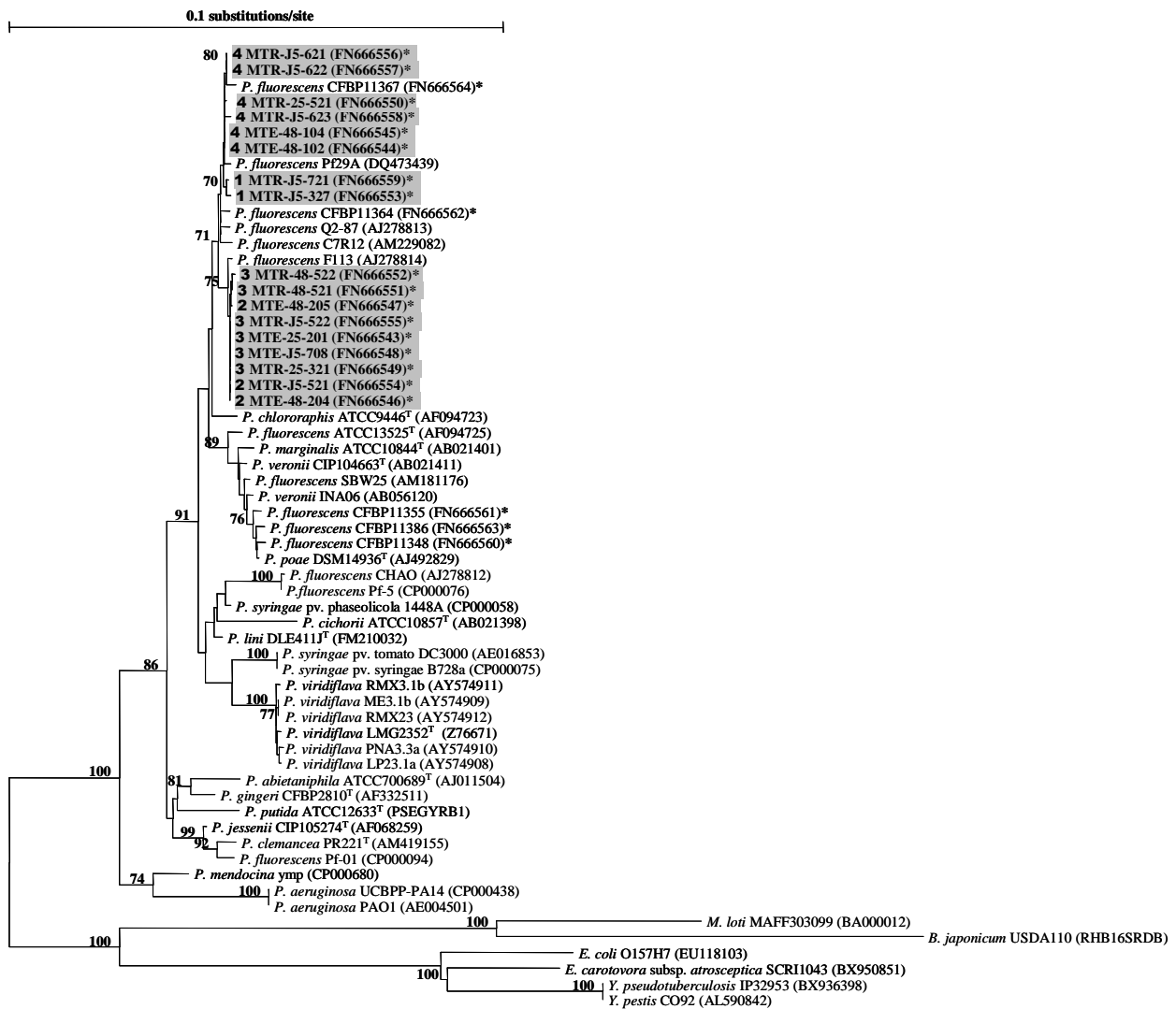
0.1 substitutions/site



All the isolates from groups 1 and 2 originated from mycorrhized plants (J5 and TRV48). Sequencing of the ca 900-bp *hrcRST* genes fragment was performed on a third of the isolates (17/51) of the four *hrcRST*-RFLP groups. Sequence similarity searches in databases were performed on *hrcRST* sequences. For all sequences of the representative strains belonging to the groups 1, 2, 3 and 4, the highest score was recorded with *P. gingeri* CFBP2810^T (81%), *P. gingeri* CFBP2810^T (80%), *P. fluorescens* CFBP11364 (95%) and *P. fluorescens* CFBP11367 (98%), respectively. Subsequent phylogenetic analysis strongly supported the classification based on *hrcRST*-RFLP and confirmed: (i) the occurrence of four distinct genotypes, and (ii) the close relationship between isolates belonging to genotypes 1 and 2 (Figure 1). Sequences of the *hrcRST*-PCR fragment were compared to the corresponding sequences of pseudomonads reference strains. The 38 *hrcRST* sequences from *Pseudomonas* (17 from isolates obtained in the present study and 21 from reference strains) were distributed into five clades (Figure 1). Isolates from *M. truncatula* were included in two of these five clades, A and C, corresponding to the *hrcRST* similarity clusters II and I (Mazurier *et al.*, 2004), respectively. Clade A encompassed isolates belonging to *hrcRST* genotypes 3 and 4, none of the isolates studied fell in clade B corresponding to *hrcRST* similarity cluster III (Mazurier *et al.*, 2004). Clade C encompassed isolates belonging to *hrcRST* genotypes 1 and 2, together with pathogenic pseudomonads and the PGPR reference strain *P. fluorescens* C7R12 (syn. CFBP5759). Clade D corresponded to phytopathogenic pseudomonads representative of *P. viridiflava* pathogenicity island S-PAI T3SS and of orthologous sequences. Finally, the *P. aeruginosa* strains, more distant from others, were grouped in Clade E.

Genotypic background of *hrcRST*⁺ isolates. The genetic diversity of the 350 fluorescent pseudomonads isolates was analyzed by BOX-PCR. At a cut-off of 75%, twenty-five BOX types, encompassing the majority (89.6%) of the isolates, were delineated (data not shown). Isolates which displayed unique BOX-PCR patterns remained unclassified (Uncl.). Among the 51 *hrcRST*⁺ isolates, 47 were distributed in five BOX types (a, b, j, l, and p), and four displayed unique BOX-PCR patterns (Table 3). There was a correlation between BOX types and *hrcRST* genotypes; all the isolates belonging to BOX types a, b, j, l, and p were *hrcRST*⁺, and within each of these BOX types, all isolates shared the same *hrcRST* genotype (Table 3). Distinct BOX types were found in isolates belonging to the *hrcRST* genotypes 3

Figure 2. Neighbour-joining tree based on alignment of 1390-bp 16S rRNA sequences of *Pseudomonas* isolates obtained from *M. truncatula* roots (indicated in grey shading), and of reference strains available in genome databases. Accession numbers are indicated in brackets. Sequences obtained in this study are indicated by an asterisk (*). Bootstrap values from 1000 re-samplings are indicated for each branch as percentages, and values below 70% are not shown. For *M. truncatula* isolates, *hrcRST*-RFLP groups are indicated in bold in front of the strains name. Scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. ^T, type strain.



and 4, suggesting a potential horizontal gene transfer. The twenty remaining BOX types only included *hrcRST*- isolates (data not shown).

Relationships between *hrcRST* and 16S rRNA genes polymorphism. 16S rRNA gene sequences were obtained for the 17 isolates representative of the four *hrcRST* genotypes and of every BOX-PCR described for the T3SS+ isolates. The results of sequence similarity searches in databases revealed that the closest relatives of these 17 pseudomonads harboring *hrcRST* genes belong to the *P. fluorescens* species: representatives of genotypes 1 and 4 shared 99% identity with *P. fluorescens* Pf29A (DQ473439) and representatives of genotypes 2 and 3 shared 99% identity with *P. fluorescens* F113 (AJ278814). Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences confirmed this close relationship since, in addition to Pf29A and to F113, T3SS+ *Medicago* isolates all clustered together with four other strains of *P. fluorescens* included as references (Figure 2). *hrcRST* genes and 16S rRNA gene phylogenies stressed distinct relationships between indigenous fluorescent pseudomonads. Indeed, on the basis of *hrcRST* sequences, the closest relationships were observed between genotypes 1 and 2 and between genotypes 3 and 4 (Figure 1), whereas 16S rRNA sequence analysis grouped together genotypes 1 and 4, and genotypes 2 and 3, respectively (Figure 2).

5. Discussion

Data from the present study demonstrate the enrichment of T3SS+ pseudomonads in the root compartments (rhizosphere, rhizoplane+root-tissue) compared to the bulk soil. Indeed, no T3SS+ pseudomonads were detected in the bulk soil whether all the T3SS+ pseudomonads isolated in the present study originated from the root compartments of *M. truncatula*. These findings are in agreement with data from a previous study using both a different soil and host-plant (Mazurier *et al.*, 2004). Since T3SSs are known to mediate intimate cellular interactions between bacteria and eukaryotes, their increased representation in the rhizosphere suggests their involvement in the complex interactions of the fluorescent pseudomonads with the host-plant. However, the rhizosphere not only includes plant roots but also other eukaryotic organisms such as associated fungi, especially those establishing AM with the roots (Smith & Read, 2008). Therefore, the promotion of T3SS+ pseudomonads in the rhizosphere could be ascribed to their interactions with the roots themselves and/or with the arbuscular mycorrhizas (AM) of the mycorrhizal roots (Nazir *et al.*, 2010).

An original approach was applied to discriminate the promotion of T3SS+ pseudomonads mediated by the roots when mycorrhized or not. This approach consisted in (i) the cultivation of genotypes of *M. truncatula*, naturally mycorrhizal or not, in a non-sterilized soil, and (ii) the frequency assessment of the T3SS+ pseudomonads associated with these plant genotypes and the corresponding bulk soil. This strategy allowed us to show that the increased density of T3SS+ pseudomonad in the rhizosphere was mostly related to AM fungal association with the roots rather than to the roots themselves. The occurrence frequency of T3SS+ pseudomonads was significantly higher in mycorrhizal (28% in J5 and 20% in TRV48) than in non-mycorrhizal roots (3% in TRV25), the latter being not significantly different from that of the bulk soil (0). The distributions of T3SS+ pseudomonads were similar in both mycorrhizal genotypes, whether nodulated or not by indigenous rhizobia, confirming the decisive role of the mycorrhizal endosymbiosis in the enrichment of T3SS+ pseudomonads. The relation between this enrichment and the presence of AM was strengthened by minimizing possible biases, especially thanks to the choice of a fertile soil supporting a similar growth of mycorrhized and non-mycorrhized plant genotypes resulting in similar carrying capacities of the plant rhizospheres for fluorescent pseudomonads. The positive selection of pseudomonads harboring T3SS genes by AM in the rhizosphere reported here is consistent with previous observations made in the mycosphere of different fungi. T3SS+ pseudomonads were shown to be enriched in the mycosphere of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria proxima* (Warmink & van Elsas, 2008) and appeared to be highly represented among isolates from the mycosphere of numerous ectomycorrhizal or saprophytic fungi (Warmink *et al.*, 2008).

M. truncatula TRV25 (Myc-/Nod-), which did not promote T3SS+ pseudomonads in contrast to J5 (Myc+/Nod+) and TRV48 (Myc+/Nod-), is known to differ from these genotypes by the absence of AM hyphae and arbuscules *in planta* but not by the epiphytic colonization of AMF. TRV25 is indeed mutated for the *DMI3* gene (Catoira *et al.*, 2000) that still allows an extensive hyphal branching and appressoria formation during the presymbiotic stage, but fully blocks the penetration of plant epidermis by the hyphae (Sagan *et al.*, 1995; Catoira *et al.*, 2000; Morandi *et al.*, 2005). The positive selection of T3SS+ pseudomonads in the rhizosphere of mycorrhized *M. truncatula* (J5 and TRV48) would therefore be related to the symbiotic and not to the presymbiotic root colonization by AMF. Further colonization of root surface by extraradical hyphae, following internal root colonization by intraradical

hyphae, may have led to an increased fungal biomass and activity, and have also contributed to the T3SS+ *Pseudomonas* promotion. This would be in agreement with the observations made by Toljander *et al.* (2006) on the attachment of fluorescent pseudomonads to extraradical hyphae after establishment of AM symbiotic association. Several other authors also reported association of pseudomonads with hyphae of AM fungi (Bianciotto *et al.*, 1996; Roesti *et al.*, 2005; Bharadwaj *et al.*, 2008; Pivato *et al.*, 2008).

From an evolutionary point of view, since the density of T3SS+ pseudomonads appears to be promoted by AM, one may expect that these bacteria would at least be non-deleterious or even beneficial to the fungal symbiosis. A similar hypothesis was previously proposed when identifying bacterial groups preferentially associated with AM, and was supported experimentally by demonstrating that these bacterial groups were indeed favorable to the mycorrhization (Offre *et al.*, 2008; Pivato *et al.*, 2009). T3SS+ pseudomonads selected by mycorrhizal roots might then be favorable to AM. Several studies have reported the ability of pseudomonads to act as mycorrhiza helper bacteria (MHB) (Frey-Klett *et al.*, 2007; Nazir *et al.*, 2010). Our hypothesis is supported by the fact that two *P. fluorescens* strains C7R12 and F113, harboring T3SS genes and included in the present study as references, were indeed previously shown to act as MHB (Barea *et al.*, 1998; Pivato *et al.*, 2009). Mechanisms underlying AM promotion by fluorescent pseudomonads potentially may be expressed during asymbiotic-presymbiotic and symbiotic stages of mycorrhizal fungi life cycle. So far, information on the beneficial effect of MHB pseudomonads mostly concerns the former (Frey-Klett *et al.*, 2007; Pivato *et al.*, 2009; Nazir *et al.*, 2010). As examples, the two MHB strains C7R12 and F113 were previously shown to promote the saprophytic growth and root colonization by AM fungi (Barea *et al.*, 1998; Pivato *et al.*, 2009). Enrichment of T3SS+ pseudomonads in the rhizosphere during the symbiotic stage of AM fungi life cycle suggests for the first time that T3SS might play a role in the MHB effect during that phase of the AMF life. However, one should keep in mind that the observations were made on a limited number of isolates meaning that only the most abundant populations of fluorescent pseudomonads harboring *hrcRST* genes were taken in account. Additional data relying on the quantification of these genes by qPCR on the whole pseudomonad community, following a similar approach as that followed by Warmink and van Elsas (2008), would therefore strengthen and extend our observations and conclusions.

The diversity of T3SS+ and T3SS- pseudomonads was compared on the basis of their BOX types. The corresponding results indicated that their genetic background differ, suggesting that they have evolved separately.

Among T3SS+ pseudomonads, diversity of T3SSs was characterized on the basis of the polymorphism of *hrcRST* sequences. Data from our study support the relevance of the *hrcRST* sequence as a marker for T3SS phylogeny analysis among pseudomonads. Indeed, the sequence analysis of *hrcRST* fragments (i) allowed the discrimination of the strains, representative of the three T3SS-associated pathogenicity islands, PAPI, T-PAI and S-PAI, in three distinct clades, and (ii) confirmed the phylogeny, previously obtained with 25 PAI genes, of the phytopathogenic strains *P. viridiflava* PNA3.3a, LP23.1a, RMX3.1b, RMX23.1a, ME3.1b, *P. cichorii* 83-1, and *P. syringae* DC3000 (Araki *et al.*, 2006). Phylogeny analysis of *hrcRST* in pseudomonads isolated from mycorrhizal and non-mycorrhizal roots indicate that they were distributed in two clades (A & C) well differentiated, suggesting that the corresponding sequences have evolved separately. Clade A encompassed, together with other rhizospheric strains, the majority of the pseudomonads isolated from medic rhizosphere distributed in genotypes 3 and 4. In contrast, clade C included pseudomonads isolated in the present study (genotypes 1 & 2), that were only isolated from mycorrhizal roots, together with phytopathogenic pseudomonads. These results indicate that, on the basis of their T3SS gene sequences, pseudomonads exclusively associated with mycorrhizal roots are more closely related to pathogenic pseudomonads than those associated with mycorrhizal and not mycorrhizal roots.

Incongruencies were found between the *hrcRST* and 16S rRNA phylogenies. Indeed, genotypes distributed in the two distinct *hrcRST* clades A and C were included in two groups taxonomically very close and related to *Pseudomonas* strains previously assigned to the species *fluorescens*. These incongruencies may not be surprising as horizontal gene transfer is considered to be a major force in T3SSs evolution (Gophna *et al.*, 2003, Pallen *et al.*, 2005). These results are compatible with an evolution scheme previously described among phytopathogenic pseudomonads. Araki *et al.* (2006) found two paralogous T3SS-associated pathogenicity islands in *P. viridiflava*. One PAI was associated with increased virulence on tobacco and decreased virulence on *Arabidopsis*, while the other confers the opposite host-specific virulence phenotypes. Balancing selection appears to be maintaining each PAI within

this species, perhaps because of the heterogeneous distribution of possible hosts (Araki *et al.*, 2006).

In conclusion, the data presented in this study confirm the enrichment of T3SS+ in the rhizosphere and indicate that this enrichment is related to the mycorrhizal association and not to the roots themselves. These observations suggest that T3SSs may mediate interactions between these bacteria and arbuscular mycorrhizas. The possible involvement of T3SS in the AM promotion by *P. fluorescens* C7R12 is currently under investigation. Further studies of T3SS+ pseudomonads are required to shed new light on host-microorganism interactions and thus bring additional comprehensive information on the mechanisms implied in complex interactions in the rhizosphere between pseudomonads and eukaryotes.

6. Acknowledgments

This work was funded by the Regional Council of Burgundy, RCB (Dijon, France). This work was supported by a doctoral grant to A. Viollet by 'Conseil Régional de Bourgogne' and INRA (EA, SPE). Thanks to Joy Bergelson (University of Chicago, USA) for kindly providing *P. viridiflava* and *P. cichorii* PAI and 16S rRNA sequences. The authors are grateful to Gerard Duc for providing medic seeds, to Dirk Redecker for re-reading the manuscript and discussions, and to Matt Shirley for correcting the English text.

7. References

- Araki H, Tian D, Goss EM, Jakob K, Halldorsdottir SS, Kreitman M & Bergelson J (2006) Presence-absence polymorphism for alternative pathogenicity islands in *Pseudomonas viridiflava*, a pathogen of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5887-5892.
- Barea JM, Andrade G, Bianciotto V, Dowling D, Lohrke S, Bonfante P, O'Gara F & Azcón-Aguilar C (1998) Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. *Appl Environ Microbiol* 64: 2304-2307.
- Bharadwaj DP, Lundquist PO, Persson P & Alström S (2008) Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 310-322.
- Biancotto V, Minerdi D, Perotto S & Bonfante P (1996) Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasts* 193: 123-131.

- Bonfante P & Anca IA (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol* 63: 363-383.
- Bossis E, Lemanceau P, Latour X & Gardan L (2000) Taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20: 51-63.
- Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37-77.
- Büttner D & Bonas U (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* 9: 193-200
- Catoira R, Galera R, de Billy F, Penmetsa V, Journet EP, Mailler F, Rosenberg C, Cook D, Gough C & Dénarié J (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12: 1647-1665.
- Coomes BK (2009) Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Trends Microbiol* 17: 89-94.
- de Boer W, Folman LB, Summerbell RC & Boddy L (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* 29: 795-811.
- Engel J & Balachandran P (2009) Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12: 61-66.
- Frey-Klett P, Garbaye J & Tarkka M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22-36.
- Geels FP, Schmidt EDL & Schippers B (1985) The use of 8-hydroxyquinoline for the isolation and prequalification of plant growth-stimulating rhizosphere pseudomonads. *Biol Fert Soils* 1: 167-173.
- Gophna U, Ron EZ & Graur D (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal transfer events. *Gene* 312: 151-163.
- Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.
- Jackson RW, Preston GM & Rainey PB (2005) Genetic characterization of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 *rsp* gene expression in the phytosphere and *in vitro*. *J Bacteriol* 187: 8477-8488.
- Johansson JF, Paul LR & Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 1-13.
- Kimura M (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- King EO, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44: 301-307.

- Mazurier S, Lemunier M, Siblot S, Mougél C & Lemanceau P (2004) Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol Ecol* 49: 455-467.
- Mazurier S, Lemunier M, Hartmann H, Siblot S & Lemanceau P (2006) Conservation of type III secretion system genes in *Bradyrhizobium* isolated from soybean. *FEMS Microbiol Lett* 259: 317-325.
- Morandi D, Sagan M, Prado-Vivant E & Duc G (2005) Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza* 15: 283-289.
- Mougél C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, Robin C & Lemanceau P (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different development stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytol* 170: 165-175.
- Mulya K, Takikawa Y & Tsuyumu S (1996) The presence of regions homologous to *hrp* cluster in *Pseudomonas fluorescens* PfG32R. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 62: 355-359.
- Nazir R, Warmink JA, Boersma H & van Elsas JD (2010) Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbiol Ecol* 71: 169-185.
- Offre P, Pivato B, Mazurier S, Siblot S, Berta G, Lemanceau P & Mougél C (2008) Microdiversity of Burkholderiales associated with mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 180-192.
- Pallen MJ, Beatson SA & Bailey CM (2005) Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Rev* 29: 201-229.
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougél C & van Tuinen D (2007) *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytol* 176: 197-210.
- Pivato B, Gamalero E, Lemanceau P & Berta G (2008) Cell organization of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 on adventitious roots of *Medicago truncatula* as affected by arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiol Lett* 289: 173-180.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougél C, Lemanceau P & Berta G (2009) Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19: 81-90.
- Preston GM, Bertrand N & Rainey B (2001) Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Mol Microbiol* 41: 999-1014.
- Preston GM (2007) Metropolitan microbes: type III secretion in multihost symbionts. *Cell Host Mic* 2: 291-294.
- Qiu X, Gurkar AU & Lory S (2006) Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19830-19835.
- Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P & de Bruijn FJ (1997) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 665-677.

- Rambelli A (1973) The rhizosphere of mycorrhizae. In: Ectomycorrhizae (Marks GL & Koslowski TT, Ed.), pp 299-343. Academic Press, New York, USA.
- Rezzonico F, Défago G & Moëne-Loccoz Y (2004) Comparison of ATPase-encoding type III secretion system *hrcH* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and in phytopathogenic proteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 5119-5131.
- Rezzonico F, Binder C, Défago G & Moëne-Loccoz Y (2005) The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 991-1001.
- Roesti D, Ineichen K, Braissant O, Redecker D, Wiemken A & Aragno M (2005) Bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Appl Environ Microbiol* 71: 6673-6679.
- Sagan M, Morandi E, Tarengi E & Duc G (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after gamma-ray mutagenesis. *Plant Sci* 111: 63-71.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Smith SE & Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press, London, United Kingdom.
- Sorg I & Cornelis GR (2009) The type III secretion system. In: Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis (Karl Wooldridge, Ed.), pp 93-116. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Spiers AJ, Buckling A & Rainey PB (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol* 146: 2345-2350.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Toljander JF, Artursson V, Paul LR, Jansson JK & Finlay RD (2006) Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiol Lett* 254: 34-40.
- Trouvelot A, Kough JL & Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae (Gianinazzi-Pearson V & Gianinazzi S, Eds.), pp 217-221. INRA Presse, Paris, France.
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ & Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Meth Mol Cell Biol* 5: 25-40.
- Warmink JA, Nazir R & van Elsas JD (2008) Universal and species-specific bacterial "fungiphiles" in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environ Microbiol* 11: 300-312.
- Warmink JA & van Elsas JD (2008) Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? *ISME J* 2: 887-900.

Bilan

Les résultats obtenus indiquent que les *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3 sont préférentiellement associés aux racines mycorhizées de *M. truncatula* J5 plutôt qu'aux racines non mycorhizées de TRV25 et au sol nu de Châteaurenard. Ces résultats confirment les travaux précédents qui mettaient en évidence une augmentation de densité des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ liée à la rhizosphère (Mazurier *et al.*, 2004). Ces résultats montrent également que ce n'est pas la plante seule qui est à l'origine de la présence accrue des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ dans la rhizosphère, mais que la présence des racines mycorhizées est déterminante. Ces résultats suggèrent que les *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ pourraient jouer un rôle dans les interactions entre *M. truncatula* et les champignons mycorhizogènes à arbuscules.

Cette étude a montré que les *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ s'associaient préférentiellement aux racines mycorhizées (J5 et TRV48) plutôt qu'aux racines non mycorhizées de TRV25. TRV25 est un mutant dont le gène *DMI3* codant une calcium/calmoduline protéine kinase (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2006) est inactivé (Catoira *et al.*, 2000). Pour cette plante, le stade présymbiotique du cycle de vie des CMA est préservé, caractérisé par la ramification des hyphes extraradiculaires et la formation des appressoria, mais un blocage total de la pénétration des hyphes dans la racine de la plante est observé (Sagan *et al.*, 1995 ; Catoira *et al.*, 2000 ; Morandi *et al.*, 2005). Ainsi, ces résultats suggèrent que la présence accrue des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ n'est pas seulement liée à la présence des CMA mais que la colonisation de la racine avec le développement du mycélium intraradriculaire et/ou la formation associée d'arbuscules sont également déterminants. Les SST3 des *Pseudomonas* pourraient donc être impliqués dans les interactions avec les mycorhizes fonctionnelles plutôt qu'avec les champignons mycorhizogènes à un stade présymbiotique.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les SST3 joueraient un rôle dans les interactions *Pseudomonas*-champignons ectomycorhizogènes émise récemment par Warmink *et al.* (2008) et Warmink et van Elsas (2008). Rezzonico *et al.* (2005) ont également montré que ce ne serait pas avec la plante que

le SST3 de *P. fluorescens* KD interagirait mais avec un oomycète phytopathogène. La présence du SST3 induit une diminution de la production d'une polygalacturonase par *Pythium ultimum* ce qui protège le concombre contre la maladie induite par ce pathogène (Rezzonico *et al.*, 2005). Nos résultats indiquent que cette interaction entre les *Pseudomonas* SST3+ et les organismes fongiques pourrait s'étendre au phylum des Glomeromycota et que l'implication du SST3 pourrait être généralisée aux interactions plantes-bactéries-champignons.

Les résultats obtenus dans l'étude de diversité de gènes marqueurs des SST3 et du fond génétique des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+, sont compatibles avec un schéma évolutif des SST3 déjà décrit chez les *Pseudomonas* pathogènes (Araki *et al.*, 2006 ; Gophna *et al.*, 2003 ; Pallen *et al.*, 2005). Les isolats SST3+ de la rhizosphère de *M. truncatula* n'appartiennent pas à une espèce connue comme étant pathogène de la plante et l'analyse des séquences d'ARNr 16S les apparente à des *P. fluorescens* dont certains sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la croissance et la santé des plantes (*P. fluorescens* F113 et *P. fluorescens* C7R12).

Cette première étude expérimentale nous a donc permis de progresser dans la connaissance des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ et de préciser des hypothèses concernant l'activité de ces bactéries. L'observation d'un lien entre la présence des racines mycorhizées et la fréquence accrue des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ a orienté la suite de notre travail. Dans l'hypothèse d'un rôle de ces bactéries associé à la mycorhization, dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les *Pseudomonas* SST3+ pourraient avoir un effet sur différents paramètres relatifs à la mycorhization.

CHAPITRE III

Implication du système de sécrétion de type III dans la promotion de la mycorhization de la plante *Medicago truncatula* par *Pseudomonas fluorescens* C7R12

Viollet, A., Corberand, T., Pivato, B., Lemanceau, P. et Mazurier, S. **(soumis)**. Type three secretion system is involved in the promotion of arbuscular mycorrhization of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12. *New Phytologist*.

Avant propos _____	68
Type three secretion system is involved in the promotion of arbuscular mycorrhization of <i>Medicago truncatula</i> by <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12.....	70
1. Summary _____	70
2. Introduction _____	71
3. Materials and methods _____	73
3.1. Microorganisms used and plant growth conditions	
3.2. Construction of a <i>hrcC</i> negative mutant of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12	
3.3. Spore germination and hyphal growth of <i>Glomus mosseae</i> <i>in vitro</i> assay	
3.4. Bacterial survival in the plant rhizosphere	
3.5. Evaluation of plant mycorrhization and biomass	
4. Results _____	75
4.1. Construction of a <i>hrcC</i> negative mutant of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12	
4.2. Compared effects of C7R12 and its <i>hrcC</i> - mutant on the saprophytic growth of <i>Glomus mosseae</i> BEG12	
4.3. Survival kinetics of C7R12 and its <i>hrcC</i> - mutant in medic rhizosphere	
4.4. Compared effects of C7R12 and its <i>hrcC</i> - mutant on root colonization by indigenous AM fungi and on plant growth	
5. Discussion _____	77
6. Acknowledgements _____	79
7. References _____	79
Bilan _____	83

Avant propos

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'élément déterminant de la rhizosphère, lié à l'accroissement de la fréquence des *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3, était la présence de la mycorhization fonctionnelle des racines de la plante. Nous avons alors émit l'hypothèse que ces bactéries SST3+ pourraient jouer un rôle dans les interactions entre *M. truncatula* et les CMA. Par conséquent, il apparaissait important de chercher à préciser ce rôle.

Dans l'étude présentée dans ce chapitre, nous avons donc cherché à savoir si le SST3 d'une souche particulière de *Pseudomonas* spp. fluorescents pourrait effectivement avoir une influence sur la mycorhization. Pour cela, nous avons choisi de suivre une approche de type 'souche modèle' avec la souche sauvage *P. fluorescens* C7R12 chez qui des gènes de SST3 ont été identifiés (gènes *hrcRST* ; Mazurier *et al.*, 2004). Récemment, des travaux ont montré l'effet MHB de C7R12 qui est capable de promouvoir la colonisation des racines de *M. truncatula* par les champignons mycorhizogènes (Pivato *et al.*, 2009). Ces auteurs ont également montré *in vitro* que *P. fluorescens* C7R12 est capable de promouvoir la croissance saprophyte et la colonisation des racines par le CMA *Glomus mosseae* BEG12 (Pivato *et al.*, 2009).

Dans les milieux naturels, les racines des plantes sont mycorhizées par différents champignons (Golotte *et al.*, 2004 ; Sýkorová *et al.*, 2007). En outre, il a été montré que différents champignons mycorhizogènes peuvent avoir des effets différents sur la croissance et la santé des plantes (Taylor et Harrier, 2000 et 2001). Afin d'étudier les effets du fonctionnement du SST3 de *P. fluorescens* C7R12 sur la mycorhization, nous avons donc fait le choix d'étudier ces effets en sol naturel non stérile dans le but de conserver la diversité naturelle des champignons mycorhizogènes indigènes.

L'objectif de ce travail est donc de déterminer si le SST3 de C7R12 est impliqué dans les effets bénéfiques de cette bactérie sur la mycorhization. Nous avons comparé les effets induits par *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et par son mutant *P. fluorescens* C7SM7 dont le SST3 a été inactivé (SST3-) sur (i) la croissance de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5

(Myc+/Nod+), (ii) la germination *in vitro* des spores et la croissance des tubes germinatifs du CMA *G. mosseae* BEG12, (iii) les paramètres de colonisation des racines de *M. truncatula* par les CMA indigènes du sol de Mas d'Imbert (France) et (iv) la nodulation par des symbiotes fixateurs d'azote de *M. truncatula*.

Type three secretion system is involved in the promotion of arbuscular mycorrhization of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12

Amandine Viollet, Thérèse Corberand, Barbara Pivato†, Philippe Lemanceau, Sylvie Mazurier*

INRA, Université de Bourgogne, UMR 1229 'Microbiologie des Sols et de l'Environnement', CMSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France

†Current address: Université Lyon, Ecole Centrale Lyon, UMR CNRS 5005 'Laboratoire Ampère', 36, avenue Guy de Collongue 69134 Ecully cedex, France

Total number of tables: 1

Total number of figures: 3

Total number of references: 47

Number of pages: 18

Keywords: arbuscular mycorrhiza, mycorrhiza helper bacteria, *Pseudomonas*, type three secretion system

***Corresponding author:** Sylvie Mazurier

Address: INRA, CMSE, UMR 1229 MSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex

Phone: 33 3 80 69 30 93

Fax: 33 3 80 69 32 24

E-mail: sylvie.mazurier@dijon.inra.fr

1. Summary

- Frequency of fluorescent pseudomonads harbouring sequences encoding type three secretion systems (T3SS) was previously shown to be significantly promoted by arbuscular mycorrhizas (AM) in *Medicago truncatula*.

- In the present study, we tested on the other way round, the possible involvement of T3SS in the promotion of AM. Mycorrhization of *M. truncatula*, cultivated in a non sterile soil, was compared when inoculated with the mycorrhiza helper bacteria (MHB) *Pseudomonas fluorescens* C7R12 harbouring a T3SS and with a *hrcC*- mutant obtained by site directed mutagenesis. The impaired functioning of the T3SS in the *hrcC*- mutant was confirmed by the absence of induction of hypersensitive reaction in tobacco.
- The WT strain C7R12 enhanced significantly the mycorrhization rate whereas the *hrcC*- mutant did not. However, the two strains did not differ in their ability to promote *in vitro* the growth of *Glomus mosseae*. These observations suggest that the bacterial promotion of AM mediated by T3SS is expressed during the plant-fungal interaction rather than during the presymbiotic growth of AM fungi.
- Taken together, these data provide evidence for the T3SS contribution to the interactions between fluorescent pseudomonads, host-plant and AM fungi, and give insights into the mechanisms involved in the MHB effect.

