



Impact de l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays* L.

Vincent Walker

► To cite this version:

Vincent Walker. Impact de l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays* L.. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10188 . tel-00881136

HAL Id: tel-00881136

<https://theses.hal.science/tel-00881136>

Submitted on 7 Nov 2013

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE EVOLUTION, ECOSYSTEMES MICROBIOLOGIE MODELISATION

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 8 octobre 2010

Par:

M. Vincent WALKER

**Impact de l'inoculation de micro-organismes
phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de
Zea mays L.**

Devant le jury composé de :

M. D. Faure	Directeur de Recherche, CNRS, Gif sur Yvette	Rapporteur
M. P. Saindrenan	Chargé de Recherche, CNRS, Paris-sud	Rapporteur
M. I. El Hadrami	Professeur d'Enseignement Supérieur, U. Cadi Ayyad, Marrakech	Examineur
M. B. Combourieu	Professeur des Universités, Lyon1	Examineur
M. R. Bally	Directeur de Recherche, CNRS, Lyon	Codirecteur de thèse
M. G. Comte	Professeur des Universités, Lyon 1	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

Président de l'université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J.-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie

Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F.-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut des Sciences Financières et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J.-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

Je tiens tout d'abord à remercier grandement mes directeurs de thèse Gilles Comte et René Bally pour m'avoir soutenu tout au long de ces quatre ans, de m'avoir conseillé et épaulé dans les moments difficiles. Je les remercie également de m'avoir donné, grâce à ce sujet de thèse, l'opportunité de rapprocher deux disciplines, la microbiologie au sens large et la phytochimie. Je les remercie enfin pour m'avoir fait découvrir le « monde de la recherche », toujours et encore à explorer !

Je remercie également Cédric Bertrand et Cyril Montagné (Anciens du CESN) et partis trop tôt et trop loin. Je les remercie pour leur bonne humeur et la joie qu'ils ont apportées au laboratoire.

Je remercie très chaleureusement les rapporteurs M. Denis Faure et M. Patrick Saindrenan d'avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail de thèse. J'exprime ma gratitude à M. Ismaïl El Hadrami et M. Bruno Combourieu et d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Ma gratitude va également à M. Yvan Moëgne-Loccoz (je crois que je n'ai pas fait de faute sur le nom cette fois !) pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe Rhizosphère, et sans qui cette thèse n'aurait sans doute pas eu lieu, je le remercie également pour sa patience, sa disponibilité et les discussions scientifiques que nous avons pu avoir au sein du laboratoire et lors des réunions Micromaize... Je remercie également tous les membres de l'équipe, permanents, doctorants et stagiaires.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous les acteurs du Projet Micromaize, et particulièrement Mme Geneviève Défago, M. Fergal O'Gara, M. Jesus Caballero-Mellado, M. Patrick Mavingui, M. John Morissey, M. Simon Miller, M. Jan Jansa, M. Bachar Blal, M. Pierre Castillon, et bien sûr également les « petites mains », Mlle Olivia Rice, Mlle Carolin Schwer, M. Olivier Couillerot, M. Andreas Von Felten, sans oublier tous les autres...

Je tiens également à remercier tout particulièrement les membres du Centre d'Etude des Substances Naturelles (Rockfelleriens et Foreliens) et du PARMIC, que j'ai cotoyé tous les jours et avec qui et sans qui l'ambiance de la plateforme ne serait pas ce qu'elle est, avec une petite pensée particulière pour

ceux qui ont décidé de faire de moi un témoin Mme Zo Norozoa Camps et M Jean Popovici. Je n'oublie pas non plus Pok (et sa pokette), qui va devenir Papok, Guillaume et ses retours avisés sur l'OL et les fautes de l'équipe de France, Tic pour ses petits cours de salsa, ainsi que Tac pour ses leçons de savate...

Je vais remercier grandement mes stagiaires : Marco, Sandra et Kevin pour avoir supporté un tel « maître » de stage

Je remercie également l'ensemble de l'administration de l'UMR 5557 pour les pauses déjeuner « mots fléchés », et surtout Danis Abrouk pour avoir développé un logiciel d'alignement qui m'a été très utile.

Je n'oublierai pas non plus tous les membres de l'UMR d'Ecologie Microbienne, permanents, avec une petite pensée émue pour Gigi et sa bonne humeur et ses coups de gueules mémorables, mais également les étudiants avec qui j'ai partagé de nombreuses soirées labo, ainsi que les week ... chut !!!!

Je vais aussi avoir une petite pensée pour la Triloc, quadriloc, pentaloc, puis multiloc, et plus particulièrement Toune, Frado et Rut, au sein de laquelle 2 ans d'entente, de désentente et de soirées ont eue lieu.

Je vais bien sûr remercier mes parents et ma famille qui m'ont épaulé pendant les moments difficiles, remotivé quand la motivation s'était évaporée, qui ont également financé mes études avant d'arriver en thèse

Je garde le meilleur pour la fin...

Je tiens à remercier tout particulièrement Emilie, qui m'a supporté lors de la rédaction de cette thèse, et me supportera encore longtemps je l'espère. Une thèse ne suffirait pas à la remercier et lui exprimer ma gratitude pour tout ce qu'elle a fait pour moi....