2. Introduction

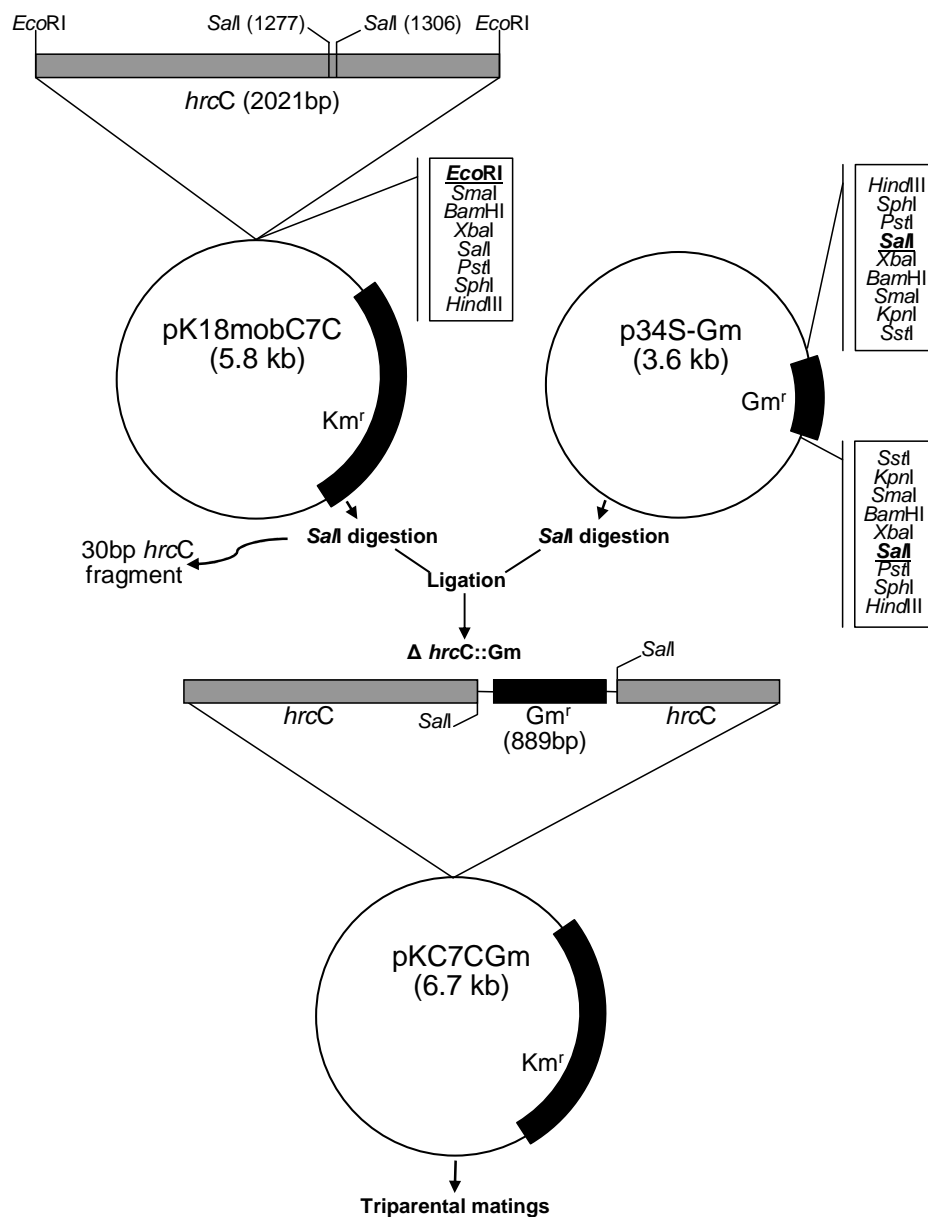
In natural conditions, most plant roots are associated with mycorrhizal fungi in a symbiotic interaction beneficial to plant growth and health (Smith & Read, 2008). Cultivation and non-cultivation approaches provided evidence that bacterial populations from the mycorrhizosphere, *i.e.* the soil surrounding and influenced by mycorrhizas (Rambelli, 1973), differ from those of the bulk soil. This applies to ectomycorrhizas (Frey *et al.*, 1997; Rangel-Castro *et al.*, 2002; Frey-Klett *et al.*, 2005; Calvaruso *et al.*, 2007; Uroz *et al.*, 2007) and arbuscular endomycorrhizas (Artursson *et al.*, 2006; Offre *et al.*, 2007, 2008; Singh *et al.*, 2008). Bacterial communities associated with mycorrhizal and non-mycorrhizal roots were further shown to differ (Linderman, 1997; Timonen *et al.*, 1998; Marschner *et al.*, 2001; Artursson *et al.*, 2005; Offre *et al.*, 2007, 2008). We have for example shown that the genetic structure of the bacterial communities in the rhizosphere of a mycorrhized medic WT differed significantly from that of a medic mutant impaired in its ability to establish arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis (Offre *et al.*, 2007). Bacterial groups (*Comamonadaceae* and *Oxalobacteraceae*) explaining these differences were further identified and their diversity characterized (Offre *et al.*, 2008).

Bacteria isolated from the mycorrhizosphere have been commonly reported to act as mycorrhiza helper bacteria (MHB; Duponnois & Garbaye, 1990; Garbaye & Bowen, 1989; Poole *et al.*, 2001; Frey-Kett *et al.*, 2007; Pivato *et al.*, 2009) according to the definition of Garbaye (1994), suggesting that bacterial populations associated with mycorrhiza would play a major role in the fungal symbiosis (Tarkka *et al.*, 2009). Bonfante & Anca (2009) have even recently proposed that mycorrhizas could be considered as tripartite associations between fungi, plant and bacteria.

Pseudomonads are well represented in the bacterial populations of the mycorrhizosphere (de Boer *et al.*, 2005) and the MHB described so far (Frey-Klett *et al.*, 2007). Among *pseudomonad* populations, differences were reported in those associated with mycorrhizosphere or not (Frey *et al.*, 1997; Viollet *et al.*, submitted for publication). An increased frequency of *Pseudomonas* harbouring T3SS genes (T3SS+) in the vicinity of ectomycorrhizal fungi (Warmink *et al.*, 2008; Warmink & van Elsas, 2008) and of endomycorrhizal roots (Viollet *et al.*, submitted for publication) has been reported. The increased frequency of T3SS+ populations in the mycorrhizosphere suggests that they would at least be non-deleterious or even beneficial to mycorrhization. Since T3SSs are known to mediate cellular interactions between prokaryotes and eukaryotes, one may suggest that these secretion systems could be involved in interactions between bacteria and AM fungi, and possibly account for the MHB effect.

Our objectives were therefore to assess the possible contribution of T3SS in the AM promotion by a *Pseudomonas* model strain. The strain chosen, *P. fluorescens* C7R12, is known to promote both saprophytic growth and root colonization of *M. truncatula* by the AM fungus *G. mosseae* BEG12 (Pivato *et al.*, 2009) and to harbour T3SS-like genes (T3SS+) as indicated by the presence of *hrcRST* sequences in its genome (Mazurier *et al.*, 2004). The strategy consisted in comparing the effects of *P. fluorescens* C7R12 and its *hrcC*- mutant on the *in vitro* saprophytic growth of *G. mosseae* BEG12 and on the root colonization by indigenous AM fungi of *M. truncatula* cultivated in unsterile soil.

Figure 1. Construction of a suicide vector containing the deleted *hrcC* gene with an insertion consisting of a gentamicin resistance (Gm^r) gene. A 2021-bp fragment of the *hrcC* gene of *P. fluorescens* C7R12 firstly PCR amplified and cloned into the pGEMT Easy Vector System II (Promega, Charbonnières, France) was then transferred into pK18mobC7C (Katzen *et al.*, 1999) by ligation of an *EcoRI* fragment containing *hrcC* into the *EcoRI* digested plasmid yielding pK18C7C. A 886-bp *SalI* fragment containing the gentamicin resistance cassette from p34S-Gm was ligated into the *SalI* sites of pK18C7C yielding pKC7CGm. The suicide vector was introduced in C7R12 *via* triparental mating in order to replace the WT chromosomal copy of *hrcC* of *P. fluorescens* C7R12 by a copy of the deleted gene with an insertion of a gentamicin resistance cassette after homologous recombination.



3. Materials and methods

3.1. Microorganisms used and plant growth conditions

Pseudomonas fluorescens C7R12 is a spontaneous mutant resistant to rifampin (Eparvier *et al.*, 1991) of the wild-type (WT) strain C7 (Lemanceau *et al.*, 1988). C7R12 has been shown to be a biocontrol agent (Lemanceau & Alabouvette, 1991), to promote plant growth and arbuscular mycorrhization (Pivato *et al.*, 2009), and to be rhizosphere competent (Eparvier *et al.*, 1991; Mirleau *et al.*, 2001). A *hrcC*- mutant (C7SM7) of C7R12 was obtained in the present study as described below. *Pseudomonas* strains were grown at 25°C in King's B medium (KB; King *et al.*, 1954) or Luria broth medium (LB; Sambrook & Russel, 2001). *Escherichia coli* helper and host strains for plasmids were grown in LB medium at 37°C. The antibiotics incorporated into these media were gentamicin (10 µg mL⁻¹), ampicillin (10 µg mL⁻¹), kanamycin (50 µg mL⁻¹), and rifampin (100 µg mL⁻¹). Sporocarps of the AM fungi *Glomus mosseae* (Nicol. and Gerd.) Gerdemann & Trappe BEG12 were obtained from Agrauxine-Biorize (Dijon, France).

Plants (*Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5) were grown in a silt-clay loam soil (Mas d'Imbert, France), as previously described (Offre *et al.*, 2007). Plants were either non inoculated (control), inoculated with *P. fluorescens* C7R12 or with C7SM7 (10⁷ colony forming units per gram of soil). For each treatment, five plants were sampled 49, 63 and 91 days after inoculation.

3.2. Construction of a *hrcC* negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* C7R12

Using primers HRCC308 5'-ACCCC(A/C)GAAGCCTGGAAACA-3' and HRCC2334 5'-CCC(C/T)(G/T)GAGCAGTGA(C/T)GGCC-3' a 2021-bp fragment of the *hrcC* genes of C7R12 was amplified. The PCR fragment was first cloned into the pGEMT Easy Vector System II (Promega, Charbonnières, France) and then transferred into pK18mobC7C (Katzen *et al.*, 1999) by ligation of an *EcoRI* fragment (Fig. 1). A suicide vector, pKC7CGm, carrying a copy of a deleted *hrcC* gene with an insertion of the gentamicin (Gm) resistance cassette from plasmid p34S-Gm (Dennis & Zylstra, 1998), was constructed as presented in figure 1. pKC7CGm was transferred into *E. coli* DH10B by electrotransformation. DH10B pKC7CGm

transformants were selected on LB medium supplemented with gentamicin and kanamycin and used as donor strains in triparental matings in order to transfer pKC7CGm into C7R12. *E. coli* 803 pRK2013 was the helper strain used. Potential recombinants of C7R12 showing double crossing-over were selected for their gentamicin resistance and kanamycin sensitivity on LB medium. Southern blot analysis of chromosomal DNA of *P. fluorescens* C7R12 and of the *hrcC*- mutant was performed to check the replacement of the WT chromosomal copy of the *hrcC* gene with the copy with the deletion and containing the gentamicin resistance cassette. Phenotypes of C7SM7 and C7R12 were compared for (i) their ability to induce Hypersensitive Reaction (HR) as described by Klement (1963), (ii) their growth kinetics (24, 48, and 72 h) in liquid LB (OD 600 nm and enumeration on solid KB), and (iii) the production of siderophore (culture in liquid KB, OD 400 nm of supernatants with pH adjusted to 7) and indole acetic acid (IAA; 'PC' procedure; Glickmann & Dessaux, 1995).

3.3. Spore germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro* assay

Spores of *G. mosseae* BEG12 were isolated from sporocarps and surface sterilised (Pivato *et al.*, 2009). *In vitro* spore germination and hyphal growth of *G. mosseae* BEG12 was assessed as described by Pivato *et al.* (2009). Briefly, eight spores were placed at the surface of the agar (1% Bactoagar, Fluka, Buchs, Switzerland) per plate in the presence or not of bacteria at 10^7 colonies forming units (CFU) mL^{-1} . Each treatment was replicated in 15 plates. Percentage of spore germination and hyphal length were measured after seven days' incubation at 25°C in the dark.

3.4. Bacterial survival in the plant rhizosphere

Adhering soil was removed from the roots by shaking them twice in a flask containing sterile distilled water at 200 rpm (Agitests, Bioblock Scientific, Illkirch, France) for 20 min, the water volume differed according to the root mass (10 mL g^{-1} root). Serial dilutions were plated in five replicates on KB medium supplemented with rifampin and cycloheximide (100 mg L^{-1}), chloroamphenicol (13 mg L^{-1}) and ampicillin (40 mg L^{-1}). CFU were counted after 48 h incubation and expressed per gram of dry soil. Results corresponded to the means computed from the enumeration results obtained from each of the five plant replicate treated separately.

Table 1. Effect of *P. fluorescens* C7R12 and *hrcC*- mutant C7SM7 on spore germination and hyphal growth of *G. mossae* BEG12.

Treatment	Germination (%)	Hyphal length (mm)
BEG12	0 a	0 a
BEG12+C7R12	10.9 b	16.6 b
BEG12+C7SM7	12.2 b	17.7 b

Observations were made after seven days of incubation. Means with the same letter are not significantly different according to Fisher's least significant difference test ($P \leq 0.1$).

3.5. Evaluation of plant mycorrhization and biomass

Assessment of root colonization by AM fungi was performed on thirty root pieces (1 cm long each) per root system as described by Pivato *et al.* (2007). The percentages of root fragments colonized by fungi (F%), the intensity of colonization of the root cortex (M%), and the arbuscular abundance in the mycorrhized root cortex (A%) of AM fungi were evaluated microscopically using a notation scale (Trouvelot *et al.*, 1986) freely available (<http://www.dijon.inra.fr/Mychintec/Mycocalc-prg/download.html>). Root nodules were removed from the root surface, counted and weighted. Mass of fresh roots and shoots was measured.

4. Results

4.1. Construction of a *hrcC*- negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* C7R12

The *hrcC*- mutant, C7SM7, was constructed by disrupting the *hrcC* gene in the WT strain C7R12. Southern blot analysis on digested chromosomal DNA from C7R12 and C7SM7 confirmed the allelic exchange of the *hrcC* gene in the C7SM7 mutant as described in figure 1. The impaired functioning of the T3SS in *hrcC*- mutant was confirmed by the loss of its ability to induce HR on tobacco leaf compared to the WT strain. Beside that difference, all phenotypic parameters tested *in vitro* (growth kinetics, IAA and siderophore production) were similar in both strains (data not shown). Taken together, these data indicate that the *hrcC*-mutant C7SM7 only differed from the WT strain by its impaired T3SS functioning, and therefore validate the use of C7SM7 for assessing the impact of T3SS on AM.

4.2. Compared effects of C7R12 and its *hrcC*- mutant on the saprophytic growth of *Glomus mosseae* BEG12

No saprophytic growth, spore germination and germ tube length, could be detected when *G. mosseae* BEG12 was incubated in the absence of bacteria (Table 1). In contrast, fungal growth occurred in the presence of both bacterial strains with a rate of spore germination ranging from 10.9 to 12.2% and an average germ tube length ranging from 16.6

Figure 2. Effects of inoculation of *P. fluorescens* C7R12 and *hrcC*- mutant C7SM7 on *M. truncatula* root colonization by indigenous AM fungi from the Mas d'Imbert soil in comparison with the uninoculated control on (a) the intensity of colonization of the root cortex (M%), and (b) the abundance of arbuscules in the mycorrhizal root cortex (A%). Bars with the same letter are not significantly different according to Fisher's least significant difference test ($P \leq 0.05$).

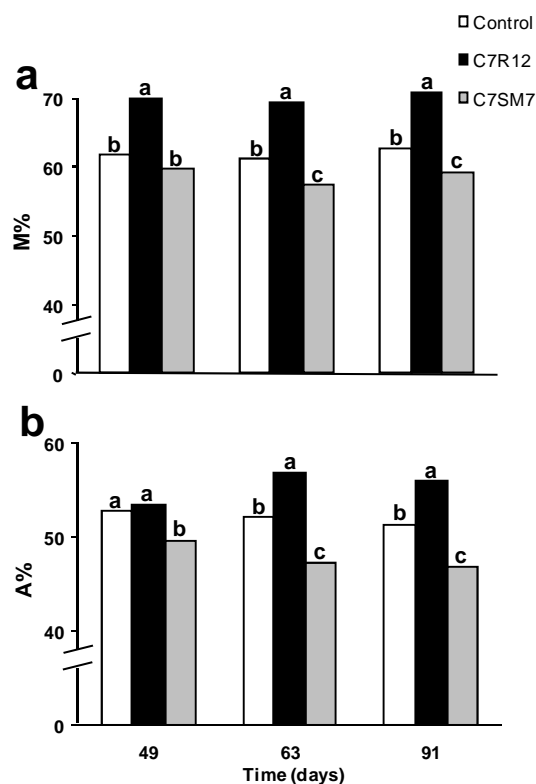
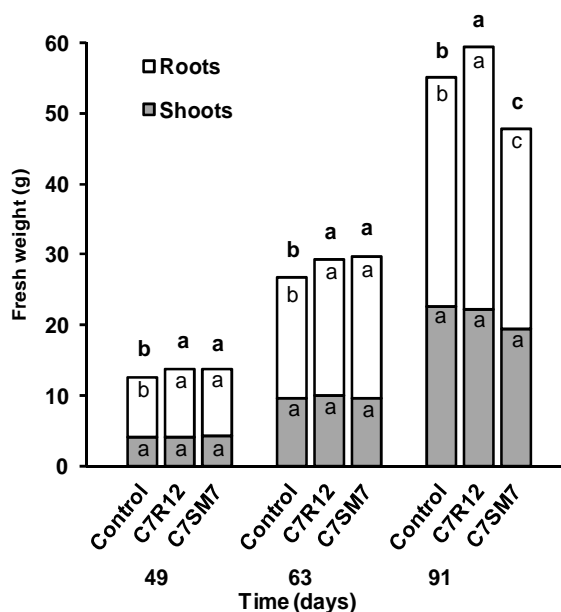


Figure 3. Effects of inoculation of *P. fluorescens* C7R12 and of the *hrcC*- mutant C7SM7 on *M. truncatula* biomass in comparison with the uninoculated control. Bars with the same letter are not significantly different according to Fisher's least significant difference test ($P \leq 0.05$). Letters in normal case refer to the roots or to the shoots depending on where they are placed. Letters in bold case refer to the total plant biomass (roots+shoots).



to 17.7 mm. However, no significant difference was recorded in the fungal promotion achieved by the two strains.

4.3. Survival kinetics of C7R12 and its *hrcC*- mutant in medic rhizosphere

The survival kinetics of the WT strain and its *hrcC*- mutant did not differ significantly (data not shown). Their densities decreased with time from 5.4×10^6 down to 3.92×10^5 CFU g^{-1} soil (C7R12) and 6.2×10^6 down to 5.21×10^5 CFU g^{-1} soil (C7SM7) at the last sampling date.

4.4. Compared effects of C7R12 and its *hrcC*- mutant on root colonization by indigenous AM fungi and on plant growth

The high mycorrhizal potential of the Mas d'Imbert soil, previously reported (Offre *et al.*, 2007), was confirmed by the maximal (100%) AM colonisation frequencies (F%) reached at the first sampling date (49 days) in all treatments, corresponding to the colonisation of all root pieces by the indigenous AM fungal populations (data not shown). However, significant differences were recorded in the intensity of root cortex colonization (M%) and the arbuscular abundance in the mycorrhized root cortex (A%) according to the experimental treatments (Fig. 2a,b). The WT strain C7R12 promoted significantly M% at the first sampling date (49 days) and the corresponding promotion remained significant at the two following sampling dates (63 and 91 days). C7R12 also promoted significantly the arbuscular abundance (A%) but only from the second sampling date. In contrast, the *hrcC*- mutant promoted none of these mycorrhization parameters and even significantly depressed them at the two later stages (63 and 91 days).

The contrasted effects between the WT strain and the *hrcC*- mutant on AM also resulted in differences in their effects on plant growth (Fig. 3). The WT strain C7R12 promoted significantly plant growth at all dates, this promotion being ascribed to the beneficial effect on root growth (+14.6% at day 91). In contrast, the *hrcC*- mutant never promoted and even depressed plant growth at the last sampling date (91 days).

5. Discussion

Possible role of T3SS in the AM promotion by the MHB model strain *P. fluorescens* C7R12 was assessed by comparing the effect of the WT strain and a T3SS- mutant on the colonization of *M. truncatula* by indigenous AM fungi.

The T3SS- mutant was obtained by site directed mutagenesis of the *hrcC* gene. This gene was chosen for its key role in the T3SS machinery since it encodes the outer-membrane, pore-forming protein, that is essential for type III secretion (Tampakaki *et al.*, 2004). Mutation of *hrcC* in *P. syringae*, the closest relative of C7R12 on the basis of *hrc* sequences (Mazurier *et al.*, 2004), was shown to inactivate the secretion system (Deng *et al.*, 1998; Yuan & He, 1996). The functionality of the T3SS in C7R12 was confirmed here by its ability to induce HR, and conversely its lack of functionality in the *hrcC*- mutant was shown by the lost ability to induce HR.

M. truncatula was cultivated in a soil (Mas d'Imbert, France) from the Mediterranean area corresponding to the diversification zone of this genus, which was previously shown to host a high diversity of Glomeromycetes (Pivato *et al.*, 2009) allowing a high rate of AM in medics (Offre *et al.*, 2007; Pivato *et al.*, 2007). This high rate was confirmed in the uninoculated control with the AM colonization frequency reaching its maximum (100%) already at the first sampling date. Despite the high mycorrhizal potential of the Mas d'Imbert soil, the intensity of the root cortex colonization and the abundance of arbuscules were significantly promoted by C7R12. These results confirm the MHB effect of C7R12 toward the AM association between *G. mosseae* BEG12 and *M. truncatula* previously shown (Pivato *et al.*, 2009) and extend it to indigenous AM fungi from soil. In contrast with the WT strain, the *hrcC*- mutant not only did not promote the mycorrhization parameters but even depressed them. Since this mutant colonized the root surface at a similar level as the WT and more generally only differed from the WT by its impaired T3SS, the AM promotion by C7R12 could be ascribed to its T3SS. The involvement of T3SS in the bacterial promotion of AM indicated here is consistent with the report made in Bonfante & Anca (2009) of an increased expression of T3SS in '*Candidatus* Glomeribacter gigasporum' when associated with mycorrhizal plant.

The role of T3SS in the promotion of AM by C7R12 is also consistent with the increased density of T3SS+ pseudomonads associated with mycorrhizal roots (Viollet *et al.*, submitted for publication; Warmink & van Elsas, 2008). T3SS+ pseudomonads enriched in mycorrhizal roots were proposed to be at least not deleterious or even more beneficial to AM, and the present data support that initial hypothesis, although additional T3SS+ bacterial strains should be tested to allow definitive conclusion. Whereas the AM promotion by T3SS+ C7R12 favours more specific AM fungal genotypes than others remains also to be explored by comparing the diversity and structure of the Glomeromycetes community when inoculated or not with the MHB.

P. fluorescens C7R12 promoted plant growth whereas the *hrcC*- mutant did not, that difference was related to the enhancement of AM mediated by T3SS but not of nitrogen-fixing symbiosis. The relation between AM and growth enhancement by C7R12 is supported by the fact that plant growth enhancement was related to root promotion, which was previously shown to account mostly for the beneficial effect of AM (Gamalero *et al.*, 2002). Beside the beneficial effect of T3SS on AM and plant growth reported here, previous work has also shown the promotion of plant health mediated by T3SS (Rezzonico *et al.*, 2005).

The differential promotion between the WT and *hrcC*- mutant was expressed on the intensity of the root cortex colonization and abundance of arbuscules but not on the frequency of root colonization by AM fungi. This would suggest that the T3SS may contribute to enhance nutrient exchanges in the symbiotic association since these exchanges are known to mostly occur in arbuscules developed in cortical cells (Harrison, 2005). This hypothesis is consistent with the increased efficiency of the AM symbiosis in the presence of C7R12 but not in the presence of its *hrcC*- mutant, as indicated by the significant plant growth promotion resulting from the enhanced AM by the WT strain but not by its mutant. The involvement of the T3SS in the AM promotion by C7R12 during the symbiotic association rather than during the presymbiotic stage is in agreement with *in vitro* experiments. Indeed, both the WT strain and *hrcC*- mutant stimulated the spore germination and germ tube length of the model strain *G. mosseae* BEG12 at the same level, indicating that T3SS was not involved in promotion of the saprophytic growth of *G. mosseae* BEG12 by C7R12. Further research is required to explore how T3SS functioning is involved in the AM cortical colonization of the roots. T3SS could possibly modulate host defence reactions, which are involved in the establishment of

AM symbiotic associations (Oldroyd *et al.*, 2009), as it does for the suppression of plant defence responses by pathogenic pseudomonads (Jones & Dangl, 2006).

In conclusion, this study contributes to unravel the mechanisms operating in the mycorrhization promotion by a MHB strain. We report here that, among these mechanisms, the type III secretion system is involved in the AM promotion by the model strain *P. fluorescens* C7R12.

6. Acknowledgements

This work was funded by the Regional Council of Burgundy, RCB (Dijon, France). This work was supported by a doctoral grant to A. Viollet by 'Conseil Régional de Bourgogne' and INRA (EA, SPE). We are grateful to Y. Dessaux, D. Faure, S. Genin and D. Wipf for useful suggestions and discussions.

7. References

- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK. 2005. Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis high-lights differences in the active soil bacteria metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environmental Microbiology* 7: 1952-1966.
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8: 1-10.
- Bonfante P, Anca IA. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363-383.
- Calvaruso C, Turpault MP, Leclerc E, Frey-Klett P. 2007. Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecology* 54: 567-577.
- de Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 795-811.
- Deng WL, Preston G, Collmer A, Chang CJ, Huang AHC. 1998. Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *Journal of Bacteriology* 180: 4523-4531.
- Dennis JJ, Zylstra GJ. 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2710-2715.

- Duponnois R, Garbaye J. 1990. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Canadian Journal of Botany* 68: 2148-2152.
- Eparvier A, Lemanceau P, Alabouvette C. 1991. Population dynamics of non pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiology Ecology* 86: 177-184.
- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, Berge O, Heulin T. 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied Environmental Microbiology* 63: 1852-1860.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clause ML, Courrier S, Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JC, Garbaye J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317-328.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- Gamalero E, Martinotti MG, Trotta A, Lemanceau P, Berta G. 2002. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to the plant growth conditions. *New Phytologist* 155: 293-300.
- Garbaye J, Bowen GD. 1989. Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 112: 383-388.
- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley Review, 76). *New Phytologist* 128: 197-210.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 61: 793-796.
- Harrison MJ. 2005. Signalling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19-42.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Katzen F, Becker A, Ielmini V, Oddo CG, Ielpi L. 1999. New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative Bacteria and their use in mapping of the 3' end of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 278-282.
- King EO, Ward MK, Raney DE. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Klement Z. 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199: 299-300.
- Lemanceau P, Alabouvette C, Couteaudier Y. 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XIV. Modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie* 8: 155-162.
- Lemanceau P, Alabouvette C. 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* 10: 279-286.

- Linderman RG. 1997. Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. In: Carroll GC, Tudzynski P, eds. *The Mycota*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 117-128.
- Marschner P, Crowley DE, Lieberei R. 2001. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16SrRNA gene community composition in the rhizosphere of maize. *Mycorrhiza* 11: 297-302.
- Mazurier S, Lemunier M, Siblot S, Mougél C, Lemanceau P. 2004. Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 455-467.
- Mirleau P, Philippot L, Corberand T, Lemanceau P. 2001. Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in the competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 in soil conditions. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2627-2635.
- Offre P, Pivato B, Siblot S, Gamalero E, Corberand T, Lemanceau P, Mougél C. 2007. Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied Environmental Microbiology* 73: 913-921.
- Offre P, Pivato B, Mazurier S, Siblot S, Berta G, Lemanceau P, Mougél C. 2008. Microdiversity of *Burkholderiales* associated with mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 180-192.
- Oldroyd GED, Harrison MJ, Paszkowski U. 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324: 753-754.
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougél C, van Tuinen D. 2007. *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176: 197-210.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougél C, Lemanceau P, Berta G. 2009. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19: 81-90.
- Poole EJ, Bending GD, Whipps JM, Read DJ. 2001. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytologist* 151: 743-751.
- Rambelli A. 1973. The rhizosphere of mycorrhizae. In: Marks GL, Koslowski TT, eds. *Ectomycorrhizae*. New York, USA: Academic Press, 299-343.
- Rangel-Castro JI, Levenfors JJ, Danell E. 2002. Physiological and genetic characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with *Cantharellus cibarius*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 739-748.
- Rezzonico F, Binder C, Défago G, Moëgne-Loccoz Y. 2005. The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 991-1001.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Singh BK, Nunan N, Ridgway KP, McNicol J, Young JPY, Daniell TJ, Prosser J, Millar P. 2008. Relationship between assemblages of mycorrhizal fungi and bacteria on grass roots. *Environmental Microbiology* 10: 534-541.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. London, UK: Academic Press.
- Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M. 2004. Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology* 6: 805-816.
- Tarkka MT, Sarniguet A, Frey-Klett P. 2009. Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. *Current Genetics* 55: 233-243.
- Timonen S, Jørgensen KS, Haahtela K, Sen R. 1998. Bacterial community structure at defined locations of *Pinus sylvestris* - *Suillus bovinus* and *Pinus sylvestris* - *Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 499-513.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Paris, France: INRA Presse, 217-221.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, Pierrat JC, Mustin C, Frey-Klett PM. 2007. Mycorrhizosphere effect on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied Environmental Microbiology* 73: 3019-3027.
- Warmink JA, Nazir R, van Elsas JD. 2008. Universal and species-specific bacterial "fungiphiles" in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology* 11: 300-312.
- Warmink JA, van Elsas JD. 2008. Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? *ISME Journal* 2: 887-900.
- Yuan J, He SY. 1996. The *Pseudomonas syringae* Hrp regulation and secretion system controls the production and secretion of multiple extracellular proteins. *Journal of Bacteriology* 178: 6399-6402.

Bilan

A travers cette étude, nous avons montré que le fonctionnement du SST3 de C7R12 était impliqué dans la capacité de la bactérie à améliorer la mycorhization de *M. truncatula*. En effet, la souche sauvage *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) a bien eu un effet promoteur de la colonisation des racines par les champignons mycorhizogènes. En revanche, la présence de son mutant *P. fluorescens* C7SM7 chez qui le SST3 n'est pas fonctionnel, a eu un effet délétère sur la mycorhization.

Il a été montré précédemment, pour *M. truncatula* cultivé en conditions gnotobiotiques, que *P. fluorescens* C7R12 avait un effet promoteur de la mycorhization ; cet effet portait sur la phase de vie symbiotique du champignon (colonisation intraradiculaire et formation des arbuscules) mais aussi sur la phase de vie saprophyte de la croissance du CMA (germination des spores et croissance des tubes germinatifs) (Pivato et al., 2009). Nos résultats ont confirmé ces observations pour C7R12. En revanche, aucun effet différentiel n'a été observé entre *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant SST3- pour ce qui concerne leur effet sur la germination *in vitro* des spores et la croissance des tubes germinatifs de *Glomus mosseae* BEG12. Pour les deux bactéries, une forte stimulation de niveau similaire a été observée. Nos résultats mettent donc en évidence un rôle du SST3 dans l'effet promoteur de la colonisation de la racine. En revanche, le système de sécrétion ne semble pas intervenir dans la croissance de la phase saprophyte du champignon mycorhizogène.

La différence d'effets entre la souche sauvage C7R12 et son mutant C7SM7 sur la mycorhization s'est accompagnée de la même différence d'effets sur la croissance de la plante. En effet, à une meilleure colonisation de la racine correspond une meilleure croissance végétale. En revanche, l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote n'a pas été modifié significativement. Quelque soit le traitement, le rapport entre l'abondance ou la masse des nodosités et la biomasse des racines est resté le même.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence un effet quantitatif très marqué du fonctionnement du SST3 de C7R12 sur la mycorhization. Cette promotion de colonisation pourrait être la conséquence d'une intensification de l'activité du champignon

mycorhizogène. Cette hypothèse est en accord avec l'observation d'une forte augmentation du taux d'arbuscules, correspondant à des structures d'échanges entre la plante et le CMA en présence d'un SST3 fonctionnel. Toutefois, l'augmentation de la colonisation de la racine pourrait également être le résultat d'une sélection particulière de champignons mycorhizogènes ayant une meilleure aptitude à la colonisation de la racine. Cette sélection pourrait également être indirecte et résulter plus globalement d'une modification de la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère. Dans la suite de notre travail, nous avons donc cherché à savoir si l'inoculation de C7R12 peut avoir un impact qualitatif sur la structure des communautés microbiennes rhizosphériques et sur la diversité des symbiotes de *M. truncatula*.

CHAPITRE IV

Impact du système de sécrétion de type III de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 sur la structure des communautés bactériennes et fongiques dans la rhizosphère de *Medicago truncatula*

Viollet, A., Mougel, C., Cleyet-Marel, J.C., Guby-Rangin, C., Corberand, T., Lemanceau, P. et Mazurier, S. **(en préparation)**. Impact of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system on bacterial and fungal communities in the rhizosphere of *Medicago truncatula*.

Avant propos	87
Impact of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 type III secretion system on bacterial and fungal communities in the rhizosphere of <i>Medicago truncatula</i>	89
1. Summary	90
2. Introduction	90
3. Materials and methods	92
3.1. Soil and plant growth conditions	
3.2. Evaluation of plant growth, plant mycorrhization, and nodulation	
3.3. Extraction and purification of total DNA from soil samples	
3.4. Automated RISA fingerprinting	
3.5. PCR amplification of intra-radical AM fungi and nitrogen fixing <i>Ensifer</i> symbionts DNA	
3.6. Cloning, sequencing and analysis of intra-radical LSU rDNA sequences of AM fungi and of IGS _{EXO} sequences of nitrogen fixing <i>Ensifer</i> symbionts	
3.7. Statistical analysis	
4. Results	99
4.1. Kinetics of root colonization by AM fungi	
4.2. DNA fingerprints of microbial communities	
4.3. Variation of the genetic structure of microbial communities according to the compartment sampled	
4.4. Impact of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 and of its <i>hrcC</i> - mutant on the genetic structure of microbial communities	
4.5. Intra-radical communities of indigenous AM fungi	
4.6. Intra-radical communities of nitrogen fixing symbionts	
5. Discussion	104
6. Acknowledgements	107
7. References	107
Bilan	111

Avant propos

L'étude présentée dans le chapitre précédent, indique que la présence du SST3 chez *P. fluorescens* C7R12 contribue à son effet MHB. En revanche, l'inactivation du SST3 chez son mutant C7SM7 a eu un impact négatif sur l'interaction entre *M. truncatula* et les champignons mycorhizogènes à arbuscules. Ce travail nous a permis d'observer, dès le premier point de prélèvement de notre étude, à 49 jours de culture des plantes, que l'intensité maximale de colonisation de la racine par les CMA était déjà atteinte et maintenue jusqu'à 91 jours. Les différences observées sur la mycorhization après inoculation de *P. fluorescens* C7R12 et de son mutant SST3- sont liées à des effets différentiels sur la croissance de la racine de *M. truncatula*. Le SST3 de C7R12 semble donc contribuer à l'amélioration de la croissance de la plante en induisant la promotion de la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA.

L'observation d'effets quantitatifs très marqués et opposés entre C7R12 et C7SM7 nous a conduits à nous interroger sur l'existence potentielle d'une variation qualitative des CMA. L'objectif de cette étude est de déterminer si la présence d'un SST3 chez des bactéries telluriques peut contribuer à modifier la diversité et/ou la structure des communautés des microorganismes naturellement présents dans la rhizosphère ou en association symbiotique avec les racines de la plante. L'amélioration de la mycorhization de la plante pourrait être le résultat d'un effet direct, lié à la présence du SST3, sur la diversité des symbiotes et donc correspondre à une sélection particulière de champignons mycorhizogènes ayant une meilleure aptitude à la colonisation. Cette sélection pourrait également être indirecte et résulter plus globalement d'une modification de la structure des communautés microbiennes totales dans la rhizosphère.

A l'aide du même système de culture qui nous a permis d'obtenir les résultats décrits dans le chapitre précédent, nous avons choisi dans cette étude de centrer nos prélèvements à des stades plus précoces de croissance (de 28 à 63 jours de culture) afin de mieux décrire la cinétique de colonisation de la racine par les CMA. Nous avons donc étudié en parallèle et en cinétique, les paramètres de mycorhization et la structure des communautés fongiques et bactériennes présentes naturellement dans le sol rhizosphérique et les racines de *M. truncatula*

Gaertn. cv. Jemalong J5 inoculées ou non par *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant C7SM7 (SST3-). Sur la base de ces études cinétiques, nous avons également étudié la diversité des Glomeromycètes et des rhizobia associés à la rhizosphère et aux racines de *M. truncatula* J5, inoculées ou non par la souche sauvage SST3+ et son mutant SST3- après 63 jours de culture.

Impact of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system on bacterial and fungal communities in the rhizosphere of *Medicago truncatula*

Amandine Viollet¹, Christophe Mougel¹, Jean-Claude Cleyet-Marel², Cécile Guby-Rangin^{2,3},
Thérèse Corberand¹, Philippe Lemanceau¹ and Sylvie Mazurier¹

¹INRA, Université de Bourgogne, UMR 1229 'Microbiologie des Sols et de l'Environnement',
CMSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France

²CIRAD, IRD, Université Montpellier 2, SupAgro, USC INRA, UMR 113 'Laboratoire des
Symbioses Tropicales et Méditerranéennes', Campus International de Baillarguet, TA-A82/J,
34398 Montpellier cedex 5, France

³Institute of Biological and Environmental Sciences, University of Aberdeen, Cruickshank
Building, St. Machar Drive, Aberdeen, AB24 3UU, United Kingdom

Total number of tables: 2

Total number of figures: 3

Total number of supplementary figure: 1

Total number of references: 47

Number of pages: 31

Keywords: Type III secretion system, *Pseudomonas*, *Medicago truncatula*, arbuscular mycorrhiza, microbial communities

***Corresponding author:** Sylvie Mazurier

Address: INRA, CMSE, UMR 1229 MSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex

Phone: 33 3 80 69 30 93

Fax: 33 3 80 69 32 24

E-mail: sylvie.mazurier@dijon.inra.fr

1. Summary

In the non-sterilized soil of Mas d'Imbert, colonization of *Medicago truncatula* roots by indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was previously shown to be significantly increased by the inoculation of *Pseudomonas fluorescens* C7R12, a mycorrhiza helper bacteria strain harbouring a functional type III secretion system. In contrast, inoculation of a C7R12 mutant in which the T3SS is inactivated significantly depressed AMF root colonization compared to the non-inoculated control plants. In order to determine if qualitative modifications of root associated microorganisms could be involved in the differential effects observed on the mycorrhizal development, a dynamic analysis of the structure of total fungal and bacterial communities was performed. Among microbial communities, a special attention was given to intra-radical communities of indigenous AMF and of nitrogen fixing symbionts. Bacterial inoculation had no impact on total fungal communities as assessed by F-RISA whereas total bacterial communities assessed by B-RISA differed in the rhizosphere between plants inoculated with *P. fluorescens* C7R12, with the T3SS- mutant, and uninoculated controls. Variation of root colonization was observed two weeks before structure modification of bacterial communities suggesting that it would rather be a consequence than a cause of the differences observed on mycorrhization. *M. truncatula* root nodules were majoritarly formed by *Ensifer medicae* strains. Intraspecific genotypic diversity of these symbionts was assessed by studying the polymorphism of IGS_{EXO} sequences; no significant differences were observed whatever the inoculation treatment. Analysis of LSU rDNA sequences amplified from root extracted DNA stressed a strong dominance of AMF closely related to *Glomus intraradices* irrespective of the inoculation treatment. Fungi related to *G. claroideum* and specifically associated to the roots inoculated with *P. fluorescens* C7R12 were described, but their weak numerical representation (8%) suggested a limited role, if any, in the quantitative effects observed on mycorrhization.

2. Introduction

Mutualistic symbioses between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and roots are associated to the development and to the evolution of approximately 80% of all higher plant species (Brundrett, 2009). Although AM symbioses are generally regarded as preferential associations non-specific between distinct plants species and operational taxonomic units

(OTUs) of fungi belonging to the Glomeromycetes (Pivato *et al.*, 2007). Moreover, it has been demonstrated that different mycorrhizal fungi induce distinct effects on plant growth and health (Taylor & Harrier, 2000; Bever, 2002; Hartnett & Wilson, 2002). Depending on the plant and on the fungus involved, negative effect of mycorrhization could even be observed (Taylor & Harrier, 2000). Therefore a better knowledge of the factors influencing the establishment and the functioning of AM mutualistic associations is necessary to optimize the symbioses and promote plant growth and health.

Abiotic and biotic factors are known to influence mycorrhization. Among the latter, bacteria appear to be closely related to mycorrhizal associations (Frey-Klett *et al.*, 2007). Recent findings tend to show that bacteria could be essential partners in AM symbioses (Bonfante & Anca, 2009) and more generally involved in mutualistic associations which imply plants and fungi (Grübe & Berg, 2009). AM symbiosis is also the most ancient among mycorrhizal symbioses, the first evidence dating back to more than 400 million years ago (Remy *et al.*, 1994; Brundrett, 2002). Therefore, mycorrhizas and bacteria have been sharing the same rhizosphere environment for millions years and the hypothesis according to which they did not evolved independently and that this co-evolution process would be at least non deleterious and even beneficial for the plant growth and health has been raised (Offre *et al.*, 2007). Data obtained in different studies tend to confirm this hypothesis. Indeed β -proteobacteria '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' have been shown to be obligate endobacteria in some AMF (Naumann *et al.*, 2010) illustrating the close relationship between these organisms. Although the nature and the consequences of this association still have to be precised, it supports the hypothesis of a common evolution.

Beside this intimate relationship evidenced by the lifestyle of the bacterial partner, other preferential associations between bacteria and mycorrhizal roots have also been observed (Offre *et al.*, 2007; Offre *et al.*, 2008; Scheublin *et al.*, 2010). The relationship between AMF and these populations is less obvious than in the case of endobacteria but some observations also plaid in favor of the co-evolution hypothesis. Several studies pointed out the same bacterial groups, and in particular Burkholderiales (Offre *et al.*, 2008; Scheublin *et al.*, 2010). Moreover some of these bacteria were indeed shown to positively influence mycorrhization and/or plant growth and health (Pivato *et al.*, 2009). However, the mechanisms involved and their respective importance in the promotion of AM are still unclear. As a matter of fact, the

bacterial taxonomic groups involved are known for their great metabolic diversity. The genericity of the results obtained with model isolates chosen on the basis of taxonomic criteria to further study their effects on mycorrhization is therefore difficult to evaluate.

On the other hand, the search for preferential associations between bacteria, fungi and/or mycorrhizas also stressed a potential functional group of bacteria since it is defined by the presence of functional gene sequences. As a matter of fact, the increased occurrence of bacteria harbouring type III secretion system (T3SS) genes has been observed in the vicinity of ectomycorrhizal fungi (Warminck *et al.*, 2008; Warminck & van Elsas, 2008) and of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* (Viollet *et al.*, submitted for publication). T3SS are known as molecular systems mediating direct cellular interactions between Gram negative bacteria and eukaryotes; therefore the hypothesis that T3SS might be implied in relationships with fungi and/or mycorrhizas has been raised. In a previous work, we showed that the T3SS of *Pseudomonas fluorescens* C7R12, a model mycorrhiza helper bacterium (MHB; Pivato *et al.*, 2009), was indeed implied in the promotion of mycorrhization of *M. truncatula* (Viollet *et al.*, submitted for publication). In the non-sterilized soil of the Mas d'Imbert, plant root colonization by indigenous AMF was significantly increased by the inoculation of C7R12. In contrast, inoculation of a C7R12 mutant in which the T3SS was inactivated significantly depressed AMF root colonization compared to the non-inoculated control plants.

Since root colonization can vary with the interaction between fungal and plant species (Taylor & Harrier, 2000), our objective was to compare the microbial communities associated to plants presenting distinct AMF colonization patterns in order to determine if qualitative modifications of root associated microorganisms could be involved in the quantitative effects observed on the mycorrhizal development. Therefore, parallel kinetic analyses of the structure of total fungal and bacterial communities and of root colonization were performed. Since *M. truncatula* is a leguminous model plant which develops both nitrogen fixing and AM symbioses, the composition of intra-radical communities of indigenous AMF and of nitrogen fixing symbionts was compared between the three inoculation treatments.

3. Material and methods

3.1. Soil and plant growth conditions

The experiments were conducted with *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5 (Myc+/Nod+). Seeds were scarified and surface sterilized by gently shaking them in 98% sulfuric acid for 2 min, 95% ethanol for 5 min and 3.5% sodium hypochlorite solution for 10 min, and rinsed successively six times for 5 min in sterile demineralized water. Seeds were germinated on 0.7% agar (wt/vol.) plates at 25°C for 48 h. One germinated seed was transplanted per cylindrical polyvinylchloride container (diameter, 9 cm; height, 20 cm) filled with 1.5 liter of a silt-clay loam soil (Mas d'Imbert, France) corresponding to 1560 g. Soil characteristics are summarized in Offre *et al.* (2007). According to the agronomic standards of Morel *et al.* (1992), the amount of mineral phosphorus was limiting in the Mas d'Imbert soil. After transplantation, plants were inoculated with 10⁷ colony forming units (CFU) per gram of soil of (i) *Pseudomonas fluorescens* C7R12, (ii) a *hrcC*- mutant of C7R12 (C7SM7), or (iii) remained uninoculated and were supplemented with a volume of sterile water equivalent to that of the inoculants. Construction of the *hrcC*- mutant and bacterial inoculants preparation have been described previously (Viollet *et al.*, submitted for publication). Plants were cultivated in a growth chamber in a 16:8 h light:dark photoperiod in a 23:18°C light:dark thermoperiod, with photosynthetically active radiation at 500 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at pot height. Water was added each day to maintain the water holding capacity of 45%. Containers were placed randomly in the growth chamber and were moved at random each day after watering.

3.2. Evaluation of plant growth, plant mycorrhization, and nodulation

For each treatment, five plants were sampled after 28, 35, 42, 49, 56 and 63 days and analysed. Plant growth was quantified by measuring the root and the shoot fresh weight of each plant replicate per experimental treatment and for sample date. Evaluation of plant nodulation and mycorrhization was performed on the same plants. All root nodules were excised from each plant replicate and the level of nodulation was assessed by evaluating the fresh weight of excised nodules per gram of fresh root. For each treatment the result corresponded to the mean value obtained for five replicates. Assessment of root colonization

by AMF was performed on thirty root pieces (1 cm long each) randomly sampled from the whole root system of each plant. These pieces were stained and prepared as described by Pivato *et al.* (2007). These pieces were cleared for 30 min at 60°C in 10% KOH, stained with 1% methyl blue in lactic acid and finally mounted on slides. Quantification of arbuscular mycorrhizal infection and colonization was performed using the notation scale described by Trouvelot *et al.* (1986). The percentages of root fragments colonized by the fungus (F%), the intensity of colonization of the root cortex (M%), and the arbuscular abundance in the mycorrhized root cortex (A%) of AMF were evaluated microscopically. Parameters of mycorrhization were calculated with MYCOCALC software, available at <http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>.

3.3. Extraction and purification of total DNA from soil samples

DNA was extracted from three different compartments: (i) bulk soil (S), (ii) rhizosphere soil compartment (Rh) including bacteria and fungi present in the soil adhering to roots, and (iii) root tissue compartment (R) including bacteria and fungi attached to the root surface (rhizoplane) and present in the roots. For each compartment, five replicates were analyzed per experimental treatment (uninoculated control, C7R12 inoculation, C7SM7 inoculation). These analyses were performed at four sampling dates, 42, 49, 56 and 63 days. The bulk soil was obtained after pooling and homogenization of the soil from five different containers. One gram of dry bulk soil was sampled in each of the five replicates. The rhizosphere soil was obtained after manually separating the root system with adhering soil from the container. The rhizosphere soil was obtained by shaking them twice in a flask containing sterile distilled water at 200 rpm (Agitests, Bioblock Scientific, Illkirch, France) for 20 min, the water volume differed according to the root mass (10 mL g⁻¹ root). The root system was discarded and the soil was collected after centrifugation at 9000 rpm for 10 min at 4°C. One gram of dry rhizosphere soil was sampled in each of the five replicates. The root system was ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen. One gram of root system was sampled in each of the five replicates. Each sample (bulk soil, rhizosphere soil and root) was frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C for further use in DNA extraction.

DNA extraction, purification, and quantification procedures were performed as previously described by Mougel *et al.* (2006). Briefly, 1 g of dry bulk soil, rhizosphere soil, or

root tissues was shaken with glass beads and a lysis solution containing sodium dodecyl sulfate in a bead beater. The samples were centrifuged, and the supernatants were collected. Proteins and cell fragments were precipitated with 5 M potassium acetate and discarded after centrifugation. DNA was then precipitated from the supernatants with isopropanol and centrifuged. The pellet of DNA was washed with ethanol and dissolved in Tris-EDTA buffer. DNA was separated from residual impurities, and particularly humic substances, by centrifugation through two types of minicolumns. DNA extracts were loaded onto PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) microcolumns (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and eluted by centrifugation. The eluates were collected and then purified a second time using a GENE CLEAN Turbo nucleic acid purification kit (QBiogene, Illkirch, France) following the manufacturer's instructions.

The concentrations of purified DNA extracts were quantified by comparing them to standard curves of calf thymus DNA (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) concentrations. Purified DNA samples as well as calf thymus DNA dilutions were resolved by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed (Biocapt, Vilber Lourmat, Marne la Vallée, France). The intensity of the ethidium bromide fluorescence was integrated with ImageQuANT software (Molecular Dynamics, Evry, France).

3.4. Automated RISA fingerprinting

The bacterial ribosomal IGS were amplified with the primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (3' end of 16S genes) and L-D-Bact-132-a-A-18 (5' end of 23S genes) (Normand *et al.*, 1996) for bacterial automated ribosomal intergenic spacer analysis (B-RISA). Length distribution of IGS varied from 150 to 1500-pb (Ranjard *et al.*, 2000). The fungal ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified with the primers ITS1-F (3' end of 18S genes; Gardes & Bruns, 1993) and 3126T (5' end of 28S genes; Sequerra *et al.*, 1997) for fungal automated ribosomal intergenic spacer analysis (F-RISA). Length distribution of ITS1-5.8S-ITS2 regions varied from 390 to 1065-pb (Ranjard *et al.*, 2001). PCR conditions, PCR template preparation for DNA sequencer loading, and electrophoresis conditions were those described by Ranjard *et al.* (2003).

3.5. PCR amplification of intra-radical AM fungi and nitrogen fixing *Ensifer* symbionts DNA

Analyses were performed from the root tissues and from root nodules excised from each of the 5 plants per treatment (non inoculated and inoculated with C7R12 or C7SM7) sampled after 63 days of culture.

In order to amplify AMF DNA, total DNA was extracted from the roots tissues and quantified as described above. PCR reactions were performed separately on each DNA sample. The primer pair LR1 and FLR4, targeting Glomeromycetes, was used for the PCR amplification. The primer LR1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'; van Tuinen *et al.*, 1998) was previously designed from alignments of the 5' end of the large ribosomal subunit (Hassouna *et al.*, 1984) flanking the variable domains D1 of eukaryotes. The primer FLR4 (5'-TACGTCAACATCCTTAACGAA-3'; Gollotte *et al.*, 2004) is located in the D2 domain of the LSU rDNA of AMF in the 5' end of the large ribosomal subunit.

Reactions were performed in a final volume of 20 μ L containing 10 mM Tris-HCl, pH 9.50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X100, 0.2 mg mL⁻¹ bovine serum albumin (BSA) (Q-BIOgene), 125 μ M dNTP, 500 nM of each primer, 0.4 U of *Taq* DNA polymerase (Q-BIOgene) and 100 ng of sample DNA. Each reaction was performed in a thermal cycler (MJ Research PTC-0225 DNA Engine Tetrad, Bio-Rad), programmed as follows: initial denaturation at 95°C (3 min), followed by 30 cycles of denaturation at 93°C (45 s), annealing at 60°C (45 s) and extension at 72°C (45 s); the last cycle was followed by a final extension at 72°C for 5 min.

Amplification of IGS_{EXO} from the DNA of the nitrogen fixing symbionts was performed as described by Bailly *et al.* (2006) using two pairs of primers: (i) EXOmeliloti1 CAACAAGACGGATATGAACGAA and EXOmeliloti2 GTGGTGGGAAGGATTGACTGC targeting the *exoP-thiD* ITS region for bacteria belonging to the species *E. meliloti* and (ii) EXOmedicae1 CATGAACGAGCTGGGCAAAT and EXOmedicae2 CTGGTCGAAGCGGC AAAA targeting the corresponding region in bacteria belonging to the species *E. medicae*. Briefly, root nodules were surface sterilized using calcium hypochlorite 1% (w/v) for 3 min and then rinsed three times in sterile water. Isolation of a single bacterial strain per nodule

was performed on yeast extract mannitol agar solid medium (YEMA; Vincent, 1970). Each bacterial isolate was grown in liquid YEMA medium. One millilitre of liquid culture was washed twice by centrifugation (15000 rpm, 4 min) and the pellet was resuspended in 750 μL of sterile water. One hundred microlitres of this solution was incubated for 2 h with 20 μL of 1 mg mL^{-1} proteinase K and 100 μL of Tris-HCl (10 mM, pH 8.3). After boiling, this mixture was used as DNA template. DNA amplification was performed using a PerkinElmer 2400 thermocycler in 25 μL volume, including 1 μL of DNA template, 200 μM of each dNTP, 0.8 μM of each primer, 1.5 mM of MgCl_2 , 1X buffer supplied by the *Taq* polymerase manufacturer, and 1.25 U of Invitrogen *Taq* polymerase. We used a touch-down programme including an initial denaturation stage (96°C, 4 min), 20 cycles of denaturation (96°C, 30 s), annealing (annealing temperature decrease steadily from 60°C to 50°C in 20 cycles, 30 s), elongation (72°C, 1 min) and 20 cycles of denaturation (96°C, 30 s), annealing (50°C, 30 s) and elongation (72°C, 1 min).

3.6. Cloning, sequencing and analysis of intra-radical LSU rDNA sequences of AM fungi and of IGS_{EXO} sequences of nitrogen fixing *Ensifer* symbionts

Before cloning LSU rDNA, PCR products obtained as described above, were separated by electrophoresis in a 0.9% agarose gel in modified TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.1 mM Na_2EDTA). PCR fragments were eluted from the gel using a DNA Gel Extraction kit (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The purified fragments (5 replicates per treatment) were pooled for each treatment (1 pool per treatment) and quantified using the Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgique) by gel electrophoresis on 1.2% agarose gel in TAE buffer. Pooled PCR products were ligated into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Before transformation, a volume of ligation containing 10 ng of AMF DNA was desalted with membrane filters of 0.025 μm (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Ligation products were electroporated into *Escherichia coli* DH10B ElectroMAX cells (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France), and a blue/white screening was used to identify the transformants. Positive clones were checked by PCR. For each treatment 64 clones were cultivated in 2 mL Luria broth medium (LB; Sambrook & Russel, 2001) supplemented with ampicillin (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) during 4 h at 37°C. PCR amplification was performed directly on 2 μL of LB broth culture for each clone by using universal primers SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') and T7 (5'-TAATA

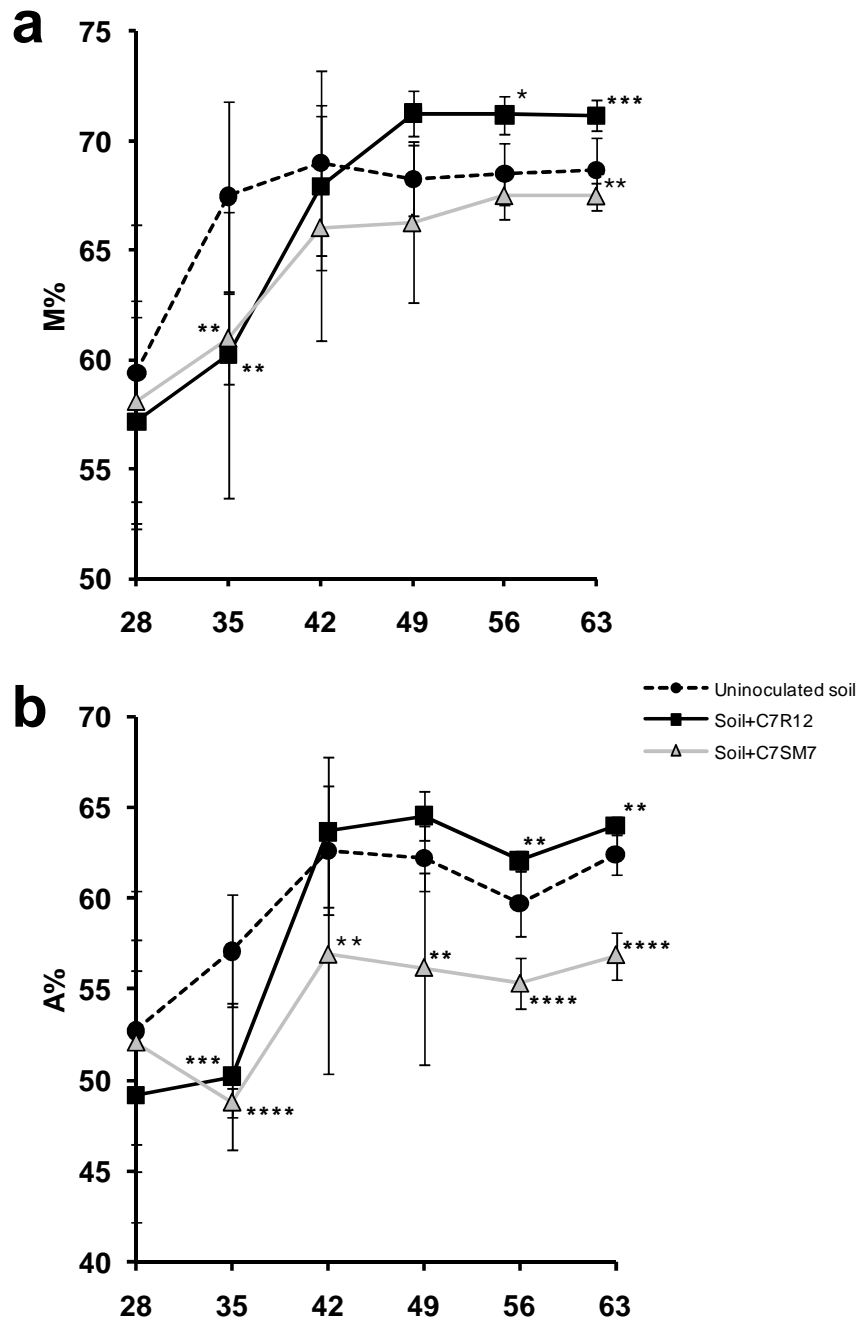
CGACTCACTATAGGG-3'). PCR conditions included a first step at 94°C for 4 min to lyse bacterial cells, followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, and 1 min at 72°C. The final extension step was at 72°C for 3 min. PCR products were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed under a camera (Biocapt, Vilber Lourmat, Marne la Vallée, France). *E. Coli* clones were cryopreserved at -80°C in 40% glycerol. Nucleotide sequences of the cloned AMF LSU rDNA PCR fragments were sequenced commercially from the clones by Macrogen Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Nucleotide sequence homology searches against major sequence databases were performed with program BLAST 2.2.18+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). DNA and amino acid sequences were aligned, and phylogenetic trees were reconstructed by the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) as implemented in ClustalW2 (Thompson *et al.*, 1994). DNA distances were calculated with Kimura's two-parameter correction (Kimura, 1980). In all cases, positions with gaps in the multiple alignments were excluded from the analysis. Potential chimeric LSU rDNA sequences were searched using the Bellerophon program (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>).

After PCR amplification, *Ensifer* PCR products were cut out from 1% agarose electrophoresis gel, purified with a QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) and sequenced on one strand. Sequencing reactions were performed by the High Throughput Genomic Unit of the University of Washington. Sequence analysis was performed using Chromas, Genedoc (Nicholas & Nicholas, 1997) and ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) softwares.

3.7. Statistical analysis

Statistical analyses of bacterial and fungal communities' structure were run under R software (R Development Core Team, 2008). First, data obtained from the 1D-Scan software were converted into a table summarizing the band presence (peak) and intensity (Gaussian area of peak) and 100 bands were integrated for each A-RISA profile with a 2-bp resolution to ensure a robust analysis using the Prep-RISA package in R (Ranjard *et al.*, 2001). Principal component analysis (PCA) using covariance matrix was performed on the data matrix (each row corresponding to a sample and each column corresponding to a band detected at least in one sample). A between groups analysis and a randomisation test of 1000 permutations (Monte Carlo test) were carried out to test for significant effect of the treatments. Principle

Figure 1. Effect of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 and C7SM7 on (a) intensity of arbuscular mycorrhizal colonization (M%), and (b) frequency of arbuscules (A%) in *Medicago truncatula* roots cultivated in the Mas d'Imbert soil. Error bars represent the s.d. of the mean. Fisher's PLSD-test was used for pairwise comparison of the treatment with the uninoculated control: * $p \leq 0.1$; ** $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.001$.



component analyses, between group analyses, randomisation tests and co-inertia analyses were run in R software using Ade4TkGUI package (Thioulouse & Dray, 2007).

Plant growth, nodulation, and mycorrhization data were submitted to variance analysis, followed by the Fisher's PLSD-test for pairwise comparison using Statview software. Mycorrhization data, expressed as percentages, were submitted to angular transformation prior to statistical analysis. Likelihood-ratio Chi2 were computed using the software JUMP.

E. medicae IGS_{EXO} genotypes were defined as in Bailly *et al.* (2006). G-like tests were performed with the program Genepop 3.4 (Raymond & Rousset, 1995) in order to analyze the distribution of *E. medicae* IGS_{EXO} genotypes.

4. Results

4.1. Kinetics of root colonization by AM fungi

AM colonisation frequencies (F%) reached the maximal value (100%) corresponding to the colonisation of all root pieces by the indigenous AMF populations at the third sampling date (42 days) in all treatments (data not shown). The F% remained stable until the end of the experiment (63 days). These results are in accordance with those previously reported by Offre *et al.* (2007) and Viollet *et al.* (submitted for publication) which also stressed a high mycorrhization potential in the Mas d'Imbert soil. Depending on the experimental treatment significant differences were recorded in the intensity of root cortex colonization (M%) and the arbuscular abundance in the mycorrhizal root cortex (A%) (Fig. 1a,b). Compared to the uninoculated control treatment, the strain C7R12 promoted significantly the M% and the A% at the two last sampling date (56 and 63 days) in contrast, the *hrcC*- mutant depressed them. Comparable results revealing the implication of the C7R12's T3SS in the promotion of root colonization by AMF by this strain were previously obtained by Viollet *et al.* (submitted for publication) in the same experimental conditions. Plant growth and root nodulation data recorded were also comparable to those previously described by these authors at the same stage of plant development. Inoculation treatments had no significant effects on root nodulation ($p \leq 0.05$) and plant growth was significantly improved by both inoculated bacteria compared to the uninoculated control after 49, 56, and 63 days ($p \leq 0.05$). In the present

study, kinetic following of the mycorrhization parameters further showed that the final effects of both inoculated strains on AMF root colonization became observable between the third (42 days) and the fourth (49 days) sampling date and that a plateau was stably reached at the last sampling date (63 days) (Fig. 1a,b). On the basis of these observations, analyses of total fungal and bacterial communities' structure were performed at the four last sampling dates (42, 49, 56, and 63 days) and the compositions of intra-radical communities of indigenous AMF and of nitrogen fixing symbionts were assessed at the last sampling date (63 days).

4.2. DNA fingerprints of microbial communities

DNA fingerprinting of microbial communities provided complex profiles for all compartments studied, bulk soil, rhizosphere soil, and root tissues (data not shown). B-RISA bands ranged from 230 to 1120-bp for bulk soil and rhizosphere soil and from 250 to 1414-bp for root tissues (data not shown). For F-RISA, bands were distributed from 450 to 1414-bp for bulk soil and rhizosphere soil and from 540 to 1206-bp for root tissues (data not shown). Visual observations of B-RISA gels indicated that, for a given experimental condition, very few variations were detected among replicates (common bands between profiles could display different relative intensity), whereas some differences were recorded in F-RISA DNA fingerprints (bands specific of a profile and common to several profiles could display different relative intensity).

4.3. Variation of the genetic structure of microbial communities according to the compartment sampled

The spatial effect of *M. truncatula* was assessed by comparing the genetic structure of bacterial and fungal communities in bulk soil, rhizosphere soil and root tissue compartments at four sampling dates and for each of the three inoculation treatments (Fig. 2; Fig. 3). A rhizosphere effect was recorded for both bacterial and fungal communities. As a matter of fact, on the basis of PCA analyses, bulk soil and rhizosphere compartments were separated from the root tissue compartment on the first axis, and the bulk soil was separated from the rhizosphere soil compartments on the second axis (data not shown) whatever the sampling date and the inoculation treatment. Altogether, these PCA analyses stressed a larger modification of the genetic structure of both bacterial and fungal communities between the

Figure 2. Comparison of the genetic structures of bacterial communities of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5 (Myc+/Nod+) uninoculated (C), inoculated by *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (WT) or C7SM7 (HrcC-), after 42 (A), 49 (B), 56 (C), and 63 (D) days of culture. The genetic structure was studied by principal component B-RISA profiles obtained from the different compartments: bulk soil (S); rhizosphere soil of plants grown in the Mas d'Imbert soil (Rh); root tissues of plants (R). Each point represents one independent repetition (•).

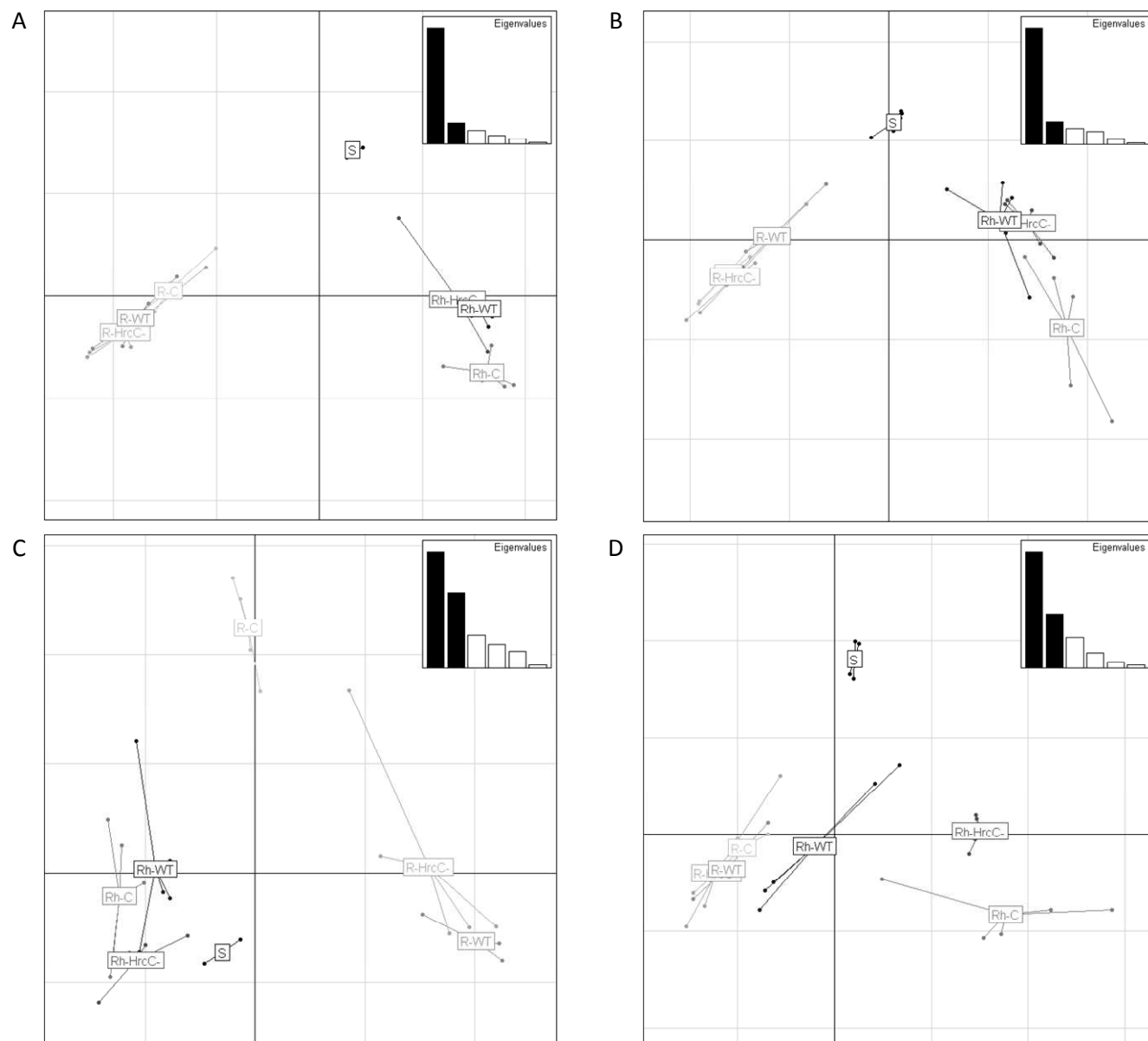


Figure 3. Comparison of the genetic structures of fungal communities of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5 (Myc+/Nod+) uninoculated (C), inoculated by *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (WT) or C7SM7 (HrcC-), after 42 (A), 49 (B), 56 (C), and 63 (D) days of culture. The genetic structure was studied by principal component F-RISA profiles obtained from the different compartments: bulk soil (S); rhizosphere soil of plants grown in the Mas d'Imbert soil (Rh); root tissues of plants (R). Each point represents one independent repetition (•).