Merci à vous tous...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------	----------

CHAPITRE 1:SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : LES METABOLITES SECONDAIRES DANS LES INTERACTIONS PLANTE/MICRO-ORGANISME ET LES CONSEQUENCES ECOLOGIQUES DE LA MODIFICATION DU METABOLISME VEGETAL

INTRODUCTION	7
---------------------	----------

1) Interactions fixatrices d'azote	14
---	-----------

1.1 La symbiose <i>Rhizobia</i> -Légumineuse	15
1.1.1 Généralités	15
1.1.2 Les Flavonoïdes : molécules signal de la symbiose	16
1.1.3 Etapes précoces de la symbiose <i>Rhizobium</i> /Légumineuses	19
1.1.4 Réponse de la plante aux facteurs de nodulation en termes de métabolites secondaires	21
1.1.4.1 Réponse au niveau de la synthèse en phénols et polyphénols de la plante hôte	21
1.1.4.2 Impact des facteurs Nod sur la synthèse en composés volatils de la plante hôte	24
1.1.5 Impact écologique des acides phénoliques dans les interactions <i>Rhizobium</i> /Légumineuses	25
1.2 La symbiose actinorhizienne.	26
1.2.1 Généralités et mise en place de l'interaction	26
1.2.2 Impact de <i>Frankia</i> sur les métabolites secondaires de la plante hôte	27
1.2.3 Rôle écologique des phénylpropanoïdes dans la symbiose Actinorhizienne	29

2) Cas particulier des symbioses associatives	30
--	-----------

2.1 Mise en place de la symbiose associative	31
2.1.1 Reconnaissance des bactéries PGPR par la plante hôte	31
2.1.1.1 Perception du genre <i>Pseudomonas</i>	31
2.1.1.2 Perception du genre <i>Azospirillum</i>	32
2.1.2 Mécanismes de protection et de promotion de la croissance de la plante hôte	33
2.1.2.1. Mécanismes de protection par les bactéries phytoprotectrices	33
2.1.2.2 Mécanismes de phytostimulation	36
2.2 Impact des bactéries PGPR sur le métabolisme de la plante hôte	36
2.2.1 Impact des PGPR biocontrôles sur la plante hôte	36
2.2.2 Impact des PGPR phytostimulatrices sur la plante hôte	37
2.3 Impacts écologiques des modifications métaboliques	38

3) Symbiose des plantes avec des champignons mycorhiziens	38
--	-----------

3.1 Les molécules signal dans l'établissement de la symbiose	40
3.2 Impact de la symbiose sur les apocaroténoïdes végétaux.	43
3.3 Impact des CMA sur la synthèse des composés phénoliques	44

3.4 Impact des Champignons Mycorhiziens à Vésicules (CMV) sur les terpènes	45
3.5 Impact des CMA sur les autres métabolites secondaires	47
3.6 Rôles écologiques supposés de ces modifications	47
CONCLUSION	49
 CHAPITRE 2 : MISE AU POINT DE LA MÉTHODE D'ANALYSE DE LA RÉPONSE MÉTABOLIQUE PRECOCE DU MAÏS Á L'INOCULATION DE BACTÉRIES PGPR PHYTOSTIMULATRICES EN CONDITIONS IN VITRO	
INTRODUCTION	51
Intérêt de l'analyse des exsudats	54
 PARTIE 1 : ANALYSE DES EXTRAITS RACINAIRES DE MAÏS EN CONDITION INOCULEE	 57
1.1. Matériel biologique et conditions de culture	57
1.1.1. Matériel végétal	57
1.1.2. Micro-organismes	57
1.1.3. Inoculations et cultures	58
1.1.4. Mesure des paramètres morphologiques	58
1.1.5. Extraction des métabolites racinaires	59
1.1.6. Extraction des exsudats racinaires	60
1.1.7. Analyse des échantillons par HPLC	60
1.1.8. Analyses statistiques	62
1.2. Résultats	62
1.2.1. Analyses sur la morphologie des plants inoculés par des PGPR phytostimulatrices	62
1.2.2. Chromatogramme des exsudats racinaires	64
1.2.3. Chromatogramme des extraits racinaires	65
1.2.4. Analyse discriminante et composés affectés par l'inoculation	65
1.2.4.1. Analyse discriminante des exsudats de racines	65
1.2.4.2 Analyse des extraits racinaires	66
 PARTIE 2 : ANALYSE DES EXSUDATS	 69
2.1. Matériel biologique et conditions de culture	69
2.2. Préparation des échantillons	70
2.3. Analyses chromatographiques et spectroscopiques	70
2.4 Résultats	71
2.4.1 Chromatogrammes des exsudats racinaires	71
2.4.2. Comparaison des composés exsudés et synthétisés par les racines de maïs cv. PR37Y15.	72
2.4.3. Analyse en spectrométrie de masse des exsudats racinaires	73
 DISCUSSION	 75

CONCLUSION	78
-------------------	-----------

CHAPITRE 3 : RÉPONSE MÉTABOLIQUE DU MAÏS À L'INOCULATION PAR AZOSPIRILLUM

INTRODUCTION	81
---------------------	-----------

Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth promoting rhizobacteria of the genus <i>Azospirillum</i>.	83
--	-----------

1) Introduction	85
------------------------	-----------

2) Results	87
-------------------	-----------

2.1. Effect of <i>Azospirillum</i> inoculation on early plant growth	87
2.2. Identification of maize secondary metabolites	87
2.3. Effect of <i>Azospirillum</i> inoculation on secondary metabolic profiles of maize cv. PR37Y15	91
2.4. Effect of <i>Azospirillum</i> inoculation on secondary metabolic profiles of maize cv. DK315	93
2.5. Effect of <i>Azospirillum</i> inoculation on individual secondary metabolites of maize	93
2.6. Inoculation effects on maize secondary metabolites in contrasted experiments	96
2.7. Relations between secondary metabolites	97