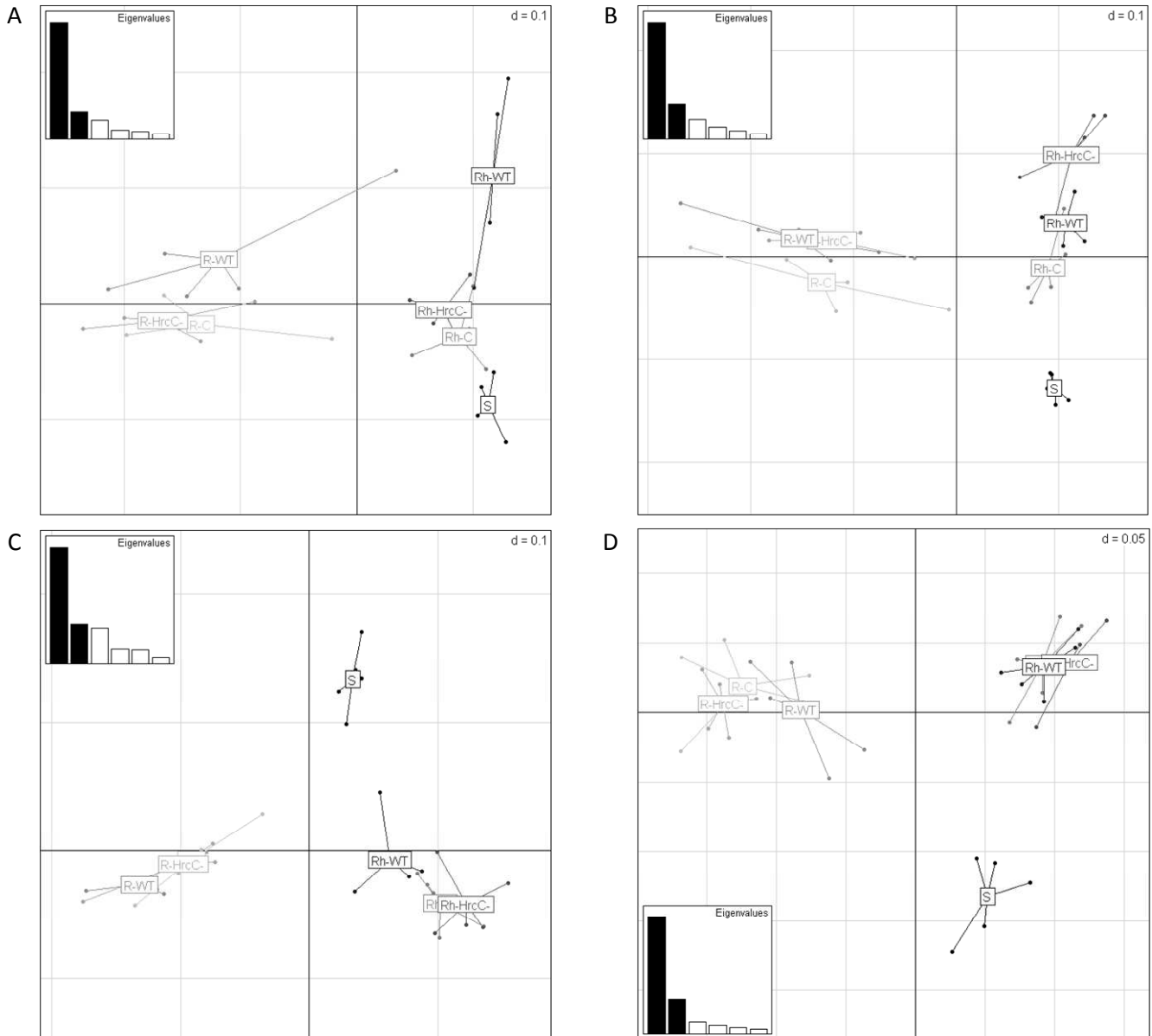
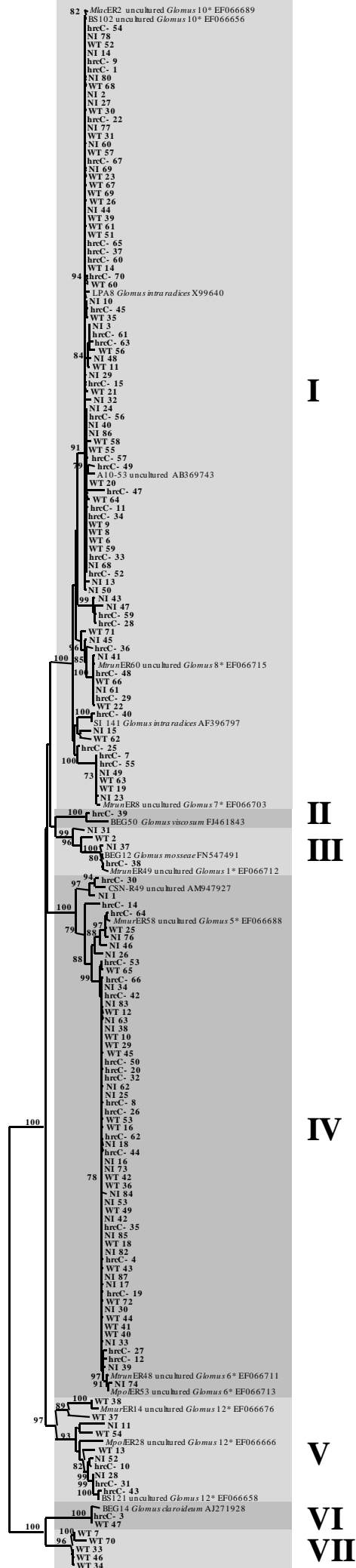


Figure S1. Neighbour-joining tree based on alignment of the LSU rDNA sequences of *Glomeromycetes* DNA from *M. truncatula* roots (indicated in bold) and of reference strains available in genome databases (indicates in italics). Bootstrap values from 1000 re-samplings are indicated for each branch as percentages, and values below 70% are not shown. LSU rDNA clades (I to VII) are indicated in grey shading. Scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.



root tissues and the two other compartments than between the bulk soil and the rhizosphere compartment. In addition, for each combination of time and of inoculation treatment, a more important modification of total microbial communities was observed in root tissues than in the rhizosphere compartment.

4.4. Impact of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 and of its *hrcC*- mutant on the genetic structure of microbial communities

The genetic structure of bacterial communities in the rhizosphere compartment was similar at 42, 49, and 56 days in all treatments (Fig. 2). In the rhizosphere soil, after 63 days of plant growth, the genetic structure of bacterial communities significantly differed between all treatments suggesting that bacterial communities were influenced by bacterial inoculation and that this influence differed between bacteria harbouring or not a functional T3SS. In the root tissue compartment, a significant difference in the genetic structure of bacterial communities was observed only at 56 days between the control and both inoculation conditions suggesting an inoculation effect but not a T3SS effect on the genetic structure of bacterial communities. No impact was recorded with the wild type strain or the mutant on the genetic structure of fungal communities whatever the soil compartment sampled (Fig. 3).

4.5. Intra-radical communities of indigenous AM fungi

A hundred and seventy-one LSU rDNA sequences were obtained from the DNA extracted from roots colonized by indigenous AMF: 60 from those inoculated with C7R12, 54 from those inoculated with the *hrcC*- mutant, and 57 from those of the non inoculated control plants. The LR1-FLR4 primer pair used has been previously shown to specifically amplify Glomeromycetes and, as expected, the results of BLAST searches in the GenBank database showed for all sequences that the highest similarity was observed with AMF belonging to this phylum (87-100% identity). These sequences were aligned together with the 18 best BLAST hits and subjected to Kimura two parameters analysis. The phylogenetic tree subsequently generated by neighbor-joining reconstruction showed seven distinct well supported clades I to VII (bootstraps 97-100%; supplementary Fig. S1). A great proportion of the sequences obtained in the present study, 87%, fell into two clades, I and IV, clustering 90 and 59 of the 171 LSU rDNA fragments, respectively. Clade I also included reference sequences from

Table 1. Distribution of LSU rDNA sequences in seven clades determined phylogenetically.

Origin	Number of sequences in clades							Total
	I <i>G. intraradices</i> and <i>Glomus</i> 10&7 ^a	II <i>G. viscosum</i>	III <i>G. mosseae</i> and <i>Glomus</i> 1	IV <i>Glomus</i> 5&6	V <i>Glomus</i> 12	VI <i>G. claroideum</i>	VII	
C7R12 inoculated roots	32	0	1	17	4	1	5	60
C7SM7 inoculated roots	30	1	1	18	3	1	0	54
Non inoculated roots	28	0	2	24	3	0	0	57
Total	90	1	4	59	10	2	5	171

a, *Glomus* OTUs as defined by Pivato *et al.* (2007).

Table 2. Genotypic diversity of *Ensifer* symbionts.

Species	IGS _{EXO} Genotype ^a	Number of root nodule isolates from <i>M. truncatula</i>			Total
		C7R12 inoculated roots	C7SM7 inoculated roots	Non inoculated roots	
<i>E. medicae</i>	A	15	14	12	58
	B	4	2	6	
	C	1	3	1	
<i>E. meliloti</i>	D	1	1	0	7
	E	1	0	0	
	F	0	1	0	
	ud	2	1	0	
Total		24	22	19	65

a, letters for the IGS_{EXO} genotype are given arbitrarily. ud, undetermined.

GenBank belonging to the *Glomus intraradices* species (X99640 and AF396797) and uncultured isolates of Operational Taxonomic Units (OTU) *Glomus* 10 and 7 as previously described by Pivato *et al.* (2007). Clade IV only included reference sequences obtained from uncultured isolates from OTU *Glomus* 5 and 6 (Pivato *et al.*, 2007). The five other clades only gathered 1 to 10 of the LSU rDNA sequences. The reference sequences of *G. mosseae* BEG12 (FN547491), *G. viscosum* BEG50 (FJ461843), and *G. claroideum* BEG14 (AJ271928), each fell in one of these clades. None of the reference sequences fell in clade VII. As expected, most of the uncultured reference sequences originated from a study of Pivato *et al.* (2007) also performed in the Mas d'Imbert soil.

Sequences originating from the three inoculation treatments were equally represented in the two major clades: the first one encompassed 32, 30 and 28 sequences and the second one 17, 18, and 24 sequences from C7R12 inoculation, *hrcC*- mutant inoculation, and non inoculated control treatments, respectively (Table 1). Sequences from the different treatments were also represented in the smallest clades encompassing more than one sample except in clade VII including five LSU rDNA sequences all originating from C7R12 inoculated roots. Sequences grouped in clade VII were significantly more represented among clones originating from C7R12 inoculated roots than among clones from both other inoculation treatments (Likelihood-ratio Chi2 = 10.75, 2 d.f., p = 0.005). For these sequences, the highest level of identity was observed with *G. claroideum* BEG14 (AJ271928), however they were grouped in a distinct clade supported by a 96% bootstrap value.

4.6. Intra-radical communities of nitrogen fixing symbionts

Sixty five IGS_{EXO} sequences were obtained: 24 from the roots of C7R12 inoculated *M. truncatula*, 22 from the roots of *M. truncatula* inoculated with the *hrcC*- mutant, and 19 from the roots of the non inoculated control plants (Table 2). A majority of these sequences, 83 to 100% depending on the inoculation treatment, belonged to *E. medicae*. The species *E. meliloti* was therefore poorly represented. Differences observed in the repartition of both species between the three inoculation treatments were not significant (G-like test: p = 0.16). Dominance of the same *E. medicae* IGS_{EXO} genotype, representing 63 to 75% of the isolates belonging to that species was observed whatever the inoculation treatment. The distribution of

the *E. medicae* IGS_{EXO} genotypes did not differ statistically between the inoculation treatments (G-like test: $p = 0.52$).

5. Discussion

A model system providing contrasted effects on the mycorrhization of *M. truncatula* has been used in order to better understand the action mode of a T3SS in the MHB effect of a pseudomonad strain. In the non sterilized soil of the Mas d'Imbert, the root colonization of *M. truncatula* by indigenous AMF could be significantly promoted by the inoculation of C7R12, a *P. fluorescens* MHB strain harbouring a functional T3SS. Viollet *et al.* (submitted for publication) demonstrated previously that the T3SS was linked to this beneficial effect since mycorrhization depletion could be obtained by inoculation of a mutant in which the secretion system is inactivated. The experiment presented by these authors has been reproduced in the same experimental conditions but using different sampling dates in order to better describe the initial root colonization stages by AMF.

Root colonization kinetics showed that differences observed in the root colonization patterns were established between 42 and 49 days of plant growth. However, for these two sampling dates, no differences were observed in structure of total bacterial and fungal communities whatever the inoculation treatment. Therefore, no important structural variation of the microbial communities could be associated with the establishment of the mycorrhization patterns of *M. truncatula*. On the other hand, significant differences were observed between the structures of bacterial communities originating from the three different treatments at the last sampling date. These variations have been recorded more than two weeks after the observation of differential effects on the mycorrhization parameters depending on the inoculation treatment, which suggests that they are not involved in the modifications observed in the root colonization of *M. truncatula*. On the contrary, these differences observed in the microbial community structure could be a consequence of the modification of the mycorrhization patterns. As a matter of fact, differences in bacterial community composition observed between bulk and rhizosphere soil and between rhizospheres of different plant species have been assumed to be strongly governed by quantitative and qualitative rhizodeposit differences. Rhizodeposition is known to be influenced by mycorrhizas (Jones *et al.*, 2004), therefore the modifications of root colonization by AMF observed in the present

study might have affected differently the plant physiology depending on the inoculation treatment and consequently the corresponding rhizodeposits. This hypothesis is in accordance with the results of Singh *et al.* (2008) and of Vestergard *et al.* (2008) that showed that AM influence the bacterial assemblage in the rhizosphere. In the present study, the modifications of *M. truncatula* mycorrhization have been initially induced by bacterial inoculation and further suggest that bacteria might also take an active part in a feedback loop of co-evolution between the plant and root associated microorganisms. The distribution of fungal species in soils is highly heterogeneous, fungi are known to be spatially clustered leading to hot spot distribution of their biomass and diversity (Horton & Bruns, 2001). This source of variability in fungal community analysis has been limited in the present study by using samples of one gram as recommended by Ranjard *et al.* (2003). However it explains the remaining differences observed between and within samples in the F-RISA analyses. No significant differences were observed in the total fungi communities depending on the inoculation treatment. These results are in accordance with previous findings that also described a highest stability of the fungal communities compared to the bacterial ones during vegetative stage in the rhizosphere of *M. truncatula* (Mougel *et al.*, 2006).

Analysis of the composition of the intra-radical *Ensifer* community confirmed the preferential association between *E. medicae* and *M. truncatula* in the Mas d'Imbert soil as previously described by Bailly *et al.* (2006). However, no significant influence of the *P. fluorescens* T3SS functioning was observed on this community of nitrogen-fixing symbionts. Analysis of the composition of intra-radical AMF community confirmed the weak impact of the three inoculation treatments on the fungi community. For all sequences obtained the highest level of identity was observed with representatives of the *Glomus* genus. Among this genus a great majority of LSU rDNAs determined herein clustered with representatives of the species *G. intraradices* whatever the inoculation treatment. Working on *Solanum tuberosum*, Cesaro *et al.* (2008) also described the predominance of *G. intraradices* in the plant roots. These results confirm the wide distribution of the species *G. intraradices* which is known to occur globally (Morton & Bentivenga, 1994). However, using another molecular marker Börstler *et al.* (2010) stressed the infraspecific heterogeneity of *G. intraradices*. The discrimination level reached by analysis of LSU rDNAs sequences could therefore have been insufficient to unravel differences between the impacts of the inoculation treatments

compared. Further characterization of the sequences obtained in this study would therefore be interesting.

The only significant difference observed in the diversity of intra-radical AMF communities associated with roots inoculated or not with C7R12 was the presence of an additional group. This group was specifically associated with the roots inoculated with C7R12 and represented 8% of the sequences originating from this treatment. This specific association is supported by previous results reported by Pivato *et al.* (2007). These authors also described LSU rDNA sequences from intra-radical representatives of AMF associated to *M. truncatula* in the Mas d'Imbert soil, but did not find any representatives of this group. Further study of this preferential association would bring interesting information on the specificity of plant-bacteria-fungi interactions. The promotion of AMF root colonization by the inoculation of C7R12 observed was homogeneous as indicated by the small standard deviations of the M% and A% mean values recorded for this treatment after 49, 56, and 63 days (Fig. 1). Therefore, considering the weak numerical representation of LSU rDNA sequences specifically described from C7R12 inoculated roots, it is highly improbable that the differences observed in root colonization could only be due to the presence of the corresponding AMF.

Altogether, the present results do not support the hypothesis that differences observed in the mycorrhization patterns could be associated with the presence of AMF presenting distinct ability for root colonization. The positive influence of *P. fluorescens* C7R12 *via* its T3SS would therefore be, at least partly, due to a quantitative effect on AMF root colonization. Studies are underway to further assess this last hypothesis and to better understand the mechanisms involved. Phytopathogenic pseudomonads are known to subvert plant defense systems in order to allow an increased endophytic colonization *via* the functioning of a T3SS (Jones & Dangl, 2006). A modification of plant defense reactions by the *P. fluorescens* C7R12 T3SS functioning could benefit to other root colonizers such as AMF. Research in that direction will be privileged.

6. Acknowledgments

This work was funded by the Regional Council of Burgundy, RCB (Dijon, France) and supported by a doctoral grant to A. Viollet by 'Conseil Régional de Bourgogne' and INRA (EA, SPE).

7. References

- Bailly X, Olivieri I, de Mita S, Cleyet-Marel JC, Béna G. 2006. Recombination and selection shape the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing *Sinorhizobium* sp. associated to *Medicago*. *Molecular Ecology* 15: 2719-2734.
- Bever JD. 2002. Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society B* 269: 2595-2601.
- Bonfante P, Anca IA. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363-383.
- Börstler B, Thiéry O, Sýkorová Z, Berner A, Redecker D. 2010. Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497-1511.
- Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Brundrett MC. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37-77.
- Cesaro P, van Tuinen D, Copetta A, Chatagnier O, Berta G, Gianinazzi S, Lingua G. 2008. Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato farming area. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5776-5783.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14: 111-117.
- Grübe M, Berg G. 2009. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews* 23: 72-85.
- Hartnett DC, Wilson GWT. 2002. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and Soil* 244: 319-331.

- Hassouna N, Mithot B, Bachellerie JP. 1984. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 12: 3563-3583.
- Horton TR, Bruns TD. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10: 1855-1871.
- Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y. 2004. Plant mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163: 459-480.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kimura M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Morel C, Plenchette C, Fardeau JC. 1992. La fertilisation phosphatée raisonnée de la culture du blé. *Agronomie* 12 : 565-579.
- Morton JB, Bentivenga SP. 1994. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. *Plant and Soil* 159: 47-59.
- Mougel C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, Robin C, Lemanceau P. 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different development stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist* 170: 165-175.
- Naumann M, Schüßler A, Bonfante P. 2010. The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the *Mollicutes*. *ISME Journal* 4: 862-871.
- Nicholas KB, Nicholas HB. 1997. GENEDOC a tool for editing and annoting multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M, Simonet P. 1996. ITS analysis of prokaryotes. In: Akkermans DL, van Elsas JD, de Bruijn EI, eds. *Molecular microbial ecology manual*. Amsterdam, the Netherlands: Kluwer Academic, 1-12.
- Offre P, Pivato B, Siblot S, Gamalero E, Corberand T, Lemanceau P, Mougel C. 2007. Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied Environmental Microbiology* 73: 913-921.
- Offre P, Pivato B, Mazurier S, Siblot S, Berta G, Lemanceau P, Mougel C. 2008. Microdiversity of *Burkholderiales* associated with mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 180-192.
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougel C, van Tuinen D. 2007. *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176: 197-210.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougel C, Lemanceau P, Berta G. 2009. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19: 81-90.

- Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, Thioulouse J, Linet P, Richaume A. 2000. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg (II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 107-115.
- Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougél C, Thioulouse J, Nazareth S. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4479-4487.
- Ranjard L, Lejon PHD, Mougél C, Scherer L, Merdinoglu D, Chaussod R. 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology* 5: 1111-1120.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 11841-11843.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheublin TR, Sanders IR, Keel C, van der Meer JR. 2010. Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME Journal* 4: 752-763.
- Sequerra J, Marmeisse R, Valla G, Normand P, Capellano A, Moiroud A. 1997. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and random amplified polymorphic DNA. *Mycological Research* 101: 465-472.
- Singh BK, Nunan N, Ridgway KP, McNicol J, Young JPY, Daniell TJ, Prosser J, Millar P. 2008. Relationship between assemblages of mycorrhizal fungi and bacteria on grass roots. *Environmental Microbiology* 10: 534-541.
- Taylor J, Harrier LA. 2000. A comparison of nine species of arbuscular mycorrhizal fungi on the development and nutrition of micropropagated *Rubus idaeus* L. cv. Glen Prosen (Red Raspberry). *Plant and Soil* 225: 53-61.
- Thioulouse J, Dray S. 2007. Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* 22: 1-14.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thompson JD, Gibson, TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.

- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*, Paris, France: INRA Presse, 217-221.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 255 rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* 17: 879-887.
- Vestergård M, Henry F, Rangel-Castro JI, Michelsen A, Prosser JI, Christensen S. 2008. Rhizosphere bacterial community composition responds to arbuscular mycorrhiza, but not to reductions in microbial activity induced by foliar cutting. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 78-89.
- Vincent JM. 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Warmink JA, Nazir R, van Elsas JD. 2008. Universal and species-specific bacterial 'fungiphiles' in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology* 11: 300-312.
- Warmink JA, van Elsas JD. 2008. Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? *ISME Journal* 2: 887-900.

Bilan

Le suivi en cinétique des paramètres de mycorhization de *M. truncatula* a tout d'abord permis de préciser pour la colonisation de la racine par les champignons mycorhizogènes à arbuscules qu'un plateau est atteint entre 42 et 49 jours de culture. Les effets de l'inoculation de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et C7SM7 (SST3-) sont observés à partir de 49 jours. Les résultats de cette étude nous ont permis de confirmer les observations décrites dans le chapitre précédent. Dès 49 jours de culture des plantes, la présence du SST3 de C7R12 contribue effectivement à l'amélioration de la croissance de la plante en induisant la promotion de la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA. Ce travail a également permis de confirmer que l'absence d'un SST3 fonctionnel chez le mutant C7SM7 avait un effet délétère sur la mycorhization.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de différences majeures concernant les populations de bactéries fixatrices d'azote dans les nodosités isolées des racines, que ce soit en présence de la souche sauvage *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) ou de son mutant C7SM7 (SST3-). De même, dans les racines des plantes, aucune différence importante n'a été observée dans la composition des populations des CMA en réponse à l'inoculation des deux souches de *P. fluorescens*. Toutefois, un groupe de CMA particulier, représentant 8% des séquences issues des racines, a été identifié comme étant préférentiellement associé à l'inoculation de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+). Sachant que l'amélioration de la colonisation de la racine avait été observée de façon très homogène dans les racines inoculées avec C7R12, il apparaît peu probable que cet effet ne soit lié qu'à ce groupe de CMA faiblement représenté. Les données obtenues renforcent donc l'hypothèse selon laquelle l'effet promoteur de la mycorhization lié au SST3 de C7R12 serait la conséquence d'une intensification globale de la colonisation de la racine plutôt que d'une sélection de champignons mycorhizogènes qui posséderaient de meilleures capacités de colonisation.

Que ce soit en présence de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) ou de son mutant SST3-, aucune variation de la structure des communautés fongiques et bactériennes, dans la rhizosphère et les racines, n'a été associée à l'établissement de la mycorhization. Les effets observés sur la mycorhization et la croissance des plantes ne semblent donc pas résulter d'une

modification de la structure des communautés microbiennes qui aurait pu favoriser par exemple, des CMA ayant une meilleure aptitude à la colonisation. Par contre, deux semaines après l'observation d'effets différentiels sur les paramètres de mycorhization induits par l'inoculation de C7R12 et de C7SM7, nous avons observés des différences significatives dans la structure des communautés bactériennes. Ces variations ne seraient donc pas une cause mais plutôt une conséquence des modifications de colonisation de la racine par les CMA.

C'est dans le but d'identifier de nouvelles hypothèses concernant les mécanismes impliqués dans l'effet du SST3 sur la mycorhization qu'une étude exploratoire, présentée dans le chapitre suivant, a été entreprise.

CHAPITRE V

Contribution du système de sécrétion de type III à la colonisation rhizosphérique et à l'adaptation de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 à la vie endophyte

Contribution du système de sécrétion de type III à la colonisation rhizosphérique et à l'adaptation de <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 à la vie endophyte.....		115
1. Introduction _____		115
2. Matériels et méthodes _____		116
2.1. Culture gnotobiotique de <i>M. truncatula</i> en boîtes de Pétri sur de l'eau gélosée		
2.2. Culture gnotobiotique de <i>M. truncatula</i> en tubes dans du sable de Biot		
2.3. Prélèvements et études microbiologiques		
2.4. Etude de la colonisation de la racine de surface à l'aide du microscope électronique à balayage (MEB)		
2.5. Etude de la colonisation intraradiculaire à l'aide du microscope électronique à transmission (MET)		
3. Résultats _____		123
3.1. Contribution du SST3 à la survie de C7R12 dans la rhizosphère et dans les racines		
3.2. Localisation des bactéries à la surface de la racine		
3.3. Localisation des bactéries dans les tissus de la racine		
3.4. Colonisation de la racine par les bactéries		
4. Discussion _____		127

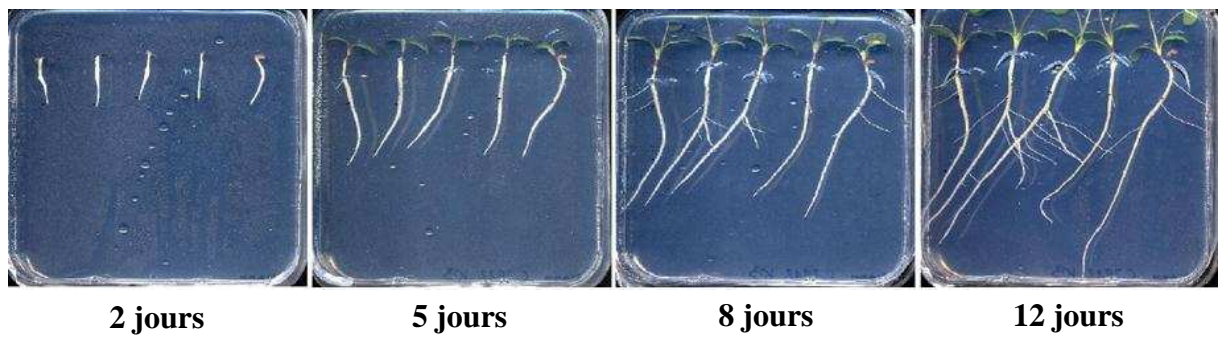
Contribution du système de sécrétion de type III à la colonisation rhizosphérique et à l'adaptation de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 à la vie endophyte

1. Introduction

Les résultats de nos études précédentes nous ont conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle les SST3 des *Pseudomonas* pourraient être impliqués dans les interactions avec les mycorhizes plutôt qu'avec les champignons mycorrhizogènes à un stade présymbiotique. En effet, la promotion de croissance de la plante *via* une amélioration de la mycorhization est liée à l'amélioration de la colonisation de la racine et/ou de la formation associée d'arbuscules. Par ailleurs, ces résultats tendent à montrer que l'effet positif des SST3 sur le fonctionnement des mycorhizes aurait lieu à l'intérieur des racines. Les résultats du chapitre précédent, montrent que dans leur grande majorité, les champignons mycorrhizogènes à arbuscules associés à *M. truncatula* sont les mêmes que les plantes aient été ou non inoculées avec *P. fluorescens* C7R12 et donc que l'on ait ou non observé une stimulation des paramètres de mycorhization et de croissance de la plante. Ces observations nous ont conduits à privilégier l'hypothèse selon laquelle cette souche pourrait stimuler directement la colonisation de la racine voire l'activité des CMA plutôt que l'hypothèse d'une sélection particulière des CMA naturellement dans la rhizosphère et/ou associés aux racines.

On sait d'une part que chez les *Pseudomonas* phytopathogènes, le SST3 intervient (i) dans la modification des réactions de défense de la plante (Hueck, 1998) et (ii) dans la capacité de vie endophyte de ces bactéries (Deng *et al.*, 1998). D'autre part, Sanchez *et al.* (2004 et 2005) ont montré que *P. fluorescens* C7R12 est capable de coloniser les racines de *M. truncatula*. Or, pour coloniser les tissus de la racine, les bactéries endophytes doivent également mettre en œuvre des mécanismes capables de modifier les réactions de défense de l'hôte végétal (Ryan *et al.*, 2008). On sait par ailleurs, que les champignons mycorrhizogènes qui colonisent les racines doivent eux aussi contourner les défenses des plantes et mettent en œuvre des mécanismes similaires à ceux des bactéries (Schäfer *et al.*, 2009).

Figure 1. Culture de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 en boites de Pétri sur eau gélosée et solution nutritive de Hoagland et Arnon.



Sanchez *et al.* (2004 et 2005) ont également montré que la colonisation endophyte de C7R12, qui se trouve réduite chez le mutant *M. truncatula* TRV25, est *DMI3* dépendante. Ces auteurs ont de plus montré que des réponses similaires dans l'expression de gènes de *M. truncatula* étaient induites par *Glomus mosseae* BEG12 et *P. fluorescens* C7R12 suggérant l'existence de processus communs dans la perception précoce des signaux microbiens par les racines de la plante en réponse à ces deux microorganismes.

La stimulation de la colonisation des racines par les CMA, observée après inoculation de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) pourrait donc être liée à la modification des mécanismes de défense de la plante hôte. *P. fluorescens* C7R12 pourrait modifier l'interaction des plantes avec les CMA en modifiant les réponses des plantes, facilitant la colonisation de la racine par ces champignons. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le SST3 de C7R12 pourrait être impliqué dans la phase de vie endophyte de la bactérie. Pour évaluer cette hypothèse, une étude exploratoire mettant en œuvre des méthodes de microbiologie pasteurienne et de microscopie, a été entreprise. Nous avons comparé la colonisation de la rhizosphère et des racines de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 par *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant C7SM7 (SST3-). Sachant que la colonisation endophyte de C7R12 est réduite chez TRV25 dont le gène *DMI3* est inactivé (Sanchez *et al.*, 2005), nous avons donc également étudié les interactions entre la bactérie et ce mutant de *M. truncatula*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture gnotobiotique de *M. truncatula* en boîtes de Pétri sur de l'eau gélosée

Un premier bioessai permettant la culture gnotobiotique in vitro de M. truncatula a été utilisé (Fig. 1). Ce bioessai permet d'étudier facilement un grand nombre de plantes mais les observations sont limitées à des stades de croissance très précoces (12 jours).

Les graines de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5, génotype sauvage capable d'établir des mycorhizes à arbuscules ainsi que des symbioses fixatrices d'azote (Myc+/Nod+) ont été calibrées et les graines entre 5 et 5,5 mg ont été sélectionnées. Les graines ont été scarifiées afin d'améliorer leur taux de germination et désinfectées pour éviter l'apport de microorganismes exogènes lors du semis selon un protocole précédemment décrit

Tableau 1. Composition de la solution nutritive de Hoagland et Arnon utilisée.

MACROELEMENTS	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	5 mM
KNO ₃	2,5 mM
MgSO ₄ ,7H ₂ O	1 mM
CaNO ₃ ,4H ₂ O	5 mM
MICROELEMENTS	
H ₃ BO ₃	50 µM
CoCl,7H ₂ O	50 nM
CuSO ₄ ,5H ₂ O	50 nM
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	5 µM
KI	2,5 µM
MnSO ₄ ,H ₂ O	50 µM
MoNa,2H ₂ O	3 µM
FeCl₃ 50 mM, 1% HCl 0,25 N	200 µM

Figure 2. Culture gnotobiotique de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5, inoculé ou non par *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant C7SM7 (SST3-). Culture en tubes à essai dans du sable de Biot contenant la solution nutritive de Hoagland et Arnon.



21 jours

par Pivato *et al.* (2007). Brièvement, les graines ont été immergées dans une solution d'acide sulfurique (98%) pendant 2 min, puis dans une solution d'éthanol (95%) pendant 5 min et enfin dans une solution d'hypochlorite de sodium (3,5%) pendant 10 min. Après chaque étape, les graines ont été rincées abondamment avec de l'eau stérile. Les graines stérilisées ont ensuite été mises à germer 48 h à 25°C et à l'obscurité, sur de l'eau gélosée (0,7%).