3) Discussion	98
----------------------	-----------

4) Materials and Methods	103
---------------------------------	------------

4.1 Organisms	103
4.2. Bacterial inoculation	103
4.3. Glasshouse experiment and plant extracts	104
4.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis	105
4.5 Liquid chromatography/ mass spectrometry analysis	105
4.7. Purification and identification of selected secondary metabolite	106
4.6. Analysis of maize secondary metabolites in different experiments	107
4.7. Statistical analysis	107

5) Conclusion	108
----------------------	------------

CHAPITRE 4 : RÉPONSE MÉTABOLIQUE DU MAÏS À L'INOCULATION D'UN CONSORTIUM MICROBIEN AU CHAMP

INTRODUCTION	113
---------------------	------------

Maize metabolic variations induced by microbial consortia in field experiment	115
Introduction	117
Material and methods	119
Biological material	119
Microorganism inoculation	120
Measurement of maize biomass	121
Metabolic analysis	121
Molecules identification and purification	122
Results	123
Early plant growth parameters	123
Identification of unknown compound	124
Effect of inoculations on secondary metabolite profile of maize	125
Effect of single inoculations on individual secondary metabolites of maize	126
Effect of mixed inoculations on individual secondary metabolites of maize	127
Effect of nitrogen and phosphorous amendment on individual secondary metabolites of maize	128
Discussion	129
Conclusion	132
 <i>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i>	 <i>100</i>
 Impact sur le métabolisme de la plante (1)	 136
Impact des exsudats sur les micro-organismes inoculés (2)	141
Perception des micro-organismes (3)	144
 <i>CONCLUSION GENERALE</i>	 <i>146</i>
 <i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	
 <i>ANNEXES</i>	

Liste des Figures

Figure 1: Place de la métabolomique dans le cadre de la génomique fonctionnelle. Adaptée de Sumner et al. (2003)	4
Figure 2: Voie générale de biosynthèse des métabolites secondaires chez les plantes (KEGG : http://www.genome.jp/kegg/pathway.html).....	8
Figure 3: A) Photographie de nodules déterminés sur des racines de <i>Phaseolus vulgaris</i> (haut) et nodules indéterminés sur des racines de Vesce (bas), B) Photographie au microscope optique d'une section de nodule montrant le tube d'infection sur une racine de Pois.....	16
Figure 4: Quelques flavonoïdes impliqués dans l'interaction Rhizobia-légumineuses. Structure des facteurs Nod (adapté de Gibson et al., 2008).....	18
Figure 5: Modèle schématique de la mise en place des nodules chez la Luzerne. Implication des flavonoïdes dans les étapes précoces de l'interaction <i>S. meliloti</i> -Luzerne. Dhf : 7,4'-dihydroxyflavone (adapté de (Zhang et al., 2009)	20
Figure 6: Variations qualitatives et quantitatives des composés volatils détectés sur des plantes induites par deux facteurs Nod différant par un groupe sulfate. Les lettres différentes indiquent des différences significatives avec le témoin non inoculé.	25
Figure 7: Structures proposées pour les composés racinaires de <i>M. gale</i> affectés par l'inoculation avec des souches de <i>Frankia</i> , basées sur les spectres UV et de masse. A: molécule G4, B: molécule G3, C: molécule G1, D: molécule G5 (tableau 3).....	29
Figure 8: Représentation schématique de l'effet de l'absence (gauche) ou de la présence (droite) de PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique). La taille des flèches indique le degré relatif du flux. (Adapté de Glick et al., 2004)	35
Figure 9: Principaux types mycorhiziens actuels représentés sur une coupe transversale de racine.....	39
Figure 10: A) Coloration orangée des racines mycorhizées de <i>Medicago truncatula</i> colonisées par <i>Glomus intraradices</i> (centre), avec <i>Glomus mosseae</i> (droite) et non mycorhizées (gauche). B) Voie de biogénèse des dérivés en C ₁₃ de cyclohexénone et C ₁₄ de mycorradicine à partir d'un précurseur de type caroténoïde synthétisé via la voie de la méthylérythritol phosphate (MEP) (Walter et al., 2007).	44
Figure 11: Origine et localisation des exsudats racinaires (adaptée de Dennis et al., 2010)	55
Figure 12: Images des systèmes racinaires de maïs inoculés ou non avec différentes bactéries PGPR obtenues avec le logiciel Winrhizo	63
Figure 13: Mesures de biomasse et d'architecture racinaire mesurées à l'aide du logiciel Winrhizo. Les lettres différentes indiquent des différences significatives selon le test de Tukey ($p < 0,05$, $n=6$).....	63
Figure 14: Chromatogramme type des exsudats racinaires de PR37Y15 non inoculé à 10 jours (280 nm)	64
Figure 15: Superposition des chromatogrammes enregistrés à 280 nm des extraits racinaires in vitro des plantules de maïs inoculées avec différentes bactéries PGPR phytostimulatrices.....	65
Figure 16: Chromatogramme (280nm) des exsudats obtenus après la préparation de tous les échantillons.	66
Figure 17: ACP discriminante obtenue à partir des chromatogrammes visualisés à 280 nm des extraits racinaires des plants cultivés in vitro	67
Figure 18: Variation quantitative des pics responsables de la séparation observée sur l'ACP.	68