Après une préculture à 25°C pendant 24 h sur 9 mL de milieu King B en tube incliné (KB ; King *et al.*, 1954), les deux souches bactériennes, *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant *hrcC*- *P. fluorescens* C7SM7 (SST3-) ont été mises en culture. Une oëse de la préculture a été inoculée dans 20 mL de KB liquide et cultivée pendant 24 h à 25°C et en agitation à 250 rpm. Les culots bactériens ont été récupérés par centrifugation à 8000 rpm et 4°C pendant 10 min. Après 2 lavages dans 25 mL d'eau osmosée stérile, les culots bactériens ont été remis en suspension dans 50 mL d'eau osmosée stérile. La densité bactérienne a été évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm et le nombre d'unités formant colonies (UFC) a été estimé à l'aide d'une gamme étalon établie à partir de dénombrements de la souche C7R12.

Les graines germées ont été mises en culture en boîte de Pétri (12 x 12 cm) sur de l'eau gélosée (1%), additionnée de solution nutritive de Hoagland et Arnon, préparée dans de l'eau osmosée stérile et filtrée sur membrane de 0,2 µm. La composition de la solution nutritive utilisée est présentée dans le tableau 1. Pour chaque plantule, 10⁷ UFC de C7R12 ou de C7SM7 ont été apportées dans 50 µL d'eau osmosée stérile au niveau de la racine. Les témoins non inoculés ont reçu un volume d'eau osmosée stérile équivalent.

Les plantes ont été analysées après 12 jours de culture (début du stade trifolié) en chambre climatisée avec une photopériode jour:nuit de 16:8 h, une thermopériode de 23:18°C et une radiation de 200 µmol de photons m⁻² s⁻¹ à la surface des plantules.

2.2. Culture gnotobiotique de *M. truncatula* en tubes dans du sable de Biot

Afin de pouvoir amener les plantes à des stades de culture plus avancés (28 jours), un deuxième bioessai de culture in vitro en conditions gnotobiotiques a été développé (Fig. 2).

Tableau 2. Principales caractéristiques chimiques du sable de Biot utilisé. Les analyses ont été effectuées par le 'Laboratoire d'Analyses des Sols' (Arras, France).

pH	7,6
Calcaire (CaCO ₃)	< 1 g kg ⁻¹
Phosphore (P ₂ O ₅)	0,001 g kg ⁻¹
Calcium (Ca)	0,145 g kg ⁻¹
Magnésium (Mg)	0,0107 g kg ⁻¹
Potassium (K)	0,00625 g kg ⁻¹
Manganèse (Mn)	0,626 mg kg ⁻¹
Cuivre (Cu)	< 0,5 mg kg ⁻¹
Fer (Fe)	1,47 mg kg ⁻¹
Zinc (Zn)	0,329 mg kg ⁻¹

Les graines de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 (Myc+/Nod+) et de son mutant *DMI3 M. truncatula* TRV25, génotype incapable de mycorhizer ou de noduler (Myc-/Nod- ; Catoira *et al.*, 2000 ; Morandi *et al.*, 2005) ont été mises à germer suivant le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.. De même, les inocula de *P. fluorescens* C7R12 et de C7SM7 ont été préparés selon ce même protocole, cependant, les culots bactériens ont été remis en suspension dans la solution nutritive de Hoagland et Arnon filtrée sur membrane de 0,2 µm (Tab. 1) après les 2 lavages avec l'eau osmosée stérile.

Les principales caractéristiques chimiques du sable de Biot utilisé sont présentées dans le tableau 2. Trente grammes de sable de Biot ont été introduits dans des tubes en verre (diamètre de 2 cm ; longueur de 20 cm). Les tubes ont été fermés avec du coton cardé et ont été autoclavés 2 fois en humide et 1 fois à sec, 20 min à 120°C pour chaque autoclave, à 24 h d'intervalle. La solution nutritive filtrée (4,5 mL) a été ajoutée dans chaque tube et une graine germée par tube a ensuite été repiquée. Chaque plantule a été inoculée avec C7R12 ou C7SM7. Les bactéries ont été apportées à une densité finale de 10^7 UFC g⁻¹ de sable dans 1 mL de solution nutritive. Les témoins non inoculés ont reçu un volume de solution nutritive équivalent.

Les plantes ont été prélevées après 28 jours de culture (stade 2 à 3 feuilles trifoliées) dans les conditions décrites précédemment (paragraphe 2.1.).

2.3. Prélèvements et études microbiologiques

Les bactéries rhizosphériques ont été dénombrées à partir du bioessai en sable de Biot. Cinq tubes contenant chacun une plantule ont été préparés pour chaque traitement (J5 et TRV25 non inoculés et inoculés avec C7R12 ou C7SM7). Les plantes ont été prélevées en introduisant 3 fois 20 mL d'eau osmosée stérile dans chacun des tubes de culture. Afin d'enlever un maximum de sable, chaque racine a ensuite été lavée 3 fois par agitation 1 min au vortex, dans 20 mL d'eau osmosée stérile. Pour chaque échantillon, les 60 mL d'eau ayant permis de récolter chaque plante et les 60 mL d'eau des différents lavages ont été regroupés. Le sol rhizosphérique, correspondant aux 30 g de sable en solution dans les 120 ml d'eau osmosée stérile, a ensuite été agité pendant 20 min à 200 rpm (Agitests, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Les bactéries du compartiment racines-rhizoplan ont été dénombrées pour les racines récoltées à partir du bioessai en sable de Biot et lavées avec l'eau osmosée stérile. Chaque racine lavée a été broyée à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles dans 1 mL d'eau osmosée stérile apportée en deux fois.

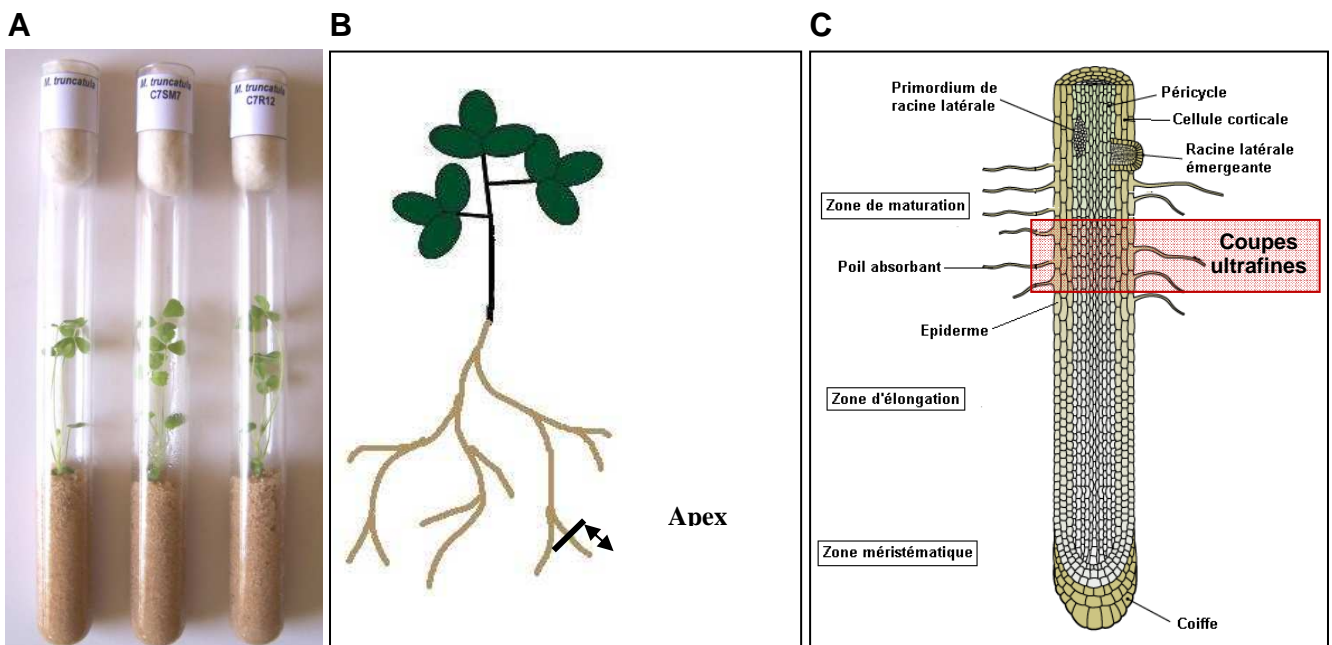
Les bactéries endophytes ont été dénombrées à partir des racines du bioessai en boîtes de Pétri. Pour chaque traitement (J5 non inoculé, inoculé avec C7R12 et inoculé avec C7SM7), 5 boîtes contenant 5 plantules, soit au total 25 plantes, ont été mises en culture. Chaque racine a été prélevée puis stérilisée par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium (3%), additionnée de Tween 20 (0,5%), pendant 15 min et rincée dans cinq bains successifs d'eau stérile. L'absence de *Pseudomonas* à la surface des systèmes racinaires désinfectés a été vérifiée par étalement de la dernière eau de rinçage sur milieu KB. Chaque racine ainsi désinfectée a été broyée à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles dans 100 µL d'eau osmosée stérile apportée en deux fois.

Les bactéries de la rhizosphère, du compartiment racines-rhizoplan et les bactéries endophytes ont été dénombrées par numération sur boîtes de Pétri et milieu KB. Les résultats ont été analysés par ANOVA et les groupes homogènes ont été obtenus à l'aide du test PLSD de Fisher (5%). Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel de statistiques StatView.

2.4. Etude de la colonisation de la surface des racines à l'aide du microscope électronique à balayage (MEB)

Le principe d'analyse du MEB conventionnel est basé sur la projection d'un faisceau d'électrons (électrons primaires) sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre le faisceau et l'échantillon génère une émission de différentes particules, électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger et rayons X. Les électrons secondaires de basse énergie sont accélérés vers un détecteur qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

Figure 5. Localisation des prélèvements des échantillons de racine pour l'observation en microscopie. *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 a été cultivé dans le bioessai en sable de Biot inoculé ou non avec *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) ou son mutant C7SM7 (SST3- ; A). Les prélèvements de fragments de racine (environ 1 cm) ont été effectués au niveau des apex de la racine (B). Les coupes ultrafines ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome, à 5 mm au dessus de la zone d'élongation, au début de la zone pilifère (C).



Les observations des échantillons ont été réalisées avec la collaboration de Laure Avoscan (Microbiologie des Sols et de l'Environnement, INRA-Université, Dijon) et d'Aline Bonnotte (Centre de Microscopie, INRA-Université, Dijon), à l'aide du microscope ESEM XL30 Philips (CM, INRA, Dijon, France). Ce microscope est équipé d'une source à électrons LaB6 et utilise un détecteur d'électrons secondaires pour reconstruire l'image de la surface de l'échantillon. Les images ont été numérisées et stockées sous format TIFF.

Prélèvement et fixation des fragments de racine pour le MEB

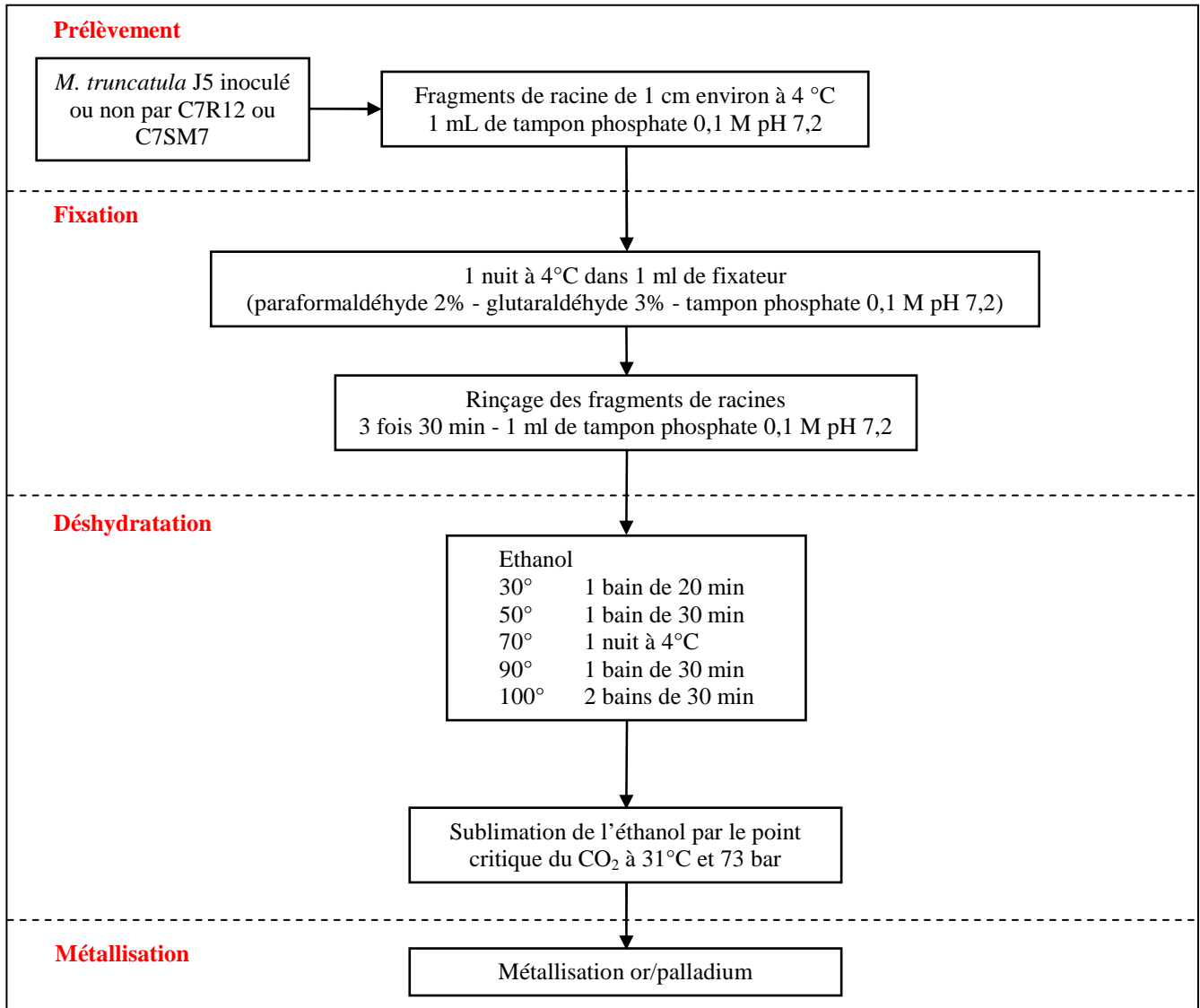
Cette première étape a pour but de prélever les échantillons qui seront observés par la suite et de les immobiliser dans un état aussi voisin que possible de celui du vivant en préservant au maximum l'intégrité des tissus de la racine.

Pour l'étude en MEB, 3 tubes contenant chacun 1 plantule ont été préparés pour chaque traitement (J5 non inoculé et inoculé avec C7R12 ou C7SM7) à l'aide du bioessai en sable de Biot (Fig. 5A). Le système racinaire a été récupéré et introduit dans un tube stérile avec 40 mL d'eau osmosée. Pour retirer un maximum de sable, la racine a ensuite été vortexée 30 s et ce lavage mécanique a été répété 2 fois. Pour chaque système racinaire, l'excédent d'eau a été enlevé sur du papier absorbant. Les fragments de racine de 1 cm environ (10 à 15 fragments par plante) ont été prélevés au niveau des apex (Fig. 5B). Les fragments de racine ont été disséqués sous une loupe binoculaire dans un liquide fixateur à 4°C. Le fixateur est composé de paraformaldéhyde (2%) et de glutaraldéhyde (3%) et a été préparé dans le tampon phosphate de Sørensen (0,1 M) à un pH de 7,2. Ces fragments de racine ont été récoltés dans des tubes en verre contenant du tampon de fixation, dégazés sous vide et placés sous agitation toute une nuit à 4°C.

Préparation des échantillons pour le MEB

Les échantillons doivent être absolument secs et ne comporter aucune trace d'eau. En effet, la pression dans la chambre d'observation est très faible et les molécules d'eau contenues dans l'échantillon risqueraient de détruire les cellules en s'évaporant ou de polluer la chambre d'observation. La technique du point critique du CO₂ a été choisie pour déshydrater les échantillons. Le point critique du CO₂ est atteint à une température de 31°C

Figure 6. Protocole de préparation des échantillons pour le MEB.



et une pression de 73 bar se traduisant par le passage du CO₂ liquide sous forme de gaz. Cette technique du point critique permet une déshydratation sans déformation de l'échantillon. Les échantillons biologiques doivent impérativement être métallisés avant leur observation afin d'augmenter leur conductivité électrique.

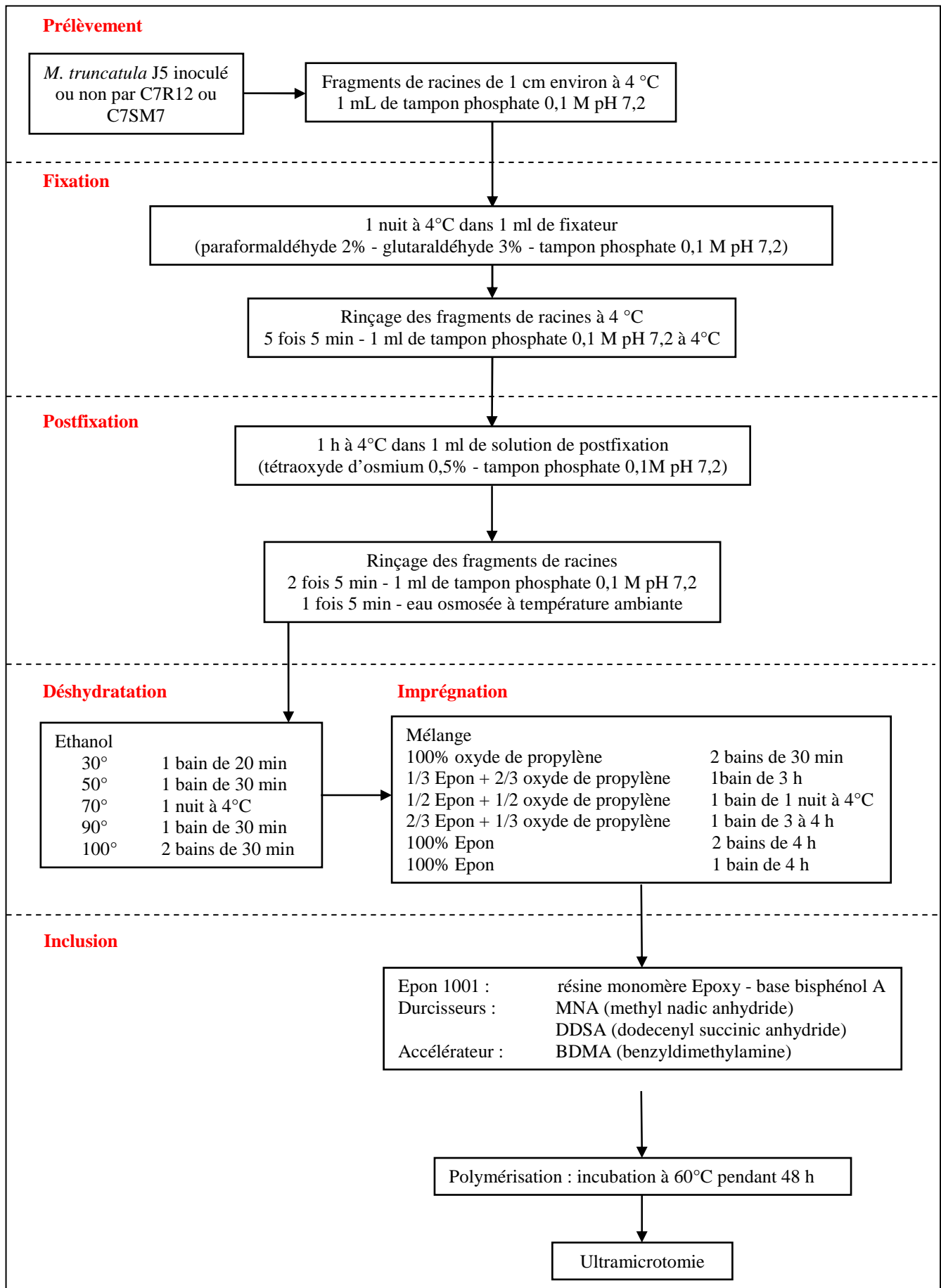
La figure 6 expose le protocole de traitement des prélèvements réalisé pour le MEB. Les produits chimiques utilisés pour la préparation des échantillons, ont été obtenus chez Sigma, Electron Microscopy Sciences et Agar Scientific. Les fragments de racine ont été progressivement déshydratés. Cette déshydratation a été obtenue par immersion dans des bains successifs d'éthanol en concentrations croissantes. L'échantillon, immergé dans l'éthanol, a été transféré dans la chambre de l'appareil à point critique afin de remplacer l'éthanol liquide présent par du CO₂ liquide à 10°C. Les échantillons ont ensuite été collés sur des supports métalliques à l'aide de ruban adhésif double face en carbone. Les échantillons ont été métallisés par pulvérisation cathodique d'or et de palladium sous atmosphère de gaz neutre (argon).

2.5. Etude de la colonisation intraradiculaire à l'aide du microscope électronique à transmission (MET)

Le MET est largement exploité dans le domaine des sciences de la vie notamment pour l'observation de structures cellulaires. Dans son principe, la microscopie à transmission ressemble à la microscopie photonique à la différence que le faisceau lumineux (photons) du microscope optique est remplacé par un faisceau convergent d'électrons. Elle consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons et d'utiliser un système de lentilles électromagnétiques pour projeter l'image de l'échantillon sur un écran fluorescent qui transforme l'image électronique en image optique. L'image observée est le résultat de l'interaction des électrons traversant l'échantillon : (i) les électrons traversant une région dense de l'échantillon seront stoppés ou déviés et l'image de la zone sur l'écran apparaîtra sombre, en revanche, (ii) les électrons traversant une zone peu dense seront transmis et l'image de la zone sera claire sur l'écran.

Les observations des échantillons ont été réalisées avec la collaboration de Laure Avoscan (Microbiologie des Sols et de l'Environnement, INRA-Université, Dijon), de

Figure 7. Protocole de préparation des inclusions pour l’ultramicrotomie.



Jeannine Lherminier et Christine Arnould (Centre de Microscopie, INRA-Université, Dijon), à l'aide du microscope Hitachi H 7500 (CM, INRA, Dijon, France). Les observations ont été réalisées sous une tension d'accélération de 80 kV. La numérisation des images a été réalisée grâce à une caméra numérique, modèle AMT Advantage (Capteur CCD 1,3 millions de pixels, 1024 x 1024) pilotée par le logiciel d'acquisition AMT Image Capture Engine.

Prélèvement, fixation et postfixation des fragments de racine pour le MET

Pour l'étude en MET, 3 tubes contenant chacun une plantule ont été préparés pour chaque traitement (J5 non inoculé et inoculé avec C7R12 ou C7SM7) selon le protocole du bioessai en sable de Biot. Les prélèvements et la fixation ont été réalisés comme décrits pour le MEB (paragraphe 2.4.). L'étape de fixation des fragments de racine a été suivie par une étape de postfixation chimique comme décrit dans la figure 7.

Préparation des échantillons pour le MET

La transmission du faisceau du MET impose une préparation particulière de l'échantillon car les électrons sont facilement absorbés et diffractés par la matière solide. Ainsi, seules de très fines coupes de l'échantillon peuvent être observées. En général, l'échantillon doit avoir une épaisseur comprise entre 50 et 90 nm d'épaisseur, soit environ 1/20^{ème} à 1/10^{ème} du diamètre moyen d'une bactérie. Les échantillons sont donc déshydratés avant de pouvoir les inclure dans une résine hydrophobe et ainsi, réaliser des coupes ultrafines à l'aide d'un ultramicrotome.

La figure 7 expose le protocole de traitement des prélèvements réalisé pour le MET. Les produits chimiques utilisés ont été obtenus chez Spi Supplies, Electron Microscopy Sciences et Agar Scientific. Les fragments de racine ont été progressivement déshydratés par immersion dans des bains successifs d'éthanol en concentrations croissantes. Les échantillons ont ensuite été imprégnés dans des bains successifs d'oxyde de propylène et de résine Epoxy (Epon 1001). Le solvant oxyde de propylène remplace l'éthanol, lequel est non miscible avec l'Epon. Enfin, l'échantillon a été inclus dans des moules en silicone dans l'Epon pur qui polymérise à 60°C. De 3 à 5 blocs de résine ont été préparés pour un même échantillon. Les coupes ultrafines ont été réalisées avec un ultramicrotome équipé d'un couteau diamant

Figure 8. Résultats des dénombrements de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et C7SM7 (SST3-) dans la rhizosphère de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 (Myc+/Nod+) et TRV25 (Myc-/Nod-) après 28 jours de culture en sable de Biot. Les résultats ont été exprimés en log UFC g⁻¹ de sable. Les lettres minuscules représentent les groupes homogènes (PLSD de Fisher, 5%).

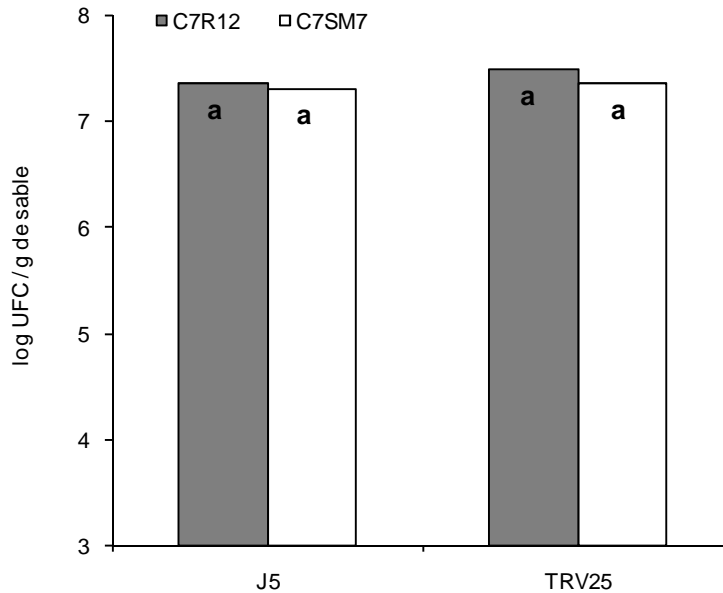
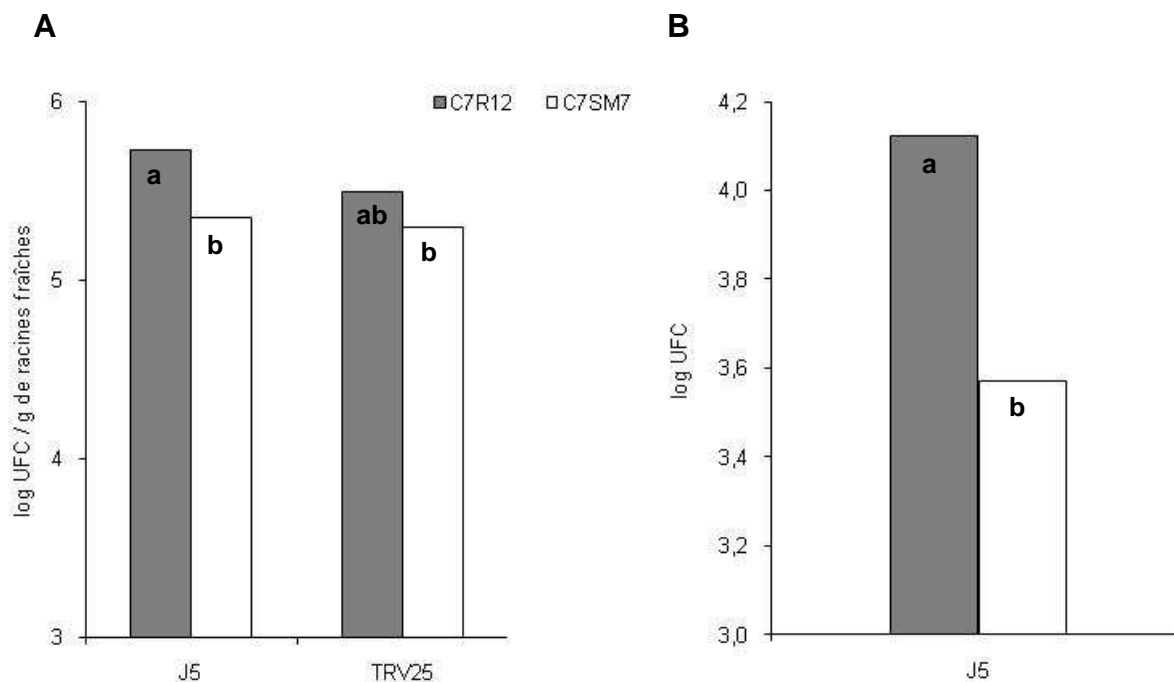


Figure 9. Résultats des dénombrements de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et C7SM7 (SST3-). Les bactéries ont été dénombrées dans le compartiment racines-rhizoplan de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 (Myc+/Nod+) et TRV25 (Myc-/Nod-) cultivés dans du sable de Biot (log UFC g⁻¹ de racines fraîches ; A). Les dénombrements ont également été effectués dans le compartiment racines (bactéries endophytes) de J5 (Myc+/Nod+) cultivé *in vitro* en eau gélosée (log UFC ; B). Les lettres minuscules représentent les groupes homogènes (PLSD de Fisher, 5%).



Diatome pour obtenir des coupes de 90 nm d'épaisseur. Les coupes ultrafines ont été effectuées 5 mm au-dessus de la zone d'élongation (Fig. 5C).

Afin de localiser rapidement les bactéries à la surface des racines, nous avons tout d'abord, effectué des observations en microscopie photonique classique.

Pour observer les coupes au MET, celles-ci ont été déposées sur une grille en cuivre (300 mesh) et ont été contrastées avec des solutions contenant les métaux lourds (uranium et plomb). Pour cela, les coupes ont été incubées 30 min à l'obscurité dans de l'acétate d'uranyle (2,5%) dans l'éthanol. Après un rinçage à l'eau ultrapure (résistivité $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), elles ont ensuite été incubées 10 min dans le tampon Reynolds contenant du citrate de plomb.

3. Résultats

3.1. Contribution du SST3 à la survie de C7R12 dans la rhizosphère et dans les racines

La comparaison de la survie de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et de son mutant C7SM7 (SST3-) réalisée en culture gnotobiotique dans du sable de Biot, a montré qu'il n'y avait pas de différence significative de survie entre ces deux souches dans la rhizosphère de *M. truncatula* J5 (Myc+/Nod+) après 28 jours de culture (Fig. 8). La même observation a été faite dans la rhizosphère du mutant *M. truncatula* TRV25 (Myc-/Nod-).

Après 28 jours de culture dans le sable de Biot, nous avons observé une meilleure adaptation de C7R12 dans le compartiment racines-rhizoplan de *M. truncatula* J5 alors que pour TRV25 aucune différence significative n'a été observée entre la survie de C7R12 et celle de C7SM7 (Fig. 9A).

Après 12 jours de culture de *M. truncatula* en eau gélosée une différence faible mais néanmoins significative a été observée entre *P. fluorescens* C7R12 et C7SM7. Le taux de survie de C7R12 dans les racines de *M. truncatula* est apparu supérieur à celui de son mutant (Fig. 9B).

3.2. Localisation des bactéries à la surface de la racine

Afin de comparer la localisation des bactéries à la surface des racines, nous avons tout d'abord effectué des observations en microscopie photonique classique. Des coupes ultrafines effectuées dans le sens longitudinal et dans le sens transversal, ont été observées (Fig. 10).

Figure 10. Localisation des bactéries en microscopie photonique 5 mm au-dessus de la zone d'élongation des racines, dans la zone pilifère. Une coupe longitudinale d'une racine de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 inoculé avec *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et une coupe transversale d'une racine de J5 inoculé avec C7SM7 (SST3-) sont présentées. Les flèches épaisses signalent la présence des bactéries.

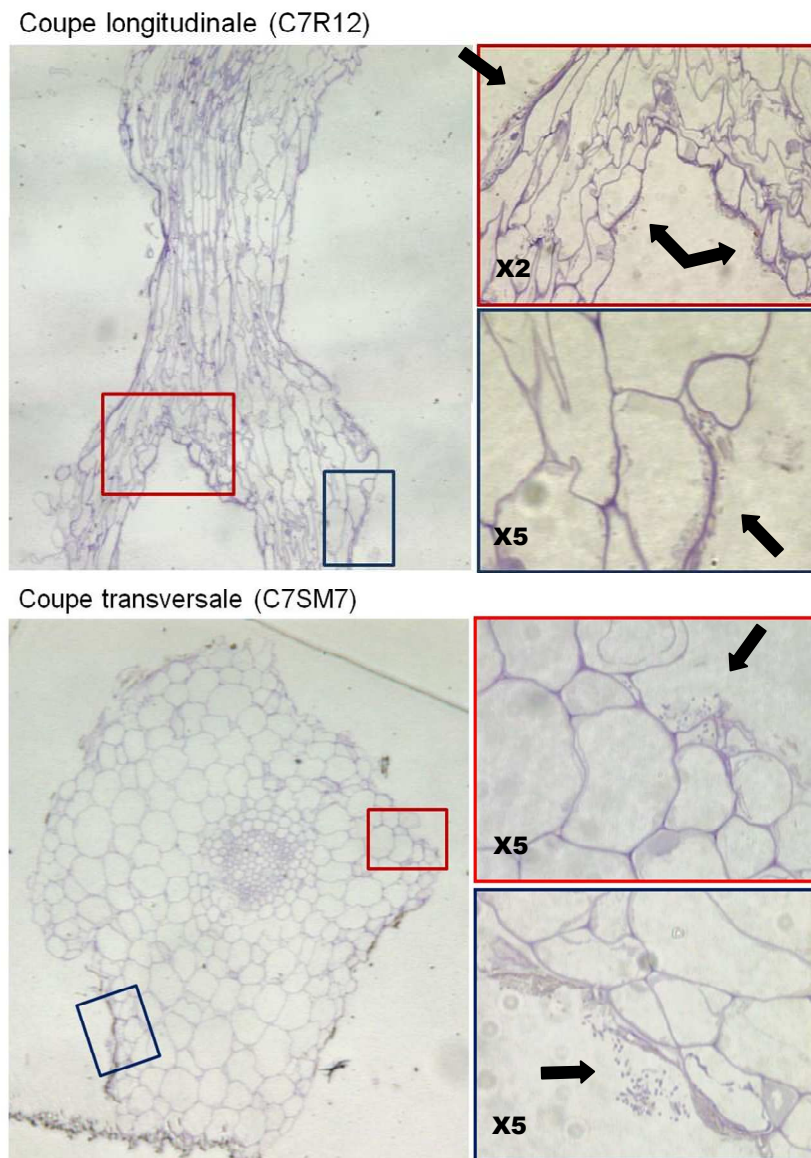


Figure 11. Observations en microscopie électronique à balayage (MEB). Les observations ont été effectuées au niveau de la zone d'élongation de la racine (1) et dans la zone pilifère (2). Les fragments de racine de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 des différents traitements ont été observés : traitement non inoculé (A), traitement inoculé avec *P. fluorescens* C7SM7 (SST3- ; B) et inoculé avec *P. fluorescens* C7R12 (SST3+ ; C). Les flèches blanches signalent la présence des bactéries.