Figure 19: Spectres UV des molécules discriminantes. Les maxima d'absorbance sont indiqués en nm. sh: épaulement.....	69
Figure 20: Chromatogramme type des échantillons d'exsudats racinaires de 10 jours, extraits à l'acétate d'éthyle et enregistré à 280 nm. Les pics fléchés indiquent des composés avec des spectres UV caractéristiques.	71
Figure 21: Spectres UV-visible des composés fléchés en Figure 20. Les maxima d'absorbance sont indiqués en nm.	72
Figure 22: Superposition de chromatogrammes types des extraits racinaires de PR37Y15 (pointillé) et des exsudats de ce même cultivar (plein) enregistrés à 280 nm. Chaque pic majoritaire est annoté avec l'identification des composés obtenue par HPLC/MS (Tableau 7).	73
Figure 23: Structure des benzoxazinoïdes identifiés dans les exsudats et les extraits racinaires	74
Figure 24: Effect of seed inoculation on dry biomass of maize at 10 days. a) PR37Y15 cultivar, b) DK315 cultivar. For roots and shoots of each cultivar, different letters indicate significant differences between treatments according to ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$)	87
Figure 25: Mass spectra and identification of DIMBOA-Glc in roots extracts by HPLC/Electro Spray Ionization Mass Spectrometry. A) positive ion fragmentation, B) negative ion fragmentation. TFA, Trifluoroacetate.....	88
Figure 26: NMR data of MBOA (compound 8).	88
Figure 27: Main benzoxazinone derivatives and benzoxazolinone compounds identified in maize extracts and already reported in the literature.	90
Figure 28: Standard chromatogram obtained at 280 nm in Reverse Phase-HPLC for methanolic root extracts of PR37Y15 cultivar. Each of the main peaks was identified by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry analysis except for peak 8 identified by NMR analysis.	91
Figure 29: Discriminant PCA performed on chromatographic data obtained for each methanolic extract of maize. Analyses were done with the integration of peaks with a relative intensity up to 1% of chromatogram. Each point represents four pooled extracts of the same treatment (4 plants). A) PR37Y15 root extracts, B) PR37Y15 shoot extracts, C) DK315 root extract, D) DK315 shoot extracts. The weight of each axis is indicated.	92
Figure 30: Effect of maize seed inoculation on plant content in individual secondary metabolites that distinguished treatments in discriminant PCA. A) PR37Y15 roots, B) PR37Y15 shoots, C) DK315 roots, D) DK315 shoots. CHA : cyclic hydroxamic acids. For each metabolite, different letters indicate significant differences between treatments according to ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$).	95
Figure 31: Discriminant PCA performed on chromatographic data obtained for each methanolic root extract of maize inoculated or not with <i>Azospirillum lipoferum</i> CRT1 in separate experiments. Analyses were based on peaks areas and retention times. Each point represents four pooled extracts of the same treatment (4 plants). 10d, 16d and 35d correspond to 10, 16 and 35 days after inoculation respectively.	96
Figure 32: Pair-wise comparisons of intensity (%) in the main secondary metabolites identified in maize cultivars, based on all root and shoot samples from both cultivars and all treatments ($n=32$). Pearson correlation coefficient r was highly significant in each comparison ($P < 0.05$) and is indicated.....	97

Figure 33: Hypothetical model proposed for benzoxazinone derivative pathway in maize. The model was adapted from Morant et al., (2008), Jonczyk et al., (2008), Eljarrat and Barcelo (2001), Leighton et al., (1994), and Oikawa et al., (2004), and completed with finding.....	99
Figure 34: Measurement of maize root biomass of each inoculation treatment. Different letters represent statistical differences following ANOVA test. CRT1 correspond to <i>A. lipoferum</i> CRT1, F113 to <i>P. fluorescens</i> F113, JJ291 to <i>Glomus intraradices</i> JJ291. N2P2 correspond to a high level of fertilization.....	124
Figure 35: Chemical structure of a phytochemical compound corresponding to 1,2-benzenedicarboxylic acid or Diethylphthalate.....	125
Figure 36: Discriminant PCA obtained from root extract chromatograms recorded at 280 nm. N2P2 represent treatment at a high level of fertilization. Consortium contained <i>A. lipoferum</i> CRT1, <i>P. fluorescens</i> F113 and <i>Glomus intraradices</i> JJ291.	126
Figure 37: Discriminant compounds responsible of segregation observed on PCA between treatments with a normal level of fertilization. Different letters represent statistical differences following ANOVA test.....	127
Figure 38: Compounds responsible of segregation observed on PCA between fertilization treatments. N1P1 correspond to a normal level of fertilization, N2P2 correspond to a high level of fertilization. Different letters represent statistical differences following ANOVA test.	129
Figure 39: Proposition de modèle de fonctionnement de l'interaction maïs/ microorganismes phytobénéfiques.....	136
Figure 40: Voie de biosynthèse des benzoxazinoides proposé avec les différentes enzymes de ce métabolisme. Les flèches en pointillés sont des étapes hypothétiques. Les enzymes portant un numéro ont été identifiées (Morant et al., 2008). Les enzymes sur fond rouges restent à confirmer.	138