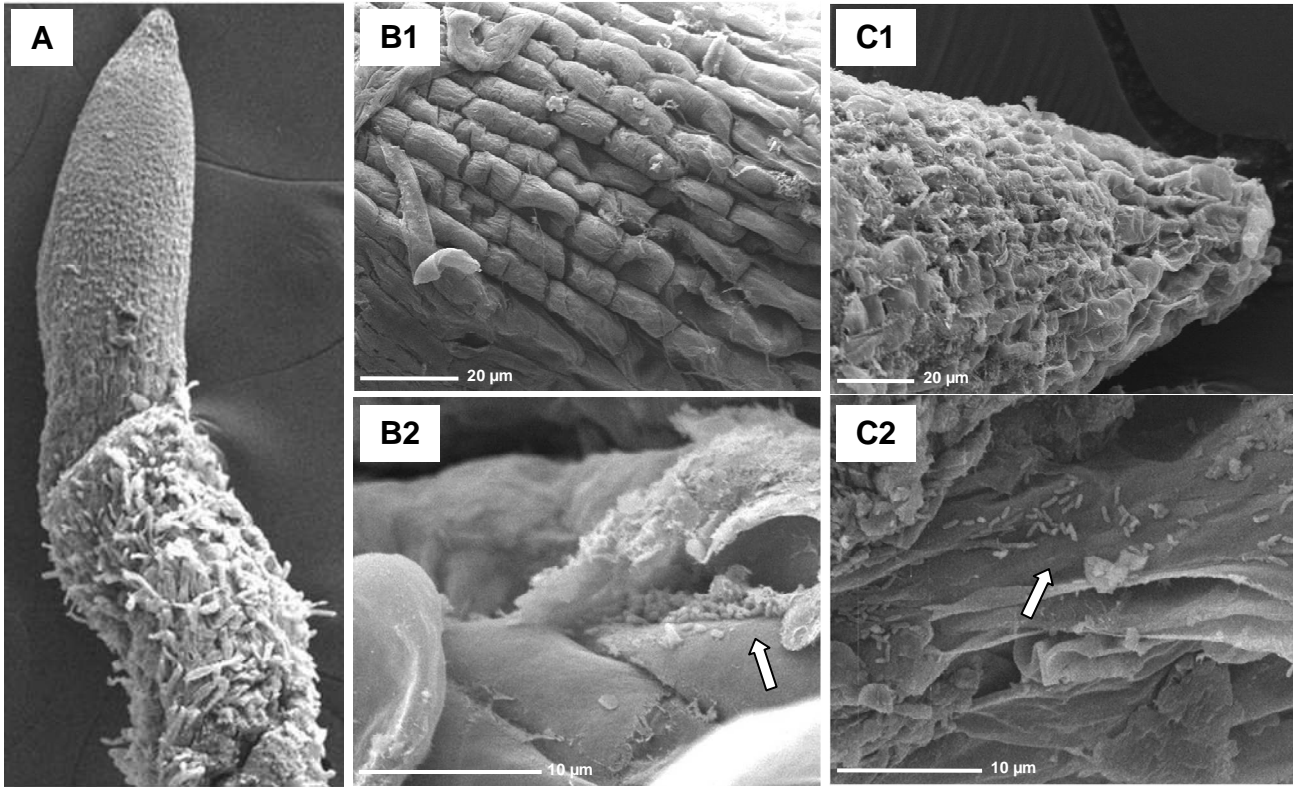
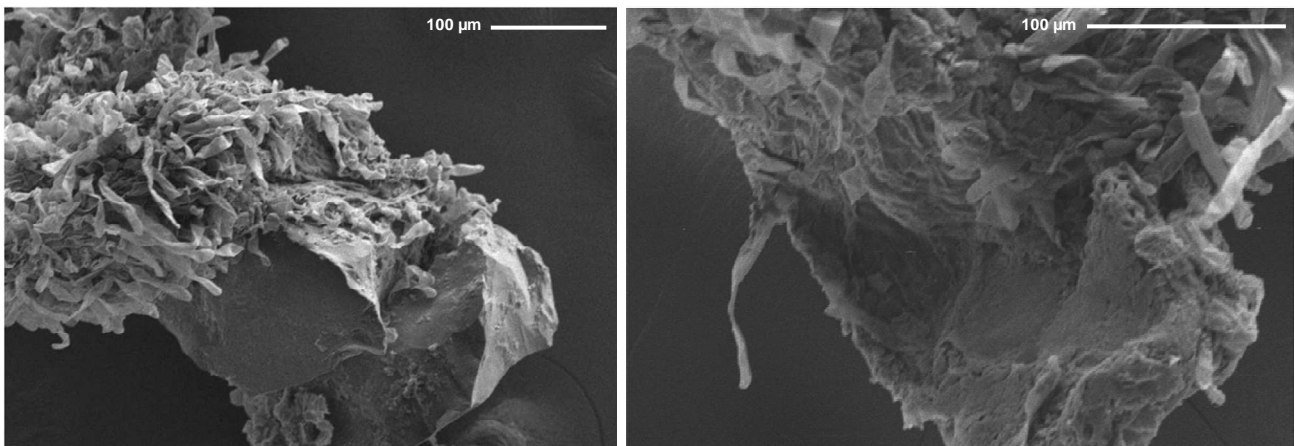


Figure 12. Observations en microscopie électronique à balayage (MEB). Visualisation des blessures engendrées à la surface des racines de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 par les grains de silice du sable de Biot.



Nous avons présenté ici une coupe longitudinale, au niveau de la zone pilifère de la racine de *M. truncatula* J5 inoculé avec *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et une coupe transversale de la racine de la plante inoculée avec le mutant C7SM7 (SST3-). Nous avons tout d'abord vérifié qu'aucune bactérie n'était détectée pour *M. truncatula* J5 non inoculé. Dans la zone pilifère, 5 mm au-dessus de la zone d'élongation, des bactéries ont été clairement visualisées que ce soit pour les racines de *M. truncatula* J5 inoculé avec C7R12 ou avec C7SM7, sans différence de colonisation entre les deux souches (Fig. 10).

En MEB, que ce soit C7R12 ou C7SM7, aucune bactérie n'a été observée au niveau de la zone d'élongation (Fig. 11B1 et C1). Par contre les bactéries ont clairement été détectées au niveau de la zone pilifère (Fig. 11B2 et C2) et ce, sans différence de colonisation apparentes entre les deux souches. Le MEB a permis également de visualiser de nombreuses "blessures" au niveau de la racine dues aux grains de silice du sable de Biot utilisé pour la culture gnotobiotique du bioessai en tubes (Fig. 12).

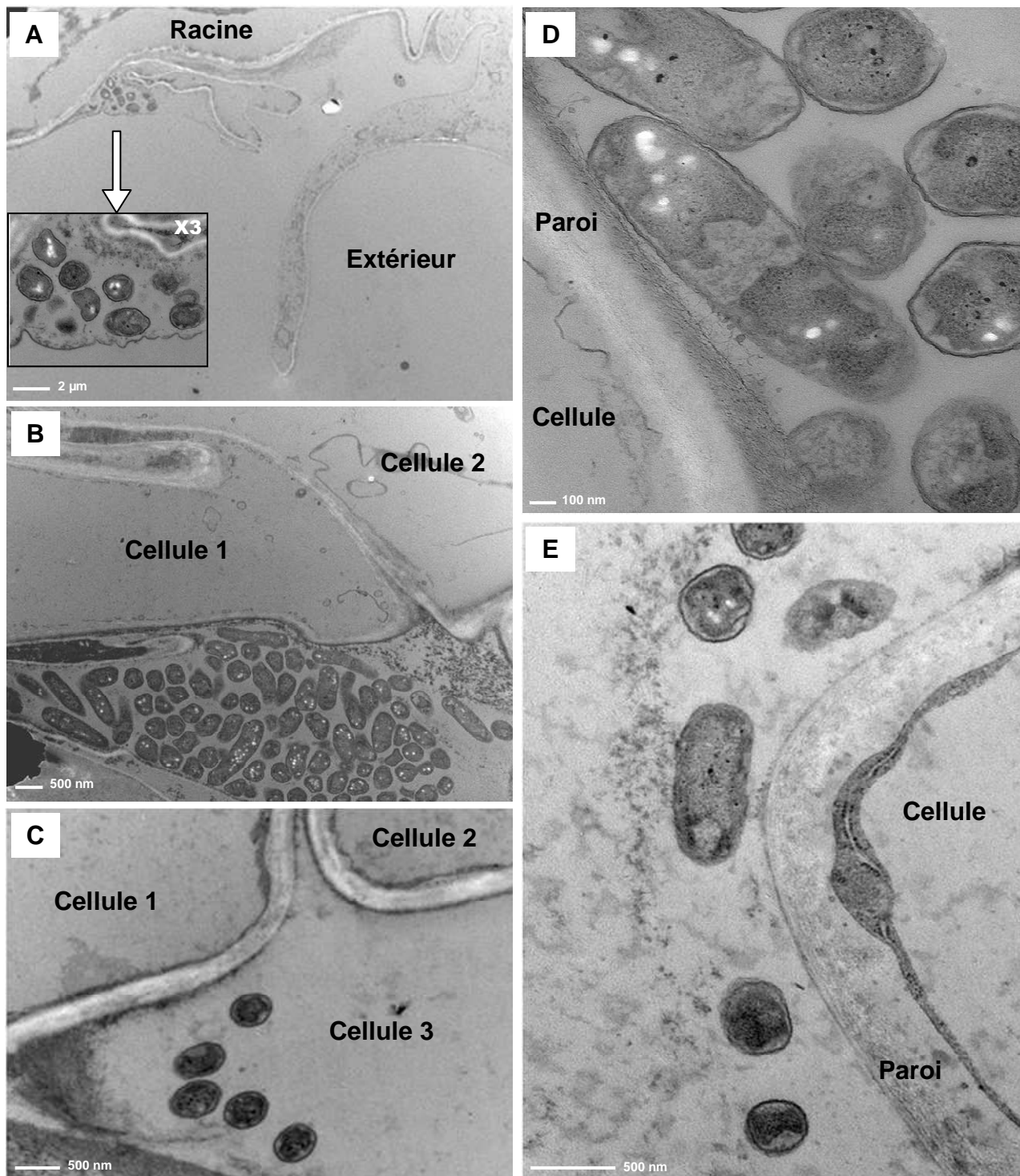
3.3. Localisation des bactéries dans les tissus de la racine

L'observation en MET des coupes ultrafines des fragments de racine de *M. truncatula* J5 inoculé avec *P. fluorescens* C7R12 a permis de détecter des agrégats de bactéries à la surface des racines (Fig. 13A) et dans l'apoplasme, entre les cellules de la racine (Fig. 13B). Les mêmes observations ont été effectuées pour son mutant C7SM7 (Fig. 14A). Pour C7R12 (Fig. 13C) comme pour C7SM7 (Fig. 14B et D), des cellules bactériennes ont été observées dans les cellules des racines de *M. truncatula* J5. Nous n'avons pas observé de différence évidente de colonisation entre C7R12 et C7SM7 que ce soit à la surface de la racine, dans l'apoplasme ou dans les cellules.

3.4. Colonisation de la racine par les bactéries

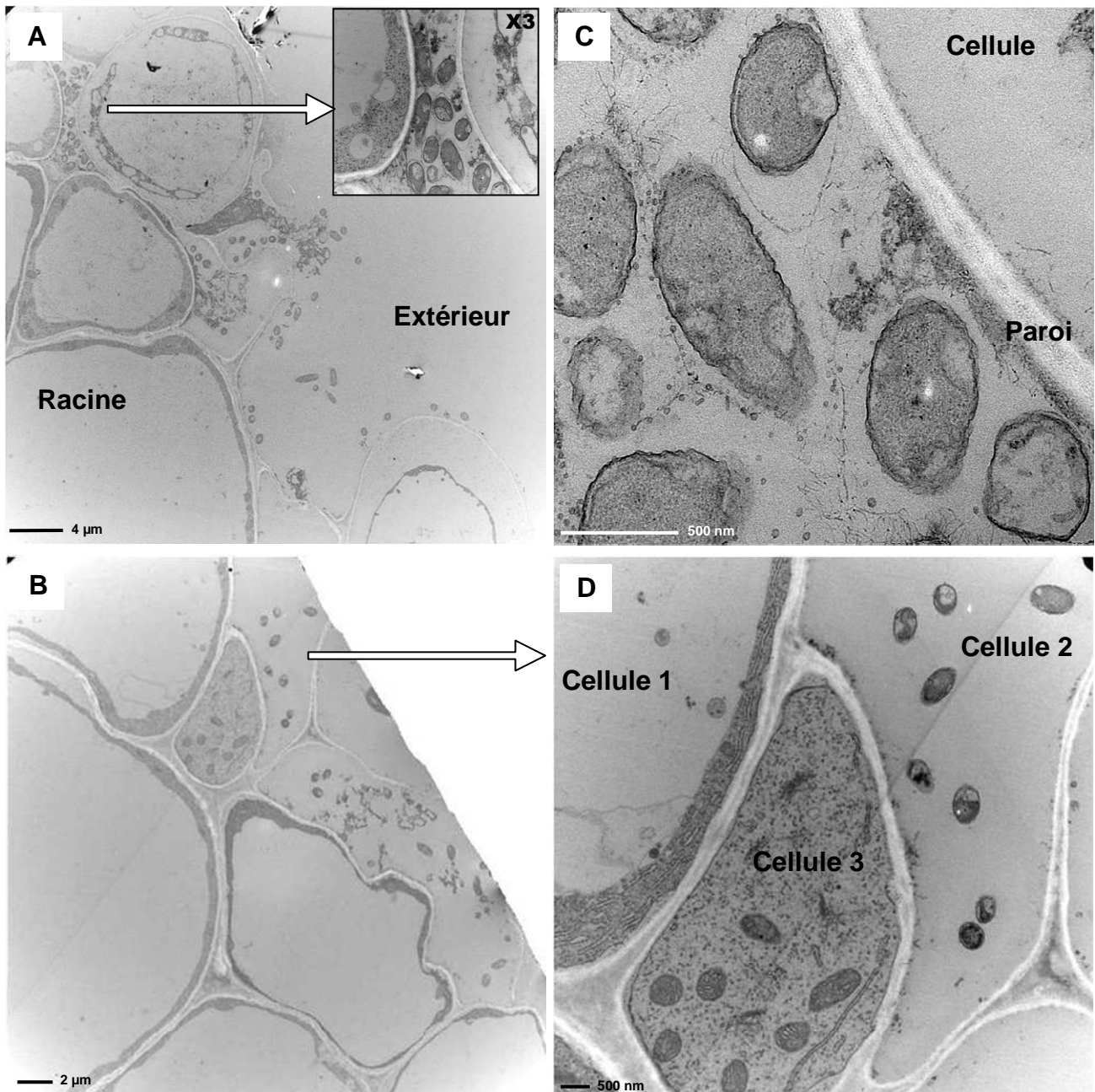
A la surface de la racine, dans la zone étudiée, les observations effectuées mettent en évidence la présence de matériel matriciel englobant les cellules bactériennes de *P. fluorescens* C7R12 et C7SM7, résultat présenté en exemple avec C7R12 (Fig. 13A). A plusieurs reprises, l'observation des coupes ultrafines de *M. truncatula* J5 inoculé avec C7R12, nous a permis d'observer un réseau de filaments et de vésicules au niveau de la zone

Figure 13. Observations en microscopie électronique à transmission (MET) de la colonisation des racines de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 par *P. fluorescens* C7R12 (SST3+). Les observations ont été effectuées à l'extérieur de la racine (A), dans l'apoplasme entre les cellules de la racine (B) et dans une cellule (cellule 3 ; C). Des grossissements ont été réalisés au niveau de zones de contact entre les cellules de la plante et C7R12 (D et E).



de contact entre les bactéries et les cellules de la plante (Fig. 13D et E). Les mêmes observations ont été effectuées pour les racines inoculées avec C7SM7 (Fig. 14C).

Figure 14. Observations en microscopie électronique à transmission (MET) de la colonisation des racines de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong J5 par *P. fluorescens* C7SM7 (SST3-). Les observations ont été effectuées à l'extérieur de la racine et dans l'apoplasme (A), dans une cellule (cellule 2 ; B et D) et au niveau d'une zone de contact entre une cellule de la plante et C7SM7 (C).



4. Discussion

Les résultats de cette étude ne mettent pas en évidence de différence de colonisation de la rhizosphère de *M. truncatula* J5 (Myc+/Nod+) et TRV25 (Myc-/Nod-) entre *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant C7SM7 dont le SST3 a été inactivé (SST3-). Ces résultats complètent et confirment ceux obtenus dans le sol non stérilisé de Montpellier (chapitre III), pour des stades de croissance végétale plus précoces et dans d'autres conditions expérimentales. L'ensemble de ces données indique que le SST3 de C7R12 ne semble pas avoir un rôle important dans la survie de la bactérie dans la rhizosphère.

En revanche, des différences entre C7R12 et C7SM7 ont été observées dans la colonisation des compartiments racines (bactéries endophytes) et racines-rhizoplan de *M. truncatula* J5. La différence observée entre C7R12 et C7SM7 est du même ordre de grandeur (0,5 log) dans les deux compartiments et dans les deux bioessais. Ces résultats mettent en évidence un rôle du SST3 dans la capacité de vie endophyte de C7R12 dans les racines de *M. truncatula* J5.

Les résultats obtenus dans le compartiment racines-rhizoplan sont en accord avec ceux de Sanchez et al. (2005). En effet, comme ces auteurs, nous avons observé une diminution de la colonisation par *P. fluorescens* C7R12 dans les racines de *M. truncatula* TRV25. L'atténuation de la différence observée dans la survie de C7R12 et C7SM7 pour le mutant TRV25 suggère que l'avantage conféré par le SST3 dans l'adaptation à la vie endophyte pourrait être *DMI3* dépendant

Sanchez et al. (2004) ont également montré que dans le compartiment racines-rhizoplan de *M. truncatula* J5, la majorité des *P. fluorescens* C7R12 se trouvait concentrée à la surface des racines et dans l'apoplasme. Seule une petite proportion des bactéries se trouvait à l'intérieur même des cellules. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la différence entre la survie de C7R12 et celle de C7SM7 dans le compartiment racines-rhizoplan de *M. truncatula* J5, pourrait être due à l'absence ou à une moins bonne représentation de C7SM7 à l'intérieur des cellules de la racine ; la faible proportion de cellules bactériennes concernées dans les cellules expliquant la faible différence, néanmoins significative, observée. Afin de confirmer cette hypothèse, des observations en microscopie ont été réalisées. Ces études

préliminaires nous ont permis de comparer la colonisation de la surface, de l'apoplasme et des cellules des racines de *M. truncatula* J5, par C7R12 et son mutant C7SM7.

Watt *et al.* (2006) ont montré, à la surface de l'apex de la racine, que les bactéries se trouvent majoritairement au niveau de la coiffe et au début de la zone pilifère et très peu de bactéries sont retrouvées au niveau de la zone d'élongation. Dans notre étude, 5 mm au-dessus de la zone d'élongation, au début de la zone pilifère, des bactéries ont été clairement visualisées que ce soit pour les racines de *M. truncatula* J5 inoculé avec C7R12 ou C7SM7. Par contre, que ce soit C7R12 ou C7SM7, aucune bactérie n'a été observée au niveau de la coiffe et de la zone d'élongation. Ce résultat est certainement la conséquence des différents traitements nécessaires à la préparation de nos fragments de racine. Seules les bactéries "protégées" par la présence des poils absorbants ne trouvent pas décrochées de la surface des racines, lors de la préparation des échantillons. Nous avons également observé de nombreuses blessures au niveau de la racine dues aux grains de silice du sable de Biot utilisé dans le bioessai utilisé et par la suite, il serait donc intéressant d'améliorer le bioessai de culture des plantes.

Sur la base des diverses observations microscopiques réalisées, les cellules bactériennes de C7R12 ont été localisées à la surface des racines de *M. truncatula* J5 et dans l'apoplasme entre les cellules de la racine. De plus, quelques bactéries ont été observées dans les cellules de la racine quand *M. truncatula* J5 a été inoculé avec C7R12. Nous avons effectué des observations identiques lorsque la plante a été inoculée avec le mutant C7SM7. Nous n'avons pas observé de différence de colonisation entre C7R12 et C7SM7 que ce soit à la surface de la racine, dans l'apoplasme ou dans les cellules. Collectivement, les observations microscopiques réalisées jusqu'à présent, ne nous ont pas permis de confirmer notre hypothèse. Cependant, nous n'avons observé la racine qu'au stade précoce du développement, au bas de la zone pilifère, à 5 mm au-dessus de la zone d'élongation. Chez les *Pseudomonas*, Duijff *et al.* (1997) ont observés que la colonisation des racines par les bactéries est plus importante au niveau des zones d'émergence des racines latérales. Il serait donc important de réaliser d'autres observations dans des zones de la racine plus éloignées de l'apex, aux niveaux des ramifications, correspondant à des zones de renouvellement de la racine et de stades plus tardifs de développement. De plus, afin de pouvoir mettre en évidence une différence de colonisation des racines entre C7R12 et son mutant C7SM7, il serait utile de réaliser des

études quantitatives en microscopie soit par la détermination d'un barème de notation équivalent à celui utilisé pour étudier les paramètres de mycorhization, soit en utilisant des marqueurs d'activité comme des marqueurs d'endocytose.

Au cours de cette étude, nous avons pu observer que les cellules bactériennes se trouvant à la surface de la racine, sont englobées dans une matrice extracellulaire. Ces images pourraient correspondre à des structures de type 'biofilm' déjà décrites dans la rhizosphère (Rudrappa *et al.*, 2008). Par ailleurs, au niveau de la zone de contact entre les bactéries et les cellules de la plante nous avons pu remarquer la présence de nombreuses vésicules ou organites. Cette surface d'échange potentiel entre les bactéries et les cellules végétales, semble être le lieu d'activités particuliers entre les deux partenaires. Il serait très intéressant d'approfondir ces études qui n'ont, à notre connaissance, pas d'équivalent dans la littérature pour les *Pseudomonas*.

Discussion générale et perspectives

Discussion générale

Dans le système de production de matières premières d'origine végétale, l'utilisation des microorganismes représente un potentiel important d'amélioration de la croissance et de la santé des plantes. L'optimisation des interactions plantes-microorganismes est nécessaire pour développer cette pratique plus respectueuse de l'environnement et moins consommatrice d'énergie que l'utilisation d'intrants de synthèse. Toutefois, ces interactions complexes entre organismes vivants doivent être mieux comprises pour être mieux gérées. L'objectif de ce travail de thèse a donc été de progresser dans la compréhension des interactions plantes-microorganismes bénéfiques en évaluant la contribution des SST3 dans ces associations.

Notre étude a porté sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents connus pour leur capacité à se développer dans la rhizosphère (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Latour *et al.*, 2009) et à améliorer la croissance et la santé des plantes (van Loon, 2007 ; Weller *et al.*, 2002). La présence de SST3 ou de séquences caractéristiques de SST3 chez des *Pseudomonas* fluorescents saprotrophes et chez des *Pseudomonas* fluorescents connus pour leurs effets bénéfiques sur la croissance et la santé des plantes, nous a conduits à nous interroger sur l'implication de ce système de sécrétion dans les interactions avec les plantes. Les conclusions d'une étude bibliographique soulignent le peu de connaissances concernant le fonctionnement et le rôle des SST3 chez ces bactéries (**chapitre I**). Dans ce contexte, nous avons donc cherché à savoir si les SST3 des *Pseudomonas* spp. fluorescents pourraient être impliqués dans les interactions bénéfiques avec les plantes et dans ce cas, de quelle façon ils peuvent intervenir. Dans ce but, nous avons suivi une démarche associant différentes stratégies expérimentales : une approche populationnelle et une approche basée sur l'étude de souches bactériennes modèles.

L'approche populationnelle présentée dans le **chapitre II**, nous a permis de montrer que dans la rhizosphère de *M. truncatula*, c'est aux mycorhizes et non aux racines seules que sont associés les *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3. Ces conclusions renforcent celles d'autres auteurs qui montrent ou suggèrent que le fonctionnement de SST3 de *Pseudomonas* non pathogènes est lié à la présence d'organismes fongiques, tels que l'oomycète pathogène *Pythium ultimum* et des champignons ectomycorhizogènes (Rezzonico

Tableau 1. Récapitulatif des effets différentiels induits par *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant C7SM7 (SST3-).

		C7R12	C7SM7	Chapitre	
Effets divers					
	Induction de la HR chez le tabac (hypersensitive reaction)	+ ^a	0	III	
	Production d'AIA (acide indole acétique)	+	+	III	
	Production de sidérophores	+	+	III	
Protection biologique de jeunes plantules					
	Protection du lin contre la fusariose vasculaire (<i>Fusarium oxysporum</i>)	+ ^b	+		
	Protection de <i>M. truncatula</i> contre la nécrose racinaire (<i>Pythium ultimum</i>)	+	+		
Croissance végétale de <i>Medicago truncatula</i> J5 et TRV25					
Biomasse de J5 (plante entière et partie racinaire)					
	Culture gnotobiotique <i>in vitro</i> en eau gélosée stérile	12 jours	0	0	
	Culture gnotobiotique <i>in vitro</i> en sable de Biot stérile	28 jours	0	0	
	Culture <i>in vivo</i> en sol naturel	28 jours	0	0	IV
		49 jours	+	+	III-IV
		63 jours	+	+	III-IV
		91 jours	+	-	III
Biomasse des gousses totales de J5					
	Culture <i>in vivo</i> en sol naturel	91 jours	+	0	
Biomasse de TRV25 (plante entière et partie racinaire)					
	Culture gnotobiotique <i>in vitro</i> en sable de Biot stérile	28 jours	0	0	
	Culture <i>in vivo</i> en sol naturel	91 jours	+	+	
Croissance des spores de <i>Glomus mosseae</i> BEG12					
	Germination <i>in vitro</i> des spores	+	+	III	
	Longueur <i>in vitro</i> des tubes germinatifs	+	+	III	
Paramètres de mycorhization de <i>Medicago truncatula</i> J5					
M% : intensité de la colonisation racinaire					
	Culture <i>in vivo</i> en sol naturel	28 jours	0	0	IV
		49 jours	+	0	III-IV
		63 jours	+	-	III-IV
		91 jours	+	-	III
A% : abondance des arbuscules de la racine					
	Culture <i>in vivo</i> en sol naturel	28 jours	0	0	IV
		49 jours	0	-	III-IV
		63 jours	+	-	III-IV
		91 jours	+	-	III
Paramètres de nodulation de <i>Medicago truncatula</i> J5 (rapportés à la biomasse des racines)					
Nombre et biomasse fraîche des nodosités totales					
	Culture <i>in vivo</i> en sol naturel	49 jours	0	0	(III)
		63 jours	0	0	(III)
		91 jours	0	0	(III)
Survie des bactéries dans la rhizosphère de <i>Medicago truncatula</i> J5 et TRV25					
	Culture gnotobiotique <i>in vitro</i> en sable de Biot stérile	28 jours	+	+	V
	Culture <i>in vivo</i> en sol naturel	28 jours	+	+	
		49 jours	+	+	(III)
		63 jours	+	+	(III)
		91 jours	+	+	(III)
Survie des bactéries dans le compartiment racines-rhizoplan de <i>Medicago truncatula</i> J5 et TRV25					
Compartiment racines-rhizoplan de J5					
	Culture gnotobiotique <i>in vitro</i> en en eau gélosée stérile	12 jours	++	+	V
	Culture gnotobiotique <i>in vitro</i> en sable de Biot stérile	28 jours	++	+	V
Compartiment racines-rhizoplan de TRV25					
	Culture gnotobiotique <i>in vitro</i> en sable de Biot stérile	28 jours	+	+/-	V

a, Mazurier *et al.* (2000). b, Lemanceau et Alabouvette (1991). +, induction d'un effet positif sur le paramètre étudié. -, induction d'un effet négatif. 0, aucun effet induit. En rouge, différence entre l'effet induit en réponse à C7R12 et C7SM7. Surligné en vert, données présentées dans cette thèse.

et al., 2005 ; Warmink *et al.*, 2008 ; Warmink et van Elsas, 2008). Dans notre étude, nous avons montré que l'association entre des bactéries SST3+ et des organismes fongiques pouvait être étendue aux CMA et que pour ces derniers, l'interaction symbiotique avec la plante devait être fonctionnelle pour que l'on observe une augmentation de la présence de ces bactéries dans le milieu.

Les résultats de cette étude populationnelle nous ont permis d'orienter notre travail de recherche. En effet, nous avons dans un premier temps, recherché des effets différentiels entre *P. fluorescens* C7R12 et son mutant SST3- sur les propriétés PGPR et antagonistes de C7R12 bénéfique pour la croissance et la santé de *M. truncatula*. Dans nos conditions expérimentales, ne permettant en particulier que des observations sur des jeunes plantules, nous n'avons pu mettre en évidence de différences d'effets entre les deux souches bactériennes. Ces résultats, non présentés dans ce manuscrit, ont été résumés dans le tableau 1. L'observation de l'association des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ avec les racines mycorhizées de *M. truncatula* nous a conduits à rechercher un effet différentiel entre la souche sauvage C7R12 et son mutant SST3- sur la symbiose mycorhizienne et donc, à rechercher l'implication éventuelle du SST3 de C7R12 dans son effet bénéfique MHB précédemment démontré en conditions gnotobiotiques par Pivato *et al.* (2009).

Ce sont les travaux, présentés dans le **chapitre III** de ce manuscrit, qui nous ont permis de montrer que la présence du SST3 de C7R12 jouait effectivement un rôle dans l'effet MHB de C7R12. De nombreux mécanismes bactériens sont décrits comme étant impliqués dans les effets de promotion de la mycorhization (Frey-Klett *et al.*, 2007). Nos résultats démontrent pour les endomycorhizes à arbuscules, l'existence additionnelle de mécanismes liés au fonctionnement des SST3. Warmink *et al.* (2008) et Warmink et van Elsas (2008) ayant mis en évidence une association préférentielle entre les bactéries SST3+ et les champignons ectomycorhizogènes, les SST3 pourraient donc également être liés à des effets promoteurs pour les champignons endomycorhizogènes.

Nos résultats nous ont permis de préciser que l'effet MHB de C7R12 était observé sur la promotion de la colonisation de la racine par les CMA et non sur la croissance saprophyte du champignon. Néanmoins, l'étude de la croissance saprophyte a été réalisée sur le champignon modèle *Glomus mosseae* BEG12. Or, l'étude de diversité des CMA présentée dans le

chapitre IV a montré que *G. mosseae* était très peu représenté dans les racines des plantes étudiées. Le même travail pourrait être repris avec une souche modèle de *G. intraradices*, l'espèce majoritairement représentée. L'effet bénéfique sur la mycorhization de *M. truncatula* s'est traduit par une amélioration de la croissance de la racine de la plante. L'amélioration de la mycorhization a également résulté dans la promotion de la biomasse fraîche des gousses totales de *M. truncatula* sans que le nombre des gousses et la biomasse de la partie aérienne de la plante ne varient (données non montrées dans ce manuscrit, Tab. 1). Nos résultats montrent donc que des bactéries peuvent être étroitement associées aux effets positifs de la mycorhization sur la croissance et la santé des plantes. En effet, il a été montré que la mycorhization pouvait procurer à la plante une résistance au stress hydrique (Abo-Ghalia et Khalafallah, 2008 ; Futai *et al.*, 2008 ; Subramanian *et al.*, 2006) se traduisant par une amélioration de la croissance de la plante et/ou une amélioration de la fécondité (Brundrett, 2004 ; Calvaruso *et al.*, 2010 ; Richardson *et al.*, 2009). On sait en effet, que des plantes possédant un système racinaire plus développé seront plus aptes à résister au manque d'eau. Les SST3 pourraient donc être associés à la mise en place de ces effets.

En mettant en évidence un effet de C7R12 sur la colonisation intraradiculaire des CMA, nous avons montré que le SST3 était effectivement impliqué dans une interaction directe avec la plante et que cette interaction avait des effets bénéfiques pour le végétal. Nous avons également montré que l'interaction entre *M. truncatula* et *P. fluorescens* C7R12 nécessite la présence d'un troisième partenaire, les CMA. Ces résultats, obtenus avec une souche bactérienne modèle (**chapitre III**), sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude populationnelle (**chapitre II**) qui a également montré que les racines seules n'étaient pas suffisantes pour induire l'augmentation de la fréquence de la population des *Pseudomonas* SST3+. La démonstration d'un effet quantitatif du SST3 sur la colonisation de la racine par les CMA, constitue donc la première preuve d'un effet direct positif sur la croissance et la santé des plantes. Rezzonico *et al.* (2005) avaient quant à eux, décrit un effet indirect *via* un mécanisme d'antagonisme à l'encontre d'un oomycète pathogène, *Pythium ultimum*.