Liste des Tableaux

Tableau 1: Différents polyphénols induisant l'expression des gènes nod. EG : exsudats de graine, ER : Exsudats de racine.....	17
Tableau 2: Tableau représentant les variations observées sur les composés phénoliques racinaires de l'Arachide en condition inoculée avec Rhizobium sur un suivi de 6 semaines après inoculation. (+ et - représentent l'augmentation ou l'absence de variation par rapport au Témoin (non inoculé)). Adapté de Charitha Devi & Reddy, 2002.	22
Tableau 3: Principaux pics discriminant les inoculations. a longueur d'onde (nm), b P: phénols; F: flavonoïdes; HCA: acide hydroxycinnamique. sh: épaulement. ND non déterminé, c Ions spécifiques positif et négatifs.....	28
Tableau 4: Déterminants des Pseudomonas induisant de l'ISR (adapté de Bakker et al., 2007)	34
Tableau 5: Effet des racines vivantes ou des composés racinaires sur la réponse de différents champignons mycorhiziens.....	41
Tableau 6: Proportion en pourcentage de chacun des composés de l'huile essentielle de Basilic grand vert en fonction des traitements	46
Tableau 7: Tableau récapitulatif des données spectrales des composés identifiés en Figure 22. ép. : épaulement	74
Tableau 8: Spectral data for compounds 1-10 classified by polarity. a maximum spectral absorbance wavelengths (nm), b identified in roots, c identified in shoots; sh, spectral shoulder; Nd, not determined; Hex, hexose.....	89

Liste des abréviations

ACN: Acétonitrile
ACP: Analyse en Composantes Principales
AHL: Acyle Homosérine Lactone
AIA: Acide Indole Acétique
AIB: Acide Indole Butirique
AMF: Arbuscular Mycorrhizal Fungus
ANOVA: ANalysis Of Variance (analyse de variance)
ATP: Adénosine TriPhosphate
CHS: CHalcone Synthase
CMA: Champignon Mycorhizien à Arbuscules
CMV: Champignon Mycorhizien à Vésicules
CoA: Co-enzyme A
COSY: COrrrelation SpectroscopY
Dhf: Dihydroxyflavone
DIBOA: 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
DIM₂BOA: 2,4-dihydroxy-6,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one
DIMBOA : 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
ESI-MS : ElectroSpray Ionisation- Mass Spectrometry
EtAC : Ethyle Acetate (Acétate d'éthyle)
GC/MS : Gaz Chromatography/ Mass Spectrometry
Glc : Glucose
HCA : Hydroxy Cinnamic Acid
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMBOA : 2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
HR : Hypersensitive Response
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
IFR: IsoFlavone Reductase
ISR: Induced Systemic Resistance
LIR: Local Induced Resistance
LPS: LipoPolySaccharide
M₂BOA: 6,7-dimethoxy-2-benzoxazolinone

MBOA: 6-methoxybenzoxazolin-2-one

MeOH: Methanol

MHB: Mycorrhizal Helper Bacteria

MPLC: Medium Pressure Liquid Chromatography

mUA: mili Unité d'Absorbance

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

PAL: Phenylalanine Amonia Lyase

PHP: PHenylPropanoïdes

RC: Regenerated Cellulose

RP: Reverse Phase

RP-TLC: Reverse Phase- Thin Layer Chromatography

SPE : Solid Phase Extraction

SPME : Solid Phase Micro Extraction

Tr : Temps de rétention

UV : Ultra-Violet

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

De manière à faire face à l'augmentation de la population mondiale et aux besoins croissants sur le plan alimentaire qui en découle, l'augmentation des rendements en agriculture est devenue un enjeu majeur. En effet, les récents rapports de la FAO indiquent que d'ici 2050 il sera nécessaire de doubler la production agricole mondiale actuelle pour nourrir les 9 milliards d'êtres humains. Pour atteindre cet objectif, dès la fin du 20^e siècle, la révolution verte (traduisant la volonté des pays développés d'améliorer les rendements) a permis grâce à la sélection variétale, de mettre au point de nouvelles variétés à haut rendement. Parallèlement, ces rendements ont également été améliorés en augmentant la quantité d'intrants chimiques dans les monocultures (fertilisants, produits phytosanitaires...). Ainsi la production de fertilisants azotés, phosphatés et potassiques s'est considérablement accrue. Si l'efficacité de ces fertilisants sur la croissance des plantes et l'amélioration des rendements des grandes cultures n'est pas contestée, leur influence sur l'environnement est largement sujette à discussions. En effet leur impact sur la pollution des eaux de surfaces et souterraines, principalement par le lessivage des sols ne sont plus à démontrer. Il en résulte une augmentation des zones eutrophisées en Europe et par là même une diminution de la biodiversité. A la suite de cette prise de conscience, dans une démarche de développement durable, les réflexions se sont tournées vers la conception et le développement de méthodes d'amélioration des rendements plus douces *via* une utilisation des amendements plus raisonnée, la diminution de l'apport des produits phytosanitaires, ou encore la lutte biologique sous diverses formes et notamment l'utilisation de micro-organismes phytobénéfiques.

Certains micro-organismes du sol sont capables d'améliorer la croissance des plantes en établissant des interactions symbiotiques avec leur plante hôte. A ce niveau, on peut distinguer deux types de symbioses bénéfiques plantes/micro-organismes.

La première, la symbiose mutualiste est souvent considérée comme obligatoire entre les deux partenaires. Elle s'accompagne généralement d'un spectre d'hôte relativement étroit et/ou d'une différenciation morphologique chez l'un ou les deux partenaires de la symbiose (Bertrand *et al.*, 2009). Les symbioses mutualistes plantes/micro-organismes les plus étudiées sont les symbioses fixatrices d'azote impliquant des Fabacées (avec par exemple *Rhizobium*) ou des plantes actinorhiziennes (avec *Frankia*), ainsi que les symbioses mycorhiziennes des végétaux supérieurs avec les champignons (*Hebeloma*, *Glomus*, etc.) (Marmeisse *et al.*, 2004; Normand *et al.*, 2007; Franche *et al.*, 2009). Les symbioses mycorhiziennes qui font intervenir des champignons telluriques et les racines de 80 % des espèces de plantes, où le champignon, en mycorhizant les racines, a un rôle exploratoire du sol et augmente les surfaces d'échanges de la plante et la nutrition minérale (Clark & Zeto, 2000).