Notre travail nous a donc permis d'atteindre notre premier objectif par la mise en évidence d'un rôle des SST3 de *P. fluorescens* C7R12 dans les interactions bénéfiques avec les plantes. Les interactions entre les microorganismes du sol et les plantes peuvent être caractérisées comme mutualistes symbiotiques ou non, commensaux, parasites et pathogènes

(Newton *et al.*, 2010). Il existe cependant peu d'exemples qui correspondent exactement à cette description et les microbes peuvent transiter d'un état à un autre. Il est maintenant généralement admis qu'il n'existe pas de frontière précise entre les organismes pathogènes et les mutualistes. La nature des interactions entre les bactéries et les eucaryotes est plutôt présentée comme un gradient allant de la symbiose et/ou mutualisme au parasitisme (Newton *et al.*, 2010 ; Paszkowski, 2006). En revanche, quelle que soit la nature de l'interaction, les bactéries pourraient utiliser des mécanismes communs de communication avec les eucaryotes, les SST3 faisant parties de ces systèmes de communication (Kambara *et al.*, 2009 ; Silver *et al.*, 2007). Notre travail contribue à soutenir ce type de représentation pour les *Pseudomonas* fluorescents. Par ailleurs, notre travail soutient également une proposition faite récemment sur l'existence d'interactions entre trois partenaires dans les symbioses entre les plantes et les champignons, comme par exemple pour les lichens (Grübe et Berg, 2009). Bonfante et Anca (2009), décrivent également les mycorhizes comme des relations tripartites entre les plantes, les champignons mycorrhizogènes et les bactéries.

Sur la base de nos résultats et des effets connus des SST3 des bactéries phytopathogènes sur les plantes, nous avons émis deux hypothèses concernant le mode d'action possible du SST3 de C7R12 sur la symbiose mycorhizienne. Selon une première hypothèse, la présence accrue de *Pseudomonas* possédant un SST3 à proximité des racines, dont nous avons montré, dans l'étude populationnelle (**chapitre III**), qu'ils appartiennent à des génotypes particuliers, pourrait avoir une influence qualitative sur les populations de symbiotes et plus spécifiquement sur la diversité des CMA. Une modification de la diversité des CMA pourrait avoir des conséquences sur la mise en place et/ou le développement de la mycorhization. En effet, dans les milieux naturels, il a été montré (i) que les plantes exercent une pression de sélection sur les communautés de CMA (Gollotte *et al.*, 2004 ; Sýkorová *et al.*, 2007), (ii) qu'une même plante peut être mycorhizée par différents champignons (Sýkorová *et al.*, 2007), (iii) que tous les CMA ne possèdent pas la même aptitude à la colonisation intraradiculaire (Massoumou *et al.*, 2007 ; Peng *et al.*, 2010) et (iv) que différents champignons peuvent avoir des effets différents sur la croissance et la santé des plantes (Taylor et Harrier, 2000 et 2001). La différence quantitative observée entre C7R12 et C7SM7 sur les paramètres de colonisation de la racine par les CMA, pourrait donc être la conséquence d'une différence qualitative dans la diversité et/ou la structure des communautés des CMA. Selon une deuxième hypothèse, l'intensification de la colonisation de la racine par les CMA pourrait résulter d'une

perturbation des mécanismes de défense de la plante, liée à la présence d'un SST3 chez *P. fluorescens* C7R12 et à la capacité de vie endophyte de la bactérie. En effet, pour réussir à coloniser les plantes, *P. syringae* et d'autres bactéries pathogènes de plantes utilisent leur SST3 pour détourner les défenses de l'hôte (Abramovitch et Martin, 2004 ; Jones et Dangl, 2006 ; Nomura *et al.*, 2005) et se développer à l'intérieur des racines aux dépens de son hôte (Alfano et Collmer, 2004 ; Hirano *et al.*, 1999).

Afin de tester la première hypothèse, nous avons comparé l'effet induit par l'inoculation de *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et de son mutant C7SM7 (SST3-) dans la rhizosphère de *M. truncatula* J5 mycorhizé sur la diversité et/ou la structure des communautés des microorganismes qui y sont naturellement présents. Les résultats de cette étude, présentés dans le **chapitre IV**, n'ont pas permis de mettre en évidence de différences majeures ni dans les populations de champignons mycorhizogènes, ni dans les populations des bactéries fixatrices d'azote. Un groupe dont la présence semble préférentiellement liée à l'inoculation de la souche sauvage a été identifié mais ne représente qu'un petit nombre de séquences étudiées (8%). Les données obtenues renforcent plutôt l'hypothèse selon laquelle l'effet promoteur de la mycorhization *via* le SST3 de C7R12 pourrait être lié à une intensification globale de la colonisation de la racine plutôt qu'à la sélection de champignons qui posséderaient de meilleures capacités de colonisation.

Nous avons abordé la deuxième hypothèse dans une étude exploratoire décrite dans le **chapitre V** de ce manuscrit. Cette hypothèse étant liée aux capacités de vie endophyte de la bactérie, la comparaison de la souche sauvage C7R12 (SST3+) et du mutant SST3- pour cette aptitude nous a paru constituer un préalable indispensable à ces recherches. Les différences observées entre les deux souches de *P. fluorescens* ont montré que si le fonctionnement du SST3 n'était pas indispensable à la vie endophyte, il a toutefois une influence sur le niveau de colonisation de la plante par la bactérie. La présence du SST3 améliore l'aptitude de C7R12 à la vie endophyte dans les racines de *M. truncatula* J5. La diminution de la colonisation endophyte par C7R12 des racines de *M. truncatula* TRV25 (mutant *DMI3*) est moins marquée que celle observée par Sanchez *et al.* (2005) à l'aide d'un autre type de bioessai. Néanmoins, l'atténuation de la différence observée dans la survie de C7R12 et C7SM7 pour le mutant TRV25 suggère que l'avantage conféré par le SST3 dans l'adaptation à la vie endophyte pourrait être *DMI3*-dépendant. Ce résultat est également compatible avec notre première

conclusion concernant la présence nécessaire des CMA dans l'interaction entre les plantes et les *Pseudomonas* SST3+ (**chapitre II et III**). Cependant, ces résultats ne nous ont indiqué que des tendances dans la mesure où ils reposent sur des dénombrements, méthodes d'évaluation relativement grossières au regard de la question scientifique posée. C'est pourquoi des études en microscopie ont été entreprises. Ce travail a été effectué afin de rechercher des images qui pourraient expliquer les différences observées par dénombrement entre les deux souches bactériennes. Les zones étudiées dans le cadre de ce travail n'ont pas permis d'observer de différences de colonisation des racines par *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et son mutant C7SM7 (SST3-). Cependant, nous n'avons observé la racine qu'au stade précoce du développement, dans le début de la zone pilifère, à 5 mm au-dessus de la zone d'élongation et des travaux d'exploration de zones seraient nécessaires.

Perspectives

Notre étude populationnelle a reposé sur l'étude d'une population de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolée du sol de Châteaurenard (**chapitre II**). Un travail récent nous a permis de confirmer l'association préférentielle des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ avec la mycorhizosphère de *M. truncatula* cultivé dans le sol de Mas d'Imbert (résultats non montrés), sol utilisé dans les études de mycorhization et choisi pour sa capacité à induire de très forts taux de mycorhization (**chapitre III**). Notre travail a reposé sur l'étude de *Pseudomonas* cultivables et l'analyse de l'ADN directement extrait du sol de la rhizosphère, par ailleurs disponible, pourrait permettre d'inclure l'étude des bactéries non cultivables. De plus, il serait intéressant de rechercher et décrire les *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ avec les racines mycorhizées, dans des sols présentant d'autres caractéristiques biotiques et abiotiques, ayant en particulier des capacités de mycorhization plus faibles. Il serait également intéressant d'étudier sur la mycorhization, les effets des *Pseudomonas* spp. fluorescents SST3+ préférentiellement associés aux racines mycorhizées, issus de ces différents sols. Cela pourrait permettre de renforcer l'hypothèse de co-évolution des plantes mycorhizées et des bactéries qui peuvent leur être favorables. D'autre part, ces travaux permettraient de déterminer si les *Pseudomonas* SST3+ peuvent être collectivement considérés comme un groupe fonctionnel favorable à la mycorhization, d'étudier les facteurs environnementaux qui influencent leur présence et leur développement et d'étudier les conséquences correspondantes

sur la croissance et la santé des plantes. D'un point de vue plus appliqué, ces travaux pourraient servir de base au développement de nouveaux bioindicateurs de la qualité des sols.

Par ailleurs, nos résultats ont montré qu'une hypothèse probable concernant le mode d'action des SST3 sur la mycorhization, serait la perturbation des mécanismes de défense de la plante liée à la capacité de vie endophyte de *P. fluorescens* C7R12 (**chapitre V**). L'étude en microscopie pour déterminer si le SST3 est impliqué dans la capacité de vie endophyte de C7R12, reste encore à approfondir afin de déterminer s'il y a une différence de colonisation des différents tissus de la racine entre C7R12 et C7SM7. Afin de poursuivre l'étude de cette hypothèse, d'autres méthodes pourraient être développées comme par exemple l'expression *in planta* des gènes de défense de plante en réponse à l'inoculation de C7R12 et de son mutant C7SM7 mais aussi, la production par la plante des hormones régissant la symbiose mycorhizienne. Notamment, lors de la phase de vie endophyte, le SST3 pourrait influencer sur la mycorhization *via* la modification de la production de molécules végétales impliquées dans le développement et le fonctionnement de l'endosymbiose. En effet, on sait d'une part, que les hormones végétales interviennent dans la mycorhization (Hause *et al.*, 2007 ; Herrera-Medina *et al.*, 2007), l'acide abscissique et les strigolactones étant connus plus particulièrement pour leur effet sur les arbuscules (Herrera-Medina *et al.*, 2007 ; Gomez-Roldan *et al.*, 2008). D'autre part, on sait que les interactions entre les plantes et les *Pseudomonas* phytopathogènes *via* le SST3 impliquent aussi différentes hormones végétales (Jones et Dangl, 2006) de même que les interactions entre les plantes et certaines PGPR (van Loon, 2007). Ces travaux devraient de plus, être complétés par des analyses faites en présence des CMA.

Références bibliographiques

A

Abajy, M.Y., Kopec, J., Schiwon, K., Burzynski, M., Döring, M., Bohn, C. et Grohmann, E. (2007). A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in Gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, **189**: 2487-2496.

Abo-Ghalia, H.H. et Khalafallah, A.A. (2008). Responses of wheat plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi to short-term water stress followed by recovery at three growth stages. *Journal of Applied Sciences Research*, **4**: 570-580.

Abramovitch, R.B. et Martin, G.B. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 356-364.

Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology, 4^{ème} édition. Academic Press, San Diego, Etats-Unis.

Aizawa, S.I. (2001). Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiology Letters*, **202**: 157-164.

Akeda, Y. et Galán, J.E. (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion *Nature*, **437**: 911-915.

Alaoui-El-Azher, M., Jia, J., Lian, W. et Jin, S. (2006). ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis through a Fas receptor/caspase 8-independent pathway in HeLa cells. *Cellular Microbiology*, **8**: 326-338.

Aldon, D., Brito, B., Boucher, C. et Genin, S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO Journal*, **19**: 2304-2314.

Alfano, J.R. et Collmer, A. (1997). Type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, **179**: 5655-5662.

Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K. et Collmer, A. (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**: 4856-4861.

Alfano, J.R. et Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, **42**: 385-414.

Altieri, M. (1986). Agro-écologie : bases scientifiques d'une agriculture alternative. Debard (Eds). Paris, France, 237 p.

Angkawidjaja, C. et Kanaya, S. (2006). Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**: 2804-2817.

Araki, H., Tian, D., Goss, E.M., Jakob, K., Halldorsdottir, S.S., Kreitman, M. et Bergelson, J. (2006). Presence/absence polymorphism for alternative pathogenicity islands in *Pseudomonas viridiflava*, a pathogen of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**: 5887-5892.

Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A. et Boucher, C.A. (1992). Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **5**: 187-193.

Arlat, M., van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernellet, J.C. et Boucher, C.A. (1994). PopAI, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO Journal*, **13**: 543-553.

Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H.W., Horn, M. et Rattei, T. (2009). Sequence based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathogens*, **5**: e1000376.

Artursson, V., Finlay, R.D. et Jansson, J.K. (2005). Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis high-lights differences in the active soil bacteria metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environmental Microbiology*, **7**: 1952-1966.

Artursson, V., Finlay, R.D. et Jansson, J.K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, **8**: 1-10.

B

Backert, S. et Meyer, T.F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, **9**: 207-217.

Badel, J.L., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Shimizu, R., Collmer, A. et He, S.Y. (2003). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Molecular Microbiology*, **49**: 1239-1251.

Bailly, X., Olivieri, I., de Mita, S., Cleyet-Marel, J.C. et Béna G. (2006). Recombination and selection shape the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing *Sinorhizobium* sp. associated to *Medicago*. *Molecular Ecology*, **15**: 2719-2734.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. et Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 233-66.

Barbieri, J.T. et Sun, J. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **152**: 79-92.

Barea, J.M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O'Gara, F. et Azcón-Aguilar, C. (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 2304-2307.

Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R. et Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1761-1778.

Baron, C. et Coombes, B. (2007). Targeting bacterial secretion systems: benefits of disarmament in the microcosm. *Infectious Disorders - Drug Targets*, **7**: 19-27.

- Bending, G.D. (2003).** The rhizosphere and its microorganisms. Dans "Encyclopaedia of applied plant sciences", Thomas, B., Murphy, D.J. et Murray, B.G. (Eds). Academic Press, Londres, Royaume-Uni, p. 1123–1129.
- Betts, H.J., Chaudhuri, R.R. et Pallen, M.J. (2004).** An analysis of type-III secretion gene clusters in *Chromobacterium violaceum*. *TRENDS in Microbiology*, **12**: 476-482.
- Bever, J.D. (2002).** Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society B*, **269**: 2595-2601.
- Bharadwaj, D.P., Lundquist, P.O., Persson, P. et Alström, S. (2008).** Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. *FEMS Microbiology Ecology*, **65**: 310-322.
- Bhattacharjee, R.B., Singh, A. et Mukhopadhyay, S.N. (2008).** Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**: 199-209.
- Biancotto, V., Minerdi, D., Perotto, S. et Bonfante, P. (1996).** Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma*, **193**: 123-131.
- Bingle, L.E.H., Bailey, C.M. et Pallen, M.J. (2008).** Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, **11**: 3-8.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q. et Alfano, J.R. (2008).** Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 396-403.
- Bloemberg, G.V. et Lugtenberg, B.J. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobia. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**: 343-350.
- Bogdanove, A.J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., Cornelis, G.R., Huang, H.C., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N.J. et van Gijsegem, F. (1996).** Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, **20**: 681-683.
- Bogdanove, A.J., Kim, J.F., Wei, Z., Kolchinsky, P., Charkowski, A.O., Conlin, A.K., Collmer, A. et Beer, S.V. (1998).** Homology and functional similarity of an *hrp*-linked pathogenicity locus, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the avirulence *avrE* of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**: 1325-1330.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C. et Barker, D.G. (2001).** *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**: 695-700.
- Bonfante, P. et Anca, I.A. (2009).** Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, **63**: 363-383.
- Börstler, B., Thiéry, O., Sýkorová, Z., Berner, A. et Redecker, D. (2010).** Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology*, **19**: 1497-1511.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. et Gardan, L. (2000).** Taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, **20**: 51-63.

Brencic, A. et Winans, S.C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**: 155-194.

Bretz, J., Losada, L., Lisboa, K. et Hutcheson, S.W. (2002). Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*, **45**: 397-409.

Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C. et Genin, S. (1999). *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, **31**: 237–251.

Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C. et Genin, S. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**: 109-119.

Broms, J.E., Forslund, A.L., Forsberg, A. et Francis, M.S. (2003). Dissection of homologous translocon operons reveals a distinct role for YopD in type III secretion by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology*, **49**: 2615-2626.

Brown, D.R. et Parker, C.D. (1987). Cloning of the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and in expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, **55**: 154-161.

Brundrett, M.C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, **154**: 275-304.

Brundrett, M.C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, **79**: 473-495.

Brundrett, M.C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*, **320**: 37-77.

Burns, D.L. (2003). Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **6**: 29-34.

Büttner, D. et Bonas, U. (2002). Port of entry - the type III secretion translocon. *TRENDS in Microbiology*, **10**: 186-192.

Büttner, D. et Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 312-319.

Büttner, D. et Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion system. *Current Opinion in Microbiology*, **9**: 193-200.

Büttner, D. et He, S.Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, **150**: 1656-1664.

C

Calvaruso, C., Turpault, M.P., Leclerc, E. et Frey-Klett, P. (2007). Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecology*, **54**: 567-577.

- Calvaruso, C., Turpault, M.P., Uroz, S., Leclerc, E., Kies A. et Frey-Klett, P. (2010).** *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant Soil*, **328**: 145-154.
- Cardon, Z.J. et Gage, D.J. (2006).** Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **37**: 459-488.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. et Dénarié, J. (2000).** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, **12**: 1647-1666.
- Cesaro, P., van Tuinen, D., Copetta, A., Chatagnier, O., Berta, G., Gianinazzi, S. et Lingua, G. (2008).** Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato farming area. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 5776-5783.
- Chapin, F.S. (1980).** The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**: 233-260.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J.R. et Chatterjee, A.K. (2003).** GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**: 1106-1117.
- Christie, P.J. (2001).** Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology*, **40**: 294-305.
- Cianciotto, N.P. (2005).** Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *TRENDS in Microbiology*, **13**: 581-588.
- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O., Perakis, S.S, Latty, E.F., von Fischer, J.C., Elseroad, A. et Wasson, M.F. (1999).** Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, **13**: 623-645.
- Collmer, A. (1998).** Determinants of pathogenic and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**: 329-335.
- Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. et Kim, D.S. (1995).** Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**: 4197-4201.
- Coombes, B.K. (2009).** Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non pathogenic bacteria. *Trends in Microbiology*, **17**: 89-94.
- Cornelis, G.R. (2000).** Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **355**: 681-693.
- Cornelis, G.R. et van Gijsegem, F. (2000).** Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology*, **54**: 735-774.
- Cornelis, G.R. (2002).** The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology*, **3**: 742-752.

Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Reviews - Microbiology*, **4**: 811-825.

Courty, P.E., Buée, M., Diedhiou, A.G., Frey-Klett, P., le Tacona, F., Rineau, F., Turpault, M.P., Uroza, S. et Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**: 679-698.

Cunnac, S., Boucher, C. et Genin, S. (2004). Characterization of the cisacting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, **186**: 2309-2318.

Curl, E.A. et Truelove, B. (1986). The rhizosphere. Springer-Verlag, New York, Etats-Unis, 288 p.

Curtis, T.P., Sloan, W.T. et Scannell, J.W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99**: 10494-10499.

D

d'Enfert, C., Ryter, A., Pugsley, A.P. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO Journal*, **6**: 3531-3538.

da Cunha, L., Sreerekha, M.V. et Mackey, D. (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**: 349-357.

Dale, C., et Moran, N.A. (2006). Molecular Interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, **126**: 453-465.

de Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C. et Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 795-811.

de Lyra, M.C.C.P., Ollero, F.J., Madinabeitia, N., Espuny, M.R., Bellogín, R.A., Cubo, M.T. et Ruiz-Sainz, J.E. (2000). Characterization of a *nolT* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103: its role in type III secretion protein. Dans "Fourth european nitrogen fixation conference, abstract book". Séville, Espagne, p 192.

Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1694**: 149-161.

Dénarié, J., Debelle, F. et Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Review of Microbiology*, **46**: 497-531.

Deng, Q., Zhang, Y. et Barbieri, J.T. (2007). Intracellular trafficking of *Pseudomonas* ExoS, a type III cytotoxin. *Traffic*, **8**: 1331-1345.

Deng, Q. et Barbieri, J.T. (2008). Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annual Review of Microbiology*, **62**: 271-288.

Deng, W.L., Preston, G., Collmer, A., Chang, C.J. et Huang, A.H.C. (1998). Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *Journal of Bacteriology*, **180**: 4523-4531.

Dennis, J.J. et Zylstra, G.J. (1998). Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 2710-2715.

Ding, Z., Atmakuri, K. et Christie, P.J. (2003). The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *TRENDS in Microbiology*, **11**: 527-535.

Dobrindt, U, Blum-Oehler, G, Hartsch, T, Gottschalk, G, Ron, EZ, Fünfstück, R, et Hacker, J (2001). S-fimbria-encoding determinant *sfaI* is located on pathogenicity island III536 of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, **69**: 4248-4256

Dubuis, C., Keel, C. et Haas, D. (2007). Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. Dans "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research", Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 311-328.

Duijff, B.J., Gianinazzi-Pearson, V. et Lemanceau, P. (1997). Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist*, **135**: 325-334.

Duponnois, R. et Garbaye, J. (1990). Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Canadian Journal of Botany*, **68**: 2148-2152.

E

Elhassan, G.A., Abdelgani, M.E., Osman, A.G., Mohamed, S.S. et Abdelgadir, B.S. (2010). Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan. *Journal of Nutrition*, **9**: 926-934.

Ellis, R.J., Timms-Wilson, T.M. et Bailey, M.J. (2000). Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environmental Microbiology*, **2**: 274-284.

Engel, J. et Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Current Opinion in Microbiology*, **12**: 61-66.

Enninga, J. et Rosenshine, I. (2009). Imaging the assembly, structure and activity of type III secretion systems. *Cellular Microbiology*, **11**: 1462-1470.

Eparvier, A., Lemanceau, P. et Alabouvette, C. (1991). Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiology Ecology*, **86**: 177-184.

F

Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V. et Attree, I. (2006). Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **45**: 8117-8123.

Faudry, E., Job, V., Dessen, A., Attree, I. et Forge, V. (2007). Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *FEBS Journal*, **274**: 3601-3610.

- Filloux, A. (2004).** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1694**: 163-179.
- Filloux, A., Hachani, A. and Bleves, S. (2008).** The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, **154**: 1570-1583.
- Finck-Barbancon, V., Yahr, T.L. et Frank, D.W. (1998).** Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *Journal of Bacteriology*, **180**: 6224-6231.
- Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., O'Callaghan, D. et Ramuz, M. (2002).** Systèmes de sécrétion des protéines de type IV et virulence bactérienne. *Medecine/Sciences*, **18**: 439-447.
- Foultier, B., Troisfontaines, P., Müller, S., Opperdoes, F.R. et Cornelis, G.R. (2002).** Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion system. *Journal of Molecular Evolution*, **55**: 37-51.
- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M.L., Lazarowitz, S.G., Lin, N.C., Martin, G.B., Rehm, A.H., Schneider, D.J., van Dijk, K., Tang, X. et Collmer A. (2002).** Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99**: 2275-2280.
- Francis, M.S., Wolf-Watz, H. et Forsberg, A. (2002).** Regulation of type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: 166-172.
- Franssen, H.J., Vijn, I., Yang, W.C. et Bisseling, T. (1992).** Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology*, **19**: 89-107.
- Frederick, R.D., Ahmad, M., Majerczak, D.R., Arroyo-Rodriguez, A.S., Manulis, S. et Coplin, D.L. (2001).** Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**: 1213-1222.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. et Perret, X. (1997).** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, **387**: 394-401.
- Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O. et Heulin, T. (1997).** Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied Environmental Microbiology*, **63**: 1852-1860.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausse, M.L., Courrier, S., Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.C. et Garbaye, J. (2005).** Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist*, **165**: 317-328.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. et Tarkka, M. (2007).** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, **176**: 22-36.
- Futai, K., Taniguchi, T. et Kataoka, R. (2008).** Ectomycorrhizae and their importance in forest ecosystems. Dans "Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry", Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S. et Futai, K. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 241-285.

G

- Galán, J.E. et Collmer, A. (1999).** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**: 1322-1328.
- Galán, J.E. et Wolf-Watz, H. (2006).** Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, **444**: 567-573.
- Gamalero, E., Martinotti, M.G., Trotta, A., Lemanceau, P. et Berta, G. (2002).** Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to the plant growth conditions. *New Phytologist*, **155**: 293-300.
- Garbaye, J. et Bowen, G.D. (1989).** Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, **112**: 383-388.
- Garbaye, J. (1994).** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley review, 76). *New Phytologist*, **128**: 197-210.
- Garbeva, P., van Elsas, J.D. et van Veen, J.A. (2008).** Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil*, **302**: 19-32.
- Gardes, M. et Bruns, T.D. (1993).** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology*, **2**: 113-118.
- Gassmann, W. (2005).** Natural variation in the *Arabidopsis* response to the avirulence gene hopPsyA uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**: 1054-1060.
- Geels, F.P., Schmidt, E.D.L. et Schippers, B. (1985).** The use of 8-hydroxyquinoline for the isolation and prequalification of plant growth-stimulating rhizosphere pseudomonads. *Biology Fertility Soils*, **1**: 167-173.
- Genin, S., Gough, C.L., Zischek, C. et Boucher, C.A. (1992).** Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology*, **6**: 3065-3076.
- Genin, S., Brito, B., Denny, T.P. et Boucher, C. (2005).** Control of the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Letters*, **579**: 2077-2081.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.N., van Tuinen, D., Redecker, D. et Wipf, D. (2010).** Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*.
- Gianinazzi-Pearson, V., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Weidmann, S. et Harrison, M.J. (2006).** Arbuscular Mycorrhiza. *Medicago truncatula* handbook, version 2006.
- Glickmann, E. et Dessaux, Y. (1995).** A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, **61**: 793-796.
- Goebel, W. et Hedgpeth, J. (1982).** Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **151**: 1290-1298.

- Gollotte, A., van Tuinen, D. et Atkinson, D. (2004).** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, **14**: 111-117.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C. et Rochange, S.F. (2008).** Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, **455**: 189-194.
- González, V., Santamaría, R.I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S.C., Ramírez, M.A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J. et Dávila, G. (2006).** The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**: 3834-3839.
- Gophna, U., Ron, E.Z. et Graur, D. (2003).** Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal transfer events. *Gene*, **312**: 151-163.
- Göttfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R. et Hennecke, H. (2001).** Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410 kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *Journal of Bacteriology*, **183**: 1405-1412.
- Greenberg, J.T. et Vinatzer, B.A. (2003).** Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology*, **6**: 20-28.
- Grimm, C., Aufsatz, W. et Panopoulos, N.J. (1995).** The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit. *Molecular Microbiology*, **15**: 155-165.
- Grübe, M. et Berg, G. (2009).** Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*, **23**: 72-85.
- Guo, M., Chancey, S.T., Tian, F., Ge, Z., Jamir, Y. et Alfano, J.R. (2005).** *Pseudomonas syringae* type III chaperones ShcO1, ShcS1, and ShcS2 facilitate translocation of their cognate effectors and can substitute for each other in the secretion of HopO1-1. *Journal of Bacteriology*, **187**: 4257-4269.
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G. et Greenberg, J.T. (2002).** A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science*, **295**: 1722-1726.

H

- Haas D. et Défago G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 307-319.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhlendorfer, I. et Tschape, H. (1997).** Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* **23**: 1089-1097.
- Hacker, J. et Kaper, J. (2000).** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, **54**: 641-679.
- Halle, F. (2008).** Des plantes anciennes à la botanique du XXI^{ème} siècle. Dans "Aux origines des plantes", vol. 1, Fayard (Eds). France.

- Ham, J.H., Kim, M.G., Lee, S.Y. et Mackey, D. (2007).** Layered basal defenses underlie non-host resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Plant Journal*, **51**: 604-616.
- Harrison, M.J. (2005).** Signalling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, **59**: 19-42.
- Hartnett, D.C. et Wilson, G.W.T. (2002).** The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and Soil*, **244**: 319-331.
- Hassouna, N., Mithot, B. et Bachellerie, J.P. (1984).** The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, **12**: 3563-3583.
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkoy, S. et Strack, D. (2007).** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*, **68**: 101-110.
- Hayward, R.D., Cain, R.J., McGhie, E.J., Phillips, N., Garner, M.J. et Koronakis, V. (2005).** Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Molecular Microbiology*, **56**: 590-603.
- He, S.J., Yuang, H.C. et Collmer, A. (1993).** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{pss}: a protein that is secreted via the *hrp* pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**: 1255-1266.
- He, S.Y. (1998).** Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**: 363-392.
- He, S.Y. et Jin, Q. (2003).** The Hrp pilus: learning from flagella. *Current Opinion in Microbiology*, **6**: 15-19.
- He, S.Y., Nomura, K. et Whittam, T.S. (2004).** Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1694**: 181-206.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. et Ala'Aldeen, D. (2004).** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**: 692-744.
- Herrera-Medina, M.J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo Bote, J.A. et Garcia Garrido, J.M. (2007).** Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, **175**: 554-64.
- Hiltner, L. (1904).** Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arbeits und Deutsche Landwirtschaft Gesellschaft*, **98**: 59-78.
- Hirano, S.S., Charkowski, A.O., Collmer, A., Willis, D.K. et Upper, C.D. (1999).** Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on host plants in the field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**: 851-9856.
- Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B. et Yoder, J.I. (2003).** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, **84**: 858-868.

- Höfte, M. et de Vos, P. (2006).** Plant pathogenic *Pseudomonas* species. Dans "Plant-associated bacteria", part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 507-533.
- Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. et Read, D.J. (2001).** Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*, **411**: 789-792.
- Hogenhout, S.A., van der Hoorn, R.A.L., Terauchi, R. et Kamoun, S. (2009).** Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**: 115-122.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. et Bohannan, B.J.M. (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, **6**: 613-622.
- Horton, T.R. et Bruns, T.D. (2001).** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, **10**: 1855-1871.
- Hsiao, W.W., Ung, K., Aeschliman, D., Bryan, J., Finlay, B.B. et Brinkman, F.S. (2005).** Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands. *PLoS Genetics*, **1**: e62.
- Huang, H.C., He, S.Y., Bauer, D.W. et Collmer, A. (1992).** The *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpH* product, an envelope protein required for elicitation of the hypersensitive response in plants. *Journal of Bacteriology*, **174**: 6878-6885.
- Hueck, C.J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**: 379-433.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S. et Pak, K. (2001).** Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *Journal of Bacteriology*, **183**: 5589-5598.
- Huynh, T.V., Dahlbeck, D. et Staskawicz, B.J. (1989).** Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science*, **245**: 1374-1377.

I-J

- Jackson, R.W., Preston, G.M. et Rainey, P.B. (2005).** Genetic characterization of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 *rsp* gene expression in the phytosphere and *in vitro*. *Journal of Bacteriology*, **187**: 8477-8488.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. et Antoine, R. (2001).** Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Molecular Microbiology*, **40**: 306-313.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K. et Robson, A.D. (1992).** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum*, I: spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist*, **120**: 371-380.
- Jia, J., Wang, Y., Zhou, L. et Jin, S. (2006).** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in host cells. *Infection and Immunity*, **74**: 6557-6570.

Job, V., Mattei, P.J., Lemaire, D., Attree, I. et Dessen, A. (2010). Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins. *Journal of Biological Chemistry*, sous presse.

Johansson, J.F., Paul, L.R. et Finlay, R.D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**: 1-13.

Jones, D.L., Hodge, A. et Kuzyakov, Y. (2004). Plant mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, **163**: 459-480.

Jones, J.D.G. et Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**: 323-329.

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W. et Crook, D.W. (2009). Genomic islands: toolsof bacterial horizontal gene transferand evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**: 376-393.

K

Kabisch, U., Landgraf, A., Krause, J., Bonas, U. et Boch, J. (2005). Type III secretion chaperones ShcS1 and ShcO1 from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 bind more than one effector. *Microbiology*, **151**: 269-280.

Kambara, K., Ardisson, S., Kobayashi, H., Saad, M.M., Schumpp, O., Broughton, W.J. et Deakin, W.J. (2009). Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Molecular Microbiology*, **71**: 92-106.

Kamdar, H.V., Kamoun, S. et Kado, C.I. (1993). Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. *Journal of Bacteriology*, **175**: 2017-2025.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Manabu, M. et Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research*, **7**: 331-338.

Katzen, F., Becker, A., Ielmini, V., Oddo, C.G. et Ielpi, L. (1999). New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative Bacteria and their use in mapping of the 3' end of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris gum* operon. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 278-282.

Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*, **24**: 447-463.

Kent, A.D. et Triplett, E.W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil land rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, **56**: 211-236.

Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Devos, P., Gillis, M. et Schleifer, K.H. (1996). Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**: 465-477.

- Kim, J.F. (2001).** Revisiting the chlamydial type III protein secretion system: clues to the origin of type III protein secretion. *Trends in Genetics*, **17**: 65-69.
- Kim, M.G., Geng, X., Lee, S.Y. et Mackey, D. (2009).** The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpm1 induces significant defenses by activating the *Arabidopsis* nucleotide-binding leucine-rich repeat protein RPS2. *Plant Journal*, **57**: 645-653.
- Kimura, M. (1980).** A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.
- King, E.O., Ward, M.K. et Raney, D.E. (1954).** Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **44**: 301-307.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z. et Dangl, J.L. (2000).** Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology*, **3**: 73-78.
- Klement, Z. (1963).** Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*, **199**: 299-300.
- Klement, Z. (1982).** Hypersensitivity. Dans "Phytopathogenic prokaryotes", vol. 2, Mount, M.S. et Lacy, G.H. (Eds). Academic Press, Inc., New York, Etats-unis, p. 149-177.
- Kloepper, J.W. et Schroth, M.N. (1978).** Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Dans "Proceedings of the fifth international conference on plant pathogenic bacteria", vol. 2. INRA, Angers, France, p 879-882.
- Kowalchuk, G.A. et Stephen, J.R. (2001).** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 485-529.
- Kowalchuk, G.A., Buma, D.S., de Boer, W., Klinkhamer, P.G.L. et van Veen, J.A. (2002).** Effects of above-ground species composition and diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 509-520.
- Kowalchuk, G.A., Yergeau, E., Leveau, J.H.J., Sessitsch, A. et Bailey M. (2010).** Plant-associated microbial communities. Dans "Environmental molecular microbiology", Liu, W-T. et Jansson, J.K. (Eds). Caister Academic Press, Norfolk, Royaume-Uni, p 131-148.
- Krause, A., Doerfel, A. et Göttfert, M. (2002).** Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**: 1228-1235.
- Krishnan, H.B., Lorio, J., Kim, W.S., Jiang, G., Kim, K.Y., de Boer, M. et Pueppke, S.G. (2003).** Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**: 617-625.

L

- Lan, L., Deng, X., Zhou, J. et Tang, X. (2006).** Genome-wide gene expression analysis of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals overlapping and distinct pathways regulated by *hrpL* and *hrpRS*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**: 976-987.