Le deuxième type de symbiose bénéfique plante/micro-organisme est la symbiose associative (coopération) qui est également une interaction à bénéfices réciproques entre les deux partenaires. Elle est habituellement considérée comme une interaction facultative, à large spectre d'hôte, et avec peu ou pas de différenciation des partenaires. L'exemple le mieux connu est celui des bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes, ou *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Dobbelaere *et al.*, 2001; Franche *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009). Parmi ces PGPR, une distinction peut être établie. Certaines ont des effets de phytostimulation et sont qualifiées de biofertilisantes car elles peuvent stimuler directement la croissance de leur plante hôte. Les bactéries PGPR phytostimulatrices les plus étudiées appartiennent au genre *Azospirillum* et peuvent stimuler la croissance du végétal via la synthèse de phytohormones (auxines et gibbérelines), la fixation atmosphérique de l'azote, la production d'oxyde nitrique (Molina-Favero *et al.*, 2008) et/ou en interférant avec le métabolisme de l'éthylène (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Toutefois, l'effet de phytostimulation est plus attribué à la production de phytohormones, la fixation

atmosphérique de l'azote jouant un moindre rôle (Spaepen *et al.*, 2007). Les premières études sur ces bactéries se sont intéressées à la fixation libre de l'azote (gène *nifH*) (James, 2000). Par la suite les recherches se sont attachées à caractériser les effets phytohormonaux en identifiant les gènes *ipdC* impliqué dans la synthèse de l'acide indole acétique et *acdS* impliqué dans la désamination du 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) précurseur de l'éthylène chez les plantes (Prigent-Combaret *et al.*, 2008).

Quant aux bactéries phytoprotectrices, les souches les plus étudiées appartiennent au groupe des *Pseudomonas* fluorescents (Haas & Defago, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2009). Leur principal mode d'action est l'inhibition de micro-organismes phytopathogènes par la production d'antibiotiques (Raaijmakers *et al.*, 2002) et l'induction de résistance systémique chez la plante (Bakker *et al.*, 2007). L'étude des propriétés antagonistes des PGPR phytoprotectrices a concerné principalement les interactions avec les phytopathogènes fongiques. Parmi les antibiotiques, le plus étudié est le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), dont la production constitue une composante majeure de l'effet phytoprotecteur de nombreuses souches de *Pseudomonas* (Haas & Defago, 2005; Weller *et al.*, 2007). Une autre composante de l'effet phytoprotecteur est le mécanisme de compétition avec les phytopathogènes pour les ressources en fer biodisponible grâce aux bactéries du genre *Pseudomonas* synthétisant des sidérophores (Cornelis, 2010).

Si les effets phytobénéfiques induits par les bactéries PGPR sont bien caractérisés au niveau biomoléculaire les études sur les impacts de ces bactéries sur la physiologie des plantes hôtes se sont principalement focalisées sur la morphologie racinaire. Pourtant, au cours de l'évolution, les plantes ont dû mettre en place des stratégies particulières afin de se maintenir dans leur biotope et en particulier pour faire face aux contraintes environnementales inhérentes à tous les organismes vivants. Ainsi, plusieurs outils ont été développés par les plantes pour s'implanter et se maintenir dans leur environnement. La dissémination du pollen

et des fruits est un prérequis pour le brassage génétique et la dissémination des espèces végétales. Le développement de stratégies de défense contre des facteurs biotiques (herbivorie, allélopathie, pathogénie ...) ou abiotiques comme les stress hydriques, thermiques, oxydatifs, protection contre les UV (pour revue voir Croteau *et al.*, 2000) ainsi que des mécanismes de symbiose, sont également essentiels à la survie des végétaux. Dans toutes ces interactions, qu'elles soient biotiques ou abiotiques, les métabolites végétaux et parmi eux principalement les métabolites secondaires prennent une place prépondérante et sont intimement impliqués dans l'écologie de l'organisme végétal.

Afin d'étudier l'impact de ces interactions sur le métabolisme végétal, depuis une quarantaine d'années s'est développée une nouvelle discipline : la métabolomique. Celle-ci étudie la diversité des métabolites secondaires dont la synthèse est particulièrement corrélée aux contraintes environnementales. A l'instar de la génomique, la transcriptomique ou la protéomique, la métabolomique vise à étudier l'ensemble des métabolites élaborés par un organisme, organe ou tissu, dans des conditions particulières, de manière à obtenir une image de son état physiologique à un instant donné. Cette approche est particulièrement prometteuse car elle constitue une passerelle entre les études génomiques, transcriptomiques et protéomiques pour l'élucidation de la fonction des gènes (Figure 1).