- Latour, X., Delorme, S., Mirleau, P. et Lemanceau, P. (2009).** Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. Dans "Sustainable agriculture", part. 3, Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, D., Souchère, V. et Alberola, C. (Eds). Springer, Pays-Bas, p. 285-296.
- Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. et Read, D.J. (2004).** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, **82**: 1016-1045.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakakii, A.P., Panopoulo, N.J., Nöller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, J.W. et Nürnberger, T. (2001).** HrpZPspH from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **98**: 289-294.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C. et Couteaudier, Y. (1988).** Recherches sur la résistance des sols aux maladies, XIV : modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, **8**: 155-162.
- Lemanceau, P. et Alabouvette, C. (1991).** Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection*, **10**: 279-286.
- Lemanceau, P. (1992).** Beneficial effects of rhizobacteria on plants : exemple of fluorescent *Pseudomonas* spp.. *Agronomie*, **12**: 413-437.
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J-M. et Alabouvette, C. (1995).** Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 1004-1012.
- Lemanceau, P. et Heulin, T. (1998).** La rhizosphère. Dans "Sol : interface fragile", Stengel, P. et Gelin, S. (Eds). INRA, Paris, France, p. 93-106.
- Lemanceau, P., Samson, R. et Alabouvette, C. (1998).** Recherche sur la résistance des sols aux maladies, XV : comparaison des populations de *Pseudomonas* fluorescents dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, **8**: 243-249.
- Lemanceau, P., Offre, P., Mougel, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. et Berta, G. (2006).** Microbial ecology of the rhizosphere. Dans "Microbiological methods for assessing soil quality", Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (Eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, p. 228-230.
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M. et Briat, J.F. (2009).** Role of iron in plant-microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, **51**: 491-549.
- Lewis, J.D., Guttman, D.S et Desveaux, D. (2009).** The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **20**: 1055-1063.
- Lin, Y.C., Hsu, S.T. et Huang, H.C. (2006).** Evidence for the interaction between HrpT and HrcC of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61. *Plant Pathology Bulletin*, **15**: 171-185.
- Linderman, R.G. (1997).** Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. Dans "The Mycota", Carroll, G.C. et Tudzynski, P. (Eds). Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, p. 117-128.

Lindgren, P.B., Peet, R.C. et Panopoulos, N.J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of beans plants and hypersensitivity on non host plants. *Journal of Bacteriology*, **168**: 512-522.

Losada, L.C. et Hutcheson, S.W. (2005). Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon associated degradation. *Molecular Microbiology*, **55**: 941-953.

Lynch, J.M. (1987). The rhizosphere. Chichester: Wiley Interscience.

M

Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C. et Arlat, M. (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells. *Molecular Microbiology*, **27**: 437-453.

Marschner, P., Crowley, D.E. et Lieberei, R. (2001). Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16SrRNA gene community composition in the rhizosphere of maize. *Mycorrhiza*, **11**: 297-302.

Massoumou, M., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Arnould, C., Brechenmacher, L., Sanchez, L., Selim, S., Gianinazzi, S. et Gianinazzi-Pearson, V. (2007). *Medicago truncatula* gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota. *Mycorrhiza*, **17**: 223-234.

Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching mobility. *Annual Review of Microbiology*, **56**: 289-314.

Mazurier, S., Delorme, S., Siblot, S. et Lemanceau, P. (2000). Presence of DNA sequences characteristic of type III secretion systems in biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain C7. Dans "Proceedings of the 5th International PGPR Workshop". Cordoba, Argentine, p. 77.

Mazurier, S., Lemunier, M., Siblot, S., Mougel, C. et Lemanceau, P. (2004). Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**: 455-467.

Mazurier, S., Lemunier, M., Hartmann, H., Siblot, S., et Lemanceau, P. (2006). Conservation of type III secretion system genes in *Bradyrhizobium* isolated from soybean. *FEMS Microbiology Ecology*, **259**: 317-325.

Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P. et Raaijmakers, J.M. (2009). Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *ISME Journal*, **3**: 977-991.

Meinhardt, L.W., Krishnan, H.B., Balatti, P.A. et Pueppke, S.G. (1993). Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular Microbiology*, **9**: 17-29.

Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M. et Cornelis, G. (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infection and Immunity*, **58**: 2840-2849.

Migula, W. (1894). Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe*, **1**: 235-238.

- Mirleau, P., Philippot, L., Corberand, T. et Lemanceau, P. (2001).** Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in the competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 in soil conditions. *Applied Environmental Microbiology*, **67**: 2627-2635.
- Morandi, D., Prado, E., Sagan, M. et Duc, G. (2005).** Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza*, **15**: 283-289.
- Morel, C., Plenchette, C. et Fardeau, J.C. (1992).** La fertilisation phosphatée raisonnée de la culture du blé. *Agronomie*, **12**: 565-579.
- Morgan, J.A.W., Bending, G. D. et White, P. J. (2005).** Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1729-1739.
- Morton, J.B. et Bentivenga, S.P. (1994).** Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. *Plant and Soil*, **159**: 47-59.
- Mota, L.J., Sorg, I. et Cornelis, G.R. (2005).** Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiology Letters*, **252**: 1-10.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C. et Lemanceau, P. (2006).** Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different development stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist*, **170**: 165-175.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordonez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A. et Mekalanos, J.J. (2006).** A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, **312**: 1526-1530.
- Mudgett, M.B. (2005).** New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **56**: 509-31.
- Mulya, K., Teraoka, T., Hosokawa, D. et Watanabe, M. (1992).** On the disease control mechanism of bacterial wilt of tomato by the use of antagonistic *Pseudomonas fluorescens*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **59**: 103-104.
- Mulya, K., Takikawa, Y. et Tsuyumu, S. (1996).** The presence of regions homologous to *hrp* cluster in *Pseudomonas fluorescens* PfG32R. *Phytopathological Society of Japan*, **62**: 355-359.

N

- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. et Valeri, F. (2008).** Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. Dans "Soil biology: molecular mechanisms of plant and microbe coexistence", vol. 15, Nautiyal, C.S. et Dion, P. (Eds). Springer, Berlin Heidelberg, Allemagne, p. 339-365.
- Naumann, M., Schüßler, A. et Bonfante, P. (2010).** The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the *Mollicutes*. *ISME Journal*, **4**: 862-871.

Nazir, R., Warmink, J.A., Boersma, H. et van Elsas, J.D. (2010). Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology*, **71**: 169-185.

Newton, A.C., Fitt, B.D.L., Atkins, S.D., Walters, D.R. et Daniell, T.J. (2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*, **18**: 365-373.

Neyt, C. et Cornelis, G.R. (1999). Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Molecular Microbiology*, **31**: 143-156.

Nguyen, C. (2009). Rhizodeposition of organic C by plant: mechanisms and controls. Dans "Sustainable Agriculture", Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchère, V. et Alberola, C. (Eds). Springer, Pays-Bas, p. 375-396.

Nguyen, L., Paulsen, I.T., Tchieu, J., Hueck, C.J., et Saier, M.H., Jr. (2000). Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **2**: 125-144.

Nicholas, K.B. et Nicholas, H.B. (1997). GENEDOC a tool for editing and annoting multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.

Nissan, G., Manulis, S., Weinthal, D.M., Sessa, G. et Barash, I. (2005). Analysis of promoters recognized by HrpL, an alternative sigma-factor protein from *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**: 634-643.

Nomura, K., Melotto, M. et He, S.Y. (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**: 361-368.

Normand, P., Ponsonnet, C., Nesme, X., Neyra, M. et Simonet, P. (1996). ITS analysis of prokaryotes. Dans "Molecular microbial ecology manual", Akkermans, D.L., van Elsas, J.D. et de Bruijn E.I. (Eds). Kluwer Academic, Amsterdam, Pays-Bas, p. 1-12.

O

O'Connor, P.J., Smith, S.E. et Smith, F.A. (2002). Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community structure in a semiarid herbland. *New Phytologist*, **154**: 209-218.

Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P. et Mougél, C. (2007). Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 913-921.

Offre, P., Pivato, B., Mazurier, S., Siblot, S., Berta, G., Lemanceau, P. et Mougél, C. (2008). Microdiversity of *Burkholderiales* associated with mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiology Ecology*, **65**: 180-192.

Ogiso, H., Teraoka, T., Hosokawa, D. et Watanabe, M. (1991). Studies on the biological control of bacterial wilt disease of tomato by *pseudomonas fluorescens*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **58**: 104.

Oldroyd, G.E.D., Harrison, M.J. et Paszkowski, U. (2009). Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science*, **324**: 753-754.

P

- Page, A.L. et Parsot, C. (2002).** Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Molecular Microbiology*, **46**: 1-11.
- Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R. et Henderson, I.R. (2003).** Genomic analysis of secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, **6**: 519-527.
- Pallen, M.J., Beatson, S.A. et Bailey, C.M. (2005).** Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 201-229.
- Palleroni, N.J. et Moore, E.R.B. (2004).** Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. Dans "*Pseudomonas*", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, p. 3-44.
- Palleroni, N.J. (2005).** Genus I *Pseudomonas*. Dans "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The proteobacteria", 2^{ème} édition, vol. 2, part. B, Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. et Garrity, G.M. (Eds). Springer, New-York, Etats-Unis, p. 323-379.
- Palleroni, N.J. (2009).** The genus *Pseudomonas*. Dans "Practical handbook of microbiology", 2^{ème} édition, Goldman, E. et Green, L.H. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Etats-Unis, p. 231-242.
- Parker, M.A., Malek, W. et Parker, I.M. (2006).** Growth of an invasive legume is symbiont limited in newly occupied habitats. *Diversity and Distributions*, **12**: 563-571.
- Parsot, C., Hamiaux, C. et Page, A.L. (2003).** The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, **6**: 7-14.
- Paszkowski, U. (2006).** Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**: 364-370.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P. et Saier, M.H., Jr. (2003).** Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, **149**: 3051-3072.
- Peng, J., Li, Y., Shi, P., Chen, X., Lin, H. et Zhao, B. (2010).** The differential behavior of arbuscular mycorrhizal fungi in interaction with *Astragalus sinicus* L. under salt stress. *Mycorrhiza*.
- Perret, X., Staehelin, C. et Broughton, W.J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**: 180-201.
- Peters, J., Wilson, D.P., Myers, G., Timms, P. et Bavoil, P.M. (2007).** Type III secretion à la Chlamydia. *TRENDS in Microbiology*, **15**: 241-251
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A. et Alfano, J.R. (2002).** Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99**: 7652-7657.

- Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. (2001).** The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants, and microorganisms. Dans "The rhizosphere", Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. (Eds). Marcel Dekker, Inc., Etats-Unis, p. 1-17.
- Pivato, B., Mazurier, S., Lemanceau, P., Siblot, S., Berta, G., Mougel, C. et van Tuinen, D. (2007).** *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist*, **176**: 197-210.
- Pivato, B., Gamalero, E., Lemanceau, P. et Berta, G. (2008).** Cell organization of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 on adventitious roots of *Medicago truncatula* as affected by arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Letters*, **289**: 173-180.
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P. et Berta, G. (2009).** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, **19**: 81-90.
- Plé, S., Job, V., Dessen, A. et Attree, I. (2010).** Co-chaperone interactions in export of the type III needle component PscF of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, sous presse.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. et Meyer, T.F. (1987).** Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, **325**: 458-462.
- Poole, E.J., Bending, G.D., Whipps, J.M. et Read, D.J. (2001).** Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytologist*, **151**: 743-751.
- Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serrano, A., Stahlberg, H., Brown, I., Tampakaki, A.P., Lustig, A., Sianidis, G., Politou, A.S., Engel, A., Panopoulos, N.J., Mansfield, J., Pugsley, A.P., Karamanou, S. et Economou, A. (2003).** Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 25816-25824.
- Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M. et Azcón-Aguilar, C. (2002).** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 525-534.
- Preston, G., Huang, H.C., He, S.Y. et Collmer, A. (1995).** The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinea*, and tomato are encoded by an operon containing *Yersinia* ysc homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**: 717-32.
- Preston, G., Deng, W.L., Huang, H.C. et Collmer, A. (1998).** Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *Journal of Bacteriology*, **180**: 4532-4537.
- Preston, G.M., Bertrand, N. et Rainey, B. (2001).** Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Molecular Microbiology*, **41**: 999-1014.
- Preston, G.M. (2007).** Metropolitan microbes: type III secretion in multihost symbionts. *Cell Host and Microbe*, **2**: 291-294.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. et Mekalanos, J.J. (2006).** Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**: 1528-1533.

Q

Qiu, X., Gurkar ,A.U. et Lory, S. (2006). Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**: 19830-19835.

Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A. et Attree, I. (2005). The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 36293-36300.

Quinaud, M., Plé, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J.P., Attree, I. et Dessen, A. (2007). Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **104**: 7803-7808.

R

Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. et de Bruijn, F.J. (1997). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 665-677.

Rahme, L.G., Mindrinos, M.N. et Panopoulos, N.J. (1992). Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Bacteriology*, **174**: 3499-3507.

Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M.W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C.L. et Tompkins, R.G. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**: 8815-8821.

Rainey, P.B. (1999). Adaptation on *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environmental Microbiology*, **1**: 243-257.

Rambelli, A. (1973). The rhizosphere of mycorrhizae. Dans "Ectomycorrhizae", Marks ,G.L. et Koslowski, T.T. (Eds). Academic Press, New York, Etats-Unis, p. 299-343.

Rangel-Castro, J.I., Levenfors, J.J. et Danell, E. (2002). Physiological and genetic characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with *Cantharellus cibarius*. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**: 739-748.

Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P. et Richaume, A. (2000). A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg (II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology*, **31**: 107-115.

Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.C., Mougel, C., Thioulouse, J. et Nazareth, S. (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 4479-4487.

- Ranjard, L., Lejon, P.H.D., Mougel, C., Scherer, L., Merdinoglu, D. et Chaussod, R. (2003).** Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, **5**: 1111-1120.
- Raymond, M. et Rousset, F. (1995).** GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249
- Remans, R., Croonenborghs, A., Gutierrez, R.D., Michiels, J. et Vanderleyden, J. (2007).** Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* are dependent on plant P nutrition. Dans "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research", Lemanceau, P., Bakker, P., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas, p. 341-351.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. et Kerp, H. (1994).** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**: 11841-11843.
- Rezzonico, F., Défago, G. et Moëgne-Loccoz, Y. (2004).** Comparison of ATPase-encoding type III secretion system *hrcH* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and in phytopathogenic proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 5119-5131.
- Rezzonico, F., Binder, C., Défago, G. et Moëgne-Loccoz, Y. (2005).** The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**: 991-1001.
- Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moëgne-Loccoz, Y. and Défago, G. (2007).** Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytologist*, **173**: 861-872.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M. et Prigent-Combaret, C. (2009).** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, **321**: 305-339.
- Rillig, M.C. et Mummey, D.L. (2006).** Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, **171**: 41-53.
- Roest, H.P., Mulders, I.H.M., Spaik, H.P., Wijffelman, C.A. et Lugtenberg, B.J.J. (1997).** A *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* locus not localized on the Sym plasmid hinders effective nodulation on plants of the pea cross-inoculation group. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**: 938-941.
- Roesti, D., Ineichen, K., Braissant, O., Redecker, D., Wiemken, A. et Aragno, M. (2005).** Bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 6673-6679.
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C.A., Truelzsch, K., Hoffmann, H. et Heesemann, J. (2003).** Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *Journal of Bacteriology*, **185**: 3735-3744.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. et He, S.Y. (1997).** Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**: 3459-3464.

Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L. et Bais, H.P. (2008). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, **64**: 153-166.

Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. et Dowling, D.N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, **278**: 1-9.

S

Saad, M.M., Kobayashi, H., Marie, C., Brown, I.R., Mansfield, J.W., Broughton, W.J. et Deakin, W.J. (2005). NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. *Journal of Bacteriology*, **187**: 1173-1181.

Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E. et Duc, G. (1995). Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* after γ -ray mutagenesis. *Plant Science*, **111**: 63-71.

Saitou, N. et Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406-425.

Sambrook, J. et Russel, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3^{ème} édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Etats-Unis.

Samudrala, R., Heffron, F. et McDermott, J.E. (2009). Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS Pathogens*, **5**: e1000375.

Sanchez, L., Weidmann, S., Brechenmacher, L., Batoux, M., van Tuinen, D., Lemanceau, P., Gianinazzi, S. et Gianinazzi-Pearson, V. (2004). Common gene expression in *Medicago truncatula* root in response to *Pseudomonas fluorescens* colonization, mycorrhiza development and nodulation. *New Phytologist*, **161**: 855-863.

Sanchez, L., Weidmann, S., Arnould, C., Bernard, A.R., Gianinazzi, S. et Gianinazzi-Pearson, V. (2005). *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* trigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, **139**: 1065-1077.

Sato, H. et Frank, D.W. (2004). ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Molecular Microbiology*, **53**: 1279-1290.

Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I. et Saitou, N. (1999). Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *Journal of Molecular Evolution*, **49**: 627-644.

Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U. et Kogel, K.H. (2009). Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant Journal*, **59**: 461-474.

Scheublin, T.R., Sanders, I.R., Keel, C. et van der Meer, J.R. (2010). Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME Journal*, **4**: 752-763.

- Schoehn, G., di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree I., Weissenhorn, W. et Dessen, A. (2003).** Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO Journal*, **22**: 4957-4967.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. et Walker, C. (2001).** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, **105**: 1413-1421.
- Scott-Tucker, A. et Henderson, I.R. (2009).** Type V secretion. Dans "Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis", Wooldridge, K. (Eds). Caister Academic Press, Norfolk, Royaume-Uni, p 139.
- Sequerra, J., Marmeisse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A. et Moiroud, A. (1997).** Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and random amplified polymorphic DNA. *Mycological Research*, **101**: 465-472.
- Shan, L., Oh, H.S., Chen, J., Guo, M., Zhou, J., Alfano, J.R., Collmer, A., Jia, X. et Tang, X. (2004).** The HopPtoF locus of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 encodes a type III chaperone and a cognate effector. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**: 447-455.
- Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y. et Défago, G. (1998).** Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 631-643.
- Shen, D.K., Quenee, L., Bonnet, M., Kuhn, L., Derouazi, M., Lamotte, D., Toussaint, B. et Polack, B. (2008).** Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical and Environmental Sciences*, **21**: 103-109.
- Silver, A.C., Kikuchi, Y., Fadl, A.A., Sha, J., Chopra, A.K. et Graf, J. (2007).** Interaction between innate immune cells and a bacterial type III secretion system in mutualistic and pathogenic associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **104**: 9481-9486.
- Singh, B.K., Nunan, N., Ridgway, K.P., Mc Nicol, J., Young, J.P.Y., Daniell, T.J., Prosser, J. et Millar, P. (2008).** Relationship between assemblages of mycorrhizal fungi and bacteria on grass roots. *Environmental Microbiology*, **10**: 534-541.
- Smith, S.E. et Read, D.J. (2008).** Mycorrhizal symbiosis. 3^{ème} édition, Academic Press, New-York, Etats-Unis, 787 p.
- Söderberg, K.H. et Bååth, E. (1998).** Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**: 1259-1268.
- Sorg, I. et Cornelis, G.R. (2009).** The type III secretion system. Dans "Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis", Wooldridge, K. (Eds). Caister Academic Press, Norfolk, Royaume-Uni, p. 93-116.
- Spehn, E.M., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., Hector, A., Caldeira, M.C., Dimitrakopoulos, P.G., Finn, J.A., Jumpponen, A., O'Donovan, G., Pereira, J.S., Schulze, E.D., Troumbis, A.Y. et Körner, C. (2002).** The role of legumes as a component of biodiversity in a cross-European study of grassland biomass nitrogen. *OIKOS*, **98**: 205-218.
- Speth, E.B., Lee, Y.N. et He, S.Y. (2007).** Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**: 580-586.

Spiers, A.J., Buckling, A. et Rainey, P.B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, **146**: 2345-2350.

Sprent, J.I. (2001). Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, Royaume-Uni.

St-Geme, III, J.W. et Cutter, D. (2000). The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *Journal of Bacteriology*, **182**: 6005-6013.

Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D. et Keen, N. (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **81**: 6024-6028.

Steenhoudt, O. et Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 487-506.

Subramanian, K.S., Santhanakrishnan, P. et Balasubramanian, P. (2006). Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae*, **107**: 245-253.

Sýkorová, Z., Kurt Ineichen, K., Andres Wiemken, A. et Redecker, D. (2007). The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza*, **18**: 1-14.

T

Tampakaki, A.P., Fadoulglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J. et Kokkinidis, M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology*, **6**: 805-816.

Tang, X., Xiao, Y. et Zhou, J.M. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**: 1159-1166.

Tarkka, M.T., Sarniguet, A. et Frey-Klett, P. (2009). Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium–fungus interactions. *Current Genetics*, **55**: 233-243.

Taylor, J. et Harrier, L.A. (2000). A comparison of nine species of arbuscular mycorrhizal fungi on the development and nutrition of micropropagated *Rubus idaeus* L. cv. Glen Prosen (Red Raspberry). *Plant and Soil*, **225**: 53-61.

Taylor, J. et Harrier, L.A. (2001). A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated *Fragaria x ananassa* cv. Elvira (strawberry) when colonised by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, **18**: 205-215.

Thioulouse, J. et Dray, S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software*, **22**: 1-14.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. et Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. et Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876-4882.

Thoquet, P., Ghérardi, M., Journet, E.P., Kereszt, A., Ané, J.M., Prospero, J.M. et Huguet, T. (2002). The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BioMed Central Plant Biology*, **2**: 1.

Thwaites, R., Spanu, P.D., Panopoulos, N.J., Stevens, C. et Mansfield, J.W. (2004). Transcriptional regulation of components of the type III secretion system and effectors in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**: 1250-1258.

Timonen, S., Jørgensen, K.S., Haahtela, K. et Sen, R. (1998). Bacterial community structure at defined locations of *Pinus sylvestris*-*Suillus bovinus* and *Pinus sylvestris*-*Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**: 499-513.

Toljander, J.F., Artursson, V., Paul, L.R., Jansson, J.K. et Finlay, R.D. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters*, **254**: 34-40.

Trouvelot, A., Kough, J.L. et Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Dans "Physiological and genetical aspects of mycorrhizae", Gianinazzi-Pearson, V. et Gianinazzi, S. (Eds). INRA Presse, Paris, France, p. 217-221.

U

Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Pierrat, J.C., Mustin, C. et Frey-Klett, P. (2007). Mycorrhizosphere effect on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied Environmental Microbiology*, **73**: 3019-3027.

V

van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. et Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, **396**: 72-75.

van der Heijden, M.G.A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., van Logtestijn, R. et Staehelin, C. (2006a). Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, **56**: 178-187.

van der Heijden, M.G.A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A. et Sanders, I.R. (2006b). The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, **172**: 739-752.

- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. et van Straalen N.M. (2008).** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, **11**: 296-310.
- van Dijk, K., Tam, V.C., Records, A.R., Petnicki-Ocwieja, T. et Alfano, J.R (2002).** The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*, **44**: 1469-1481.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. et Pieterse, C.M.J. (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**: 453-483.
- van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, **119**: 243-254.
- van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. et Gianinazzi-Pearson, V. (1998).** Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 255 rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, **17**: 879-887.
- van Wees, S.C.M., van der Ent, S. et Pieterse, C.M.J. (2008).** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 443-448.
- Vansuyt, G., Souche, G., Straczek, A., Briat, J.F. et Jaillard, B. (2003).** Flux of protons released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants: effect of phosphorus and iron nutrition. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 27-33.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. et Lupski, J.R. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5**: 25-40.
- Vessey, J.K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**: 571-586.
- Vestergård, M., Henry, F., Rangel-Castro, J.I., Michelsen, A., Prosser, J.I. et Christensen, S. (2008).** Rhizosphere bacterial community composition responds to arbuscular mycorrhiza, but not to reductions in microbial activity induced by foliar cutting. *FEMS Microbiology Ecology*, **64**: 78-89.
- Vinutzer, B.A., Jelenska, J. et Greenberg, J.T. (2005).** Bioinformatics correctly identifies many type III secretion substrates in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* and the biocontrol isolate *P. fluorescens* SBW25. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**: 877-888.
- Vincent, J.M. (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford, Royaume-Uni.
- Vitousek, P.M. et Walker, L.R. (1989).** Biological Invasion by *Myrica-faya* in Hawaii-plant demography, nitrogen-fixation, ecosystem effects. *Ecological Monographs*, **59**: 247-265.
- Vogelsang, K.M., Reynolds, H.L. et Bever, J.D. (2006).** Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist*, **172**: 554-562.

W

- Wang, B. et Qiu, Y.L. (2006).** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, **16**: 299-363.
- Warmink, J.A., Nazir, R. et van Elsas, J.D. (2008).** Universal and species-specific bacterial "fungiphiles" in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology*, **11**: 300-312.
- Warmink, J.A. et van Elsas, J.D. (2008).** Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? *ISME Journal*, **2**: 887-900.
- Warmink, J.A. et van Elsas, J.D. (2009).** Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 2820-2830.
- Watt, M., Hugenholtz, P., White, R. et Vinall, K. (2006).** Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Environmental Microbiology*, **8**: 871-884.
- Wehling, M.D., Guo, M., Fu, Z.Q. et Alfano, J.R. (2004).** The *Pseudomonas syringae* HopPtoV protein is secreted in culture and translocated into plant cells via the type III protein secretion system in a manner dependent on the ShcV type III chaperone. *Journal of Bacteriology*, **186**: 3621-3630.
- Wei, C.F., Deng, W.L. et Huang, H.C. (2005).** A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. *Molecular Microbiology*, **57**: 520-536.
- Wei, W., Plovianich-Jones, A., Deng, W.L., Jin, Q.L., Collmer, A., Huang, H.C. et He, S.Y. (2000).** The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**: 2247-2252.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. et Beer, S.V. (1992).** Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**: 85-88.
- Wei, Z.M. et Beer, S.V. (1995).** *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *Journal of Bacteriology*, **177**: 6201-6210.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B. et Thomashow, L.S. (2002).** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 309-348.
- Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. et Thomashow L.S. (2007).** Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biology*, **9**: 4-20.
- Whipps, J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 487-511.
- Williams, S.G., Varcoe, L.T., Attridge, S.R. et Manning, P.A. (1996).** *Vibrio cholera* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. *Infection and Immunity*, **64**: 283-289.

X

Xiao, F., Goodwin, S.M., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A. et Zhou, J.M. (2004). *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO Journal*, **23**: 2903-2913.

Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y. et Hutcheson, S.W. (1994). Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *Journal of Bacteriology*, **176**: 1025-1036.

Y - Z

Yahr, T.L., Hovey, A.K., Kulich, S.M. et Frank, D.W. (1995). Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *Journal of Bacteriology*, **177**: 1169-1178.

Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T. et Frank, D.W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**: 13899-13904.

Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H. et Saier, M.H. (2002). Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1562**: 6-31.

Young, N.D., Mudge, J.E. et Ellis, T.H.N. (2003). Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 199-204.

Yuan, J. et He, S.Y. (1996). The *Pseudomonas syringae* Hrp regulation and secretion system controls the production and secretion of multiple extracellular proteins. *Journal of Bacteriology*, **178**: 6399-6402.

Curriculum vitae

INGENIEUR DE RECHERCHE - CHEF DE PROJET R&D



Amandine VIOLLET
125, rue Général Fauconnet
21 000 DIJON

☎ 06 16 51 27 97
💻 violletam@yahoo.fr

Née le 21-05-80
30 ans
Française

Célibataire
Permis B

MOTIVATION
CURIOSITE
RIGUEUR
ESPRIT D'INITIATIVE
PERSEVERANCE
ADAPTATION

COMPETENCES

Recherche scientifique

- Conduite de projets** Recherche bibliographique et synthèse des connaissances existantes
Mise en place des stratégies d'études et suivi de projets
Traitement, analyse, interprétation et gestion des résultats obtenus
- Outils expérimentaux** Microbiologie, biologie moléculaire, protéomique
Culture en conditions naturelles et contrôlées, travail en stérilité
- Relationnel** Maintien d'une collaboration entre deux laboratoires
Travail en équipe et encadrement
- Communication** Rédaction d'articles scientifiques et vulgarisation
Participation à différents congrès

Qualité agroalimentaire

Sensibilisation du personnel à l'hygiène
Organisation et participations aux visites de contrôle sanitaire
Connaissances et mise en application de la méthode HACCP

Autres compétences

- Langues étrangères** Anglais (niveau professionnel)
Allemand (niveau scolaire)
- Informatique** Microsoft Office (Word, Excel, Power Point)
ImageMaster™ - logiciel d'imagerie - maîtrise
Arcview 8.3 - logiciel de cartographie - connaissance des bases
Logiciels de biostatistiques - connaissance des bases

EXPERIENCES

ENVIRONNEMENT

- 2006-2009** **Chargée de projet de Recherche (CDD)**
INRA-UMR 1229-MSE : Microbiologie du Sol et de l'Environnement (Dijon-21)
Agriculture durable, agroécologie, interactions plantes-microorganismes bénéfiques pour la croissance et de la santé des plantes, biologie moléculaire, microbiologie, microscopie électronique, culture contrôlée *in vitro* et en conditions naturelles
- 2004-2006** **Ingénieur de Recherche (stage)**
LMPE : Laboratoire de Mycologie-Phytopathologie-Environnement (Calais-62)
INRA-UMR 1088-PME : Plante-Microbe-Environnement (Dijon-21)
Dépollution de sols contaminés par les hydrocarbures, phytoremédiation, symbiose mycorhizienne à arbuscules, prélèvement et mise en germination des spores de champignons, protéomique, culture contrôlée *in vitro*

2002 Technicienne de Laboratoire (stage)
INSERM-U 515 : Croissance, différenciation et processus tumoraux (Paris-75)
| Immunologie, spécificité et affinité d'un sérum, dosage ELISA indirect et ELISA compétitif, Western Blott

2000-2001 Technicienne de Laboratoire (stage)
CNRS-ESA 7033-LPBC : Laboratoire de Physicochimie Biomoléculaire et Cellulaire (Paris-75)
| Thérapie génique, vectorisation d'acides nucléiques, microscopie de fluorescence, culture *in vitro* de cellules adhérentes de souris

AGROALIMENTAIRE

2004 Responsable du service Qualité : rayon crèmerie "Libre Service" (emploi saisonnier)
Intermarché-Les Mousquetaires (Saint Julien du Sault-89)
| Gestion des stocks et prise de commandes, gestion des fournisseurs, mise en rayon, suivi des enregistrements de la qualité, renseignement des clients

1998-2003 Responsable du service Qualité : transformation de produits carnés (emploi saisonnier)
Centrale Bardes (Ozoir la Ferrière-77)
| Mise en place et suivi d'une procédure générale suivant les exigences de la méthode HACCP, contrôles journaliers, sensibilisation du personnel

FORMATION

2006-2010 Doctorat
Ecole doctorale E2S de l'Université de Bourgogne (Dijon-21)
| Ecologie microbienne

2005-2006 Master Recherche (mention "Bien")
Université du Littoral Côte d'Opale (Calais-62)
| Environnement naturel

2002-2005 Institut Universitaire Professionnalisé (mention "Assez Bien" en maîtrise)
Université du Littoral Côte d'Opale (Boulogne sur Mer-62)
| Biotechnologies et Bio-industries agroalimentaires

1999-2002 Brevet de Technicien Supérieur
Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée (Paris-75)
| Biochimistes

1999 Baccalauréat Scientifique (mention "Assez Bien")
Lycée Louis Davier (Joigny-89)
| Physique-Chimie

AUTRES ACTIVITES

2007-2010 Membre du Réseau Technologique "Protéome Végétaux"

2009 Fête de la Science : animation du stand INRA "Biodiversité", Latitude 21, Dijon, France

2005 Projet de création d'une entreprise fictive : présentation devant un jury de professionnels du domaine agroalimentaire ayant pour objectif de juger de la faisabilité du projet

Sports
Equitation : championne de France de jumping en 1993
Endurance-cardio : grandes randonnées, natation, courses à pied, squash, fitness-boxe
Activité à but caritatif : courses contre le cancer du sein (Odyssea)

Culture
Pratique instrumentale : violon et piano depuis l'âge de 4 ans
Histoire de l'Art : suivi des cours à l'Université pour Tous
Activités artistiques : peinture à l'huile, acrylique, aquarelle, modelage

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications avec comité de lecture

Viollet A, Corberand T, Mougél C, Robin A, Lemanceau P et Mazurier S (accepté avec modifications). Fluorescent pseudomonads harbouring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiology Ecology*.

Viollet A, Corberand T, Pivato B, Lemanceau P et Mazurier S (soumis). Type three secretion system is involved in the promotion of arbuscular mycorrhization of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12. *New Phytologist*.

Viollet A, Mougél C, Cleyet-Marel JC, Guby-Rangin C, Corberand T, Lemanceau P et Mazurier S (en préparation). Impact of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system on bacterial and fungal communities in the rhizosphere of *Medicago truncatula*.

Viollet A, Lemanceau P et Mazurier S (en préparation). The type III secretion system of plants-associated non-pathogenic pseudomonads in the rhizosphere.

Contribution à des congrès

Viollet A, Corberand T, Robin A, Mougél C, Lemanceau P et Mazurier S (2009). Influence du Système de Sécrétion de Type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes. Communication orale, Forum des Jeunes Chercheurs, 25-26 juin 2009, Dijon, France.

Viollet A, Corberand T, Robin A, Mougél C, Lemanceau P et Mazurier S (2009). Arbuscular mycorrhiza influence the occurrence of soil fluorescent pseudomonads harbouring type III secretion systems. Poster, BAGECO 10, 15-19 juin 2009, Uppsala, Suède.

Viollet A, Corberand T, Robin A, Mougél C, Lemanceau P et Mazurier S (2008). Association préférentielle entre les mycorhizes à arbuscules et les *Pseudomonas* saprophytes présentant des systèmes de sécrétion de type III. Poster, Journées Francophones Mycorhizes, 4-5 septembre 2008, Dijon, France.

Avoscan L, Bernaud E, Corberand T, Mazurier S, Mougél C, Vansuyt G, **Viollet A** et Lemanceau P (2008). Dynamics of plant-microbes interactions in the rhizosphere. Poster, Journée de Microbiologie des Universités de Bourgogne et de Franche-Comté, 19 mai 2008, Dijon, France.