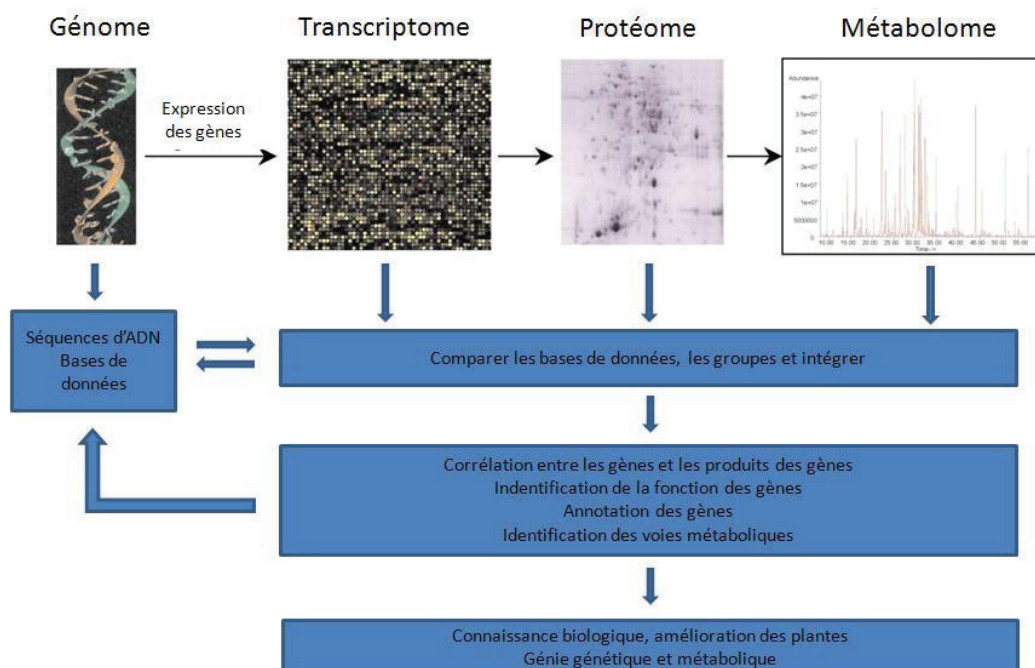


Figure 1: Place de la métabolomique dans le cadre de la génomique fonctionnelle. Adaptée de Sumner *et al.* (2003)

Cette approche est souvent utilisée pour déterminer les empreintes moléculaires des espèces (Huhman & Sumner, 2002), pour analyser l'impact de l'apport exogène de composés chimiques (Bednarek *et al.*, 2001) et pour comparer les contenus métaboliques des plantes génétiquement modifiées (Roessner *et al.*, 2000). Mais une des applications de la métabolomique est également d'étudier les processus d'interactions (Maier *et al.*, 1999). De plus en plus d'études de métabolomique se focalisent sur les interactions plantes/pathogènes. Ainsi, des études ont été menées sur l'impact des interactions entre des mutants d'*Arabidopsis thaliana* et le champignon oomycètes pathogène *Pythium sylvaticum*, sur le profilage métabolique en composés aromatiques de la plante. Elles montrent une diminution de synthèse en composés dérivés des phenylpropanoïdes de la plante (Bednarek *et al.*, 2005). Cette variation métabolique induite par les micro-organismes entre donc complètement dans la compréhension des écosystèmes de par son impact écologique sur l'environnement proche de la plante, mais également dans une meilleure compréhension de l'interaction.

Du fait de la réactivité des métabolites secondaires et de leur rapide « turn over », une interaction biotique avec une plante peut induire des modifications profondes en termes de métabolites synthétisés. Par ailleurs de nombreux métabolites secondaires sont considérés comme molécules signal et sont à la base de l'initiation d'une interaction avec des phénomènes de reconnaissance (flavonoïdes par exemple) par les différents partenaires, permettant ainsi le début d'un dialogue moléculaire entre les protagonistes de l'interaction (Walker *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006).

Dans le cadre d'un projet Européen Micromaize (FW6 STREP 036314) dont l'un des objectifs est de diminuer les apports d'intrants chimiques azotés et phosphatés lors de la monoculture de maïs, ce travail de thèse nous a amené à étudier l'interaction symbiotique entre une céréale de grande culture, le maïs, et des micro-organismes phytobénéfiques, connus pour induire chez leur plante hôte une phytostimulation et/ou une phytoprotection. Dans le

cadre de l'étude de ces interactions, nous avons cherché à voir comment la plante répondait en terme de métabolisme à l'interaction et jusqu'à quel degré cette réponse pouvait présenter une signification physiologique en lien avec la mise en place d'une association bénéfique.

Une première partie de ce manuscrit de thèse comportera une synthèse de la littérature sur l'étude des métabolites secondaires lors des symbioses phytobénéfiques entre des micro-organismes et leur plante hôte, et l'impact de ces interactions aux niveaux physiologiques et écologiques. Par la suite, au vu des connaissances actuelles sur la symbiose associative, nous présenterons les résultats de l'étude *in vitro* de l'impact de la symbiose entre le maïs et des bactéries rhizosphériques du genre *Azospirillum* sur le métabolisme de la plante hôte, en conditions holoxéniques. Nous verrons ensuite, afin de ne pas se limiter à des conditions artificielles, les résultats obtenus lors d'une deuxième approche entreprise en sol non stérile, faisant ainsi intervenir les éventuelles interactions microbiennes du sol avec les différents protagonistes de l'interaction, ce qui a permis de rechercher d'éventuels marqueurs métaboliques végétaux de l'interaction maïs/*Azospirillum*. Enfin, dans un dernier chapitre, nous présenterons les résultats obtenus lors d'expérimentation au champ afin d'obtenir un système représentatif des pratiques culturales, faisant intervenir différents partenaires microbiens (bactéries phytoprotectrices, phytostimulatrices et champignons mycorhiziens) en inoculations simples ou combinées.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de dégager des informations clés sur le plan fonctionnel concernant la mise en place de ces interactions associatives plante-bactéries qui seront discutées en fin de document.

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE :

**LES METABOLITES SECONDAIRES DANS LES
INTERACTIONS PLANTE/MICRO-ORGANISME ET LES
CONSEQUENCES ECOLOGIQUES DE LA MODIFICATION
DU METABOLISME VEGETAL**

INTRODUCTION

Les plantes sont continuellement sujettes à des interactions environnementales, qu'elles soient biotiques ou abiotiques. En ce qui concerne les interactions abiotiques, le plus souvent elles ont des causes climatiques (températures, stress hydriques, photopériodes...), mais elles peuvent également être liées aux conditions physico-chimiques du sol sur lequel les plantes s'établissent. Pour y faire face, les plantes ont dû s'adapter aux diverses contraintes du milieu et, du fait de leur caractère sessile, doivent développer des systèmes de réponse réactifs et diffusibles. Ce système est à la base de la survie de la plante et fait intervenir notamment les métabolites secondaires. Ces métabolites sont décrits comme étant des composés présents de façon limitée dans les groupes taxonomiques. Ils ne sont pas nécessaires à la vie de la cellule (ou de l'organisme), mais jouent un rôle dans l'interaction de la cellule avec son environnement en assurant sa survie (Verpoorte, 2000). Cette gamme de composés est très répandue chez les végétaux et constitue, entre autres, des moyens de lutte contre des concurrents écologiques (compétition végétale pour la lumière, les ressources ou l'espace, allélopathie), contre les micro-organismes (champignons ou bactéries) des prédateurs (production de substances toxiques ou inappétantes contre les herbivores). Le règne végétal compte près de 100 000 métabolites secondaires, décrits jusqu'à présent, pratiquement tous synthétisés en réponse à des contraintes environnementales (Wink, 1988 ; Kliebenstein, 2004). Il existe principalement 3 grandes familles de métabolites secondaires qui sont représentés par les terpènes, les alcaloïdes et les molécules dérivées de composés phénoliques. Les voies d'élaboration de ces métabolites sont représentées dans Figure 2. Des détails supplémentaires ainsi que des agrandissements de ces voies sont consultables sur le site du Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG : <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html#global>). Les composés de la famille des terpènes

 ∞

résultent de l'oligomérisation d'unités à 5 atomes de carbones basées sur l'isopentényl pyrophosphate. Ces chaînes sont ensuite soumises à l'action d'enzymes de la classe des terpènes cyclases permettant de générer une très grande diversité de noyaux. On retrouve notamment les monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20, les triterpènes en C30 et les tétратerpènes en C40. L'oligomérisation peut dans certains cas aller jusqu'à plusieurs milliers d'unités isopréniques donnant ainsi accès aux caoutchoucs et aux latex. Ces composés ont été décrits par Harborne (1988) pour avoir des activités importantes sur la résistance des plantes contre les insectes et les micro-organismes. Bien entendu ce n'est pas là leur seul rôle, puisque l'on peut également retrouver au sein de ces composés des hormones (ABA, gibbérélines, isoprène, ...), des molécules antifongiques, antibiotiques, nématocides, etc...

Les alcaloïdes quant à eux sont dérivés des acides aminés et contiennent au moins un atome d'azote dans leur hétérocycle. La diversité des voies d'élaboration des aminoacides au sein de la cellule a donc pour conséquence une diversité des voies d'élaboration de ces métabolites secondaires azotés. De ce fait l'origine biogénétique des alcaloïdes est beaucoup moins homogène que celle des terpènes (pour revue voir Facchini, 2001). Ces alcaloïdes sont principalement connus pour avoir un rôle de protection de la plante contre les animaux et notamment les brouteurs. C'est d'ailleurs leur action physiologique très marquée chez les animaux qui en ont fait une classe chimique particulièrement intéressante depuis de nombreux siècles dans la mesure où l'homme a trouvé au sein de ces composés des pharmacophores puissants qu'il a utilisé notamment en thérapeutique (quinine, strychnine, morphine, atropine, ...).

Les composés phénoliques, ont été décrits comme un groupe structuellement diversifié de métabolites secondaires (Wong, 1973). D'un point de vue biosynthétique, trois voies principales d'élaboration coexistent. La première, la voie « polyacétate » consiste en la

polymérisation d'unités acétates activées sous la forme de malonyl-CoA suivie par des cyclisations et une étape souvent spontanée d'aromatisation du noyau phénolique. Cette voie d'élaboration concerne principalement certaines quinones et des acétophénones. La seconde dite « voie du shikimate » utilise les acides aminés aromatiques et notamment la phénylalanine comme substrat qui subie via la Phényl Alanine Amonia Lyase une désamination oxydative donnant de l'acide cinnamique qui est alors le précurseur de tous les phénylpropanoïdes (C₆-C₃) ainsi que de nombreux acides phénols (dérivés d'acides benzoïques en C₆-C₁). Enfin, la troisième voie d'élaboration dite « voie mixte » est en fait une voie où les composés sont constitués de deux parties élaborées chacune par les deux voies précédemment citées. Cela concerne notamment les flavonoïdes, une des classes chimiques les plus importantes tant en quantité qu'en diversité ou en répartition au sein du règne végétal. Il est parfois difficile de savoir pour les composés en C₆-C₁ s'ils proviennent de la dégradation de composés en C₆-C₃ (dérivés de l'acide cinnamique) où s'ils sont dérivés d'étapes en amont dans la voie du shikimate ou de la voie des polyacétates menant aux dérivés d'acides benzoïques. Par exemple, la question de la synthèse d'une molécule aussi importante que l'acide salicylique, un acteur majeur des réponses aux stress biotiques, a fait encore jusqu'à très récemment l'objet d'interrogations quant à l'élucidation complète de sa voie de biosynthèse chez les plantes (Raskin, 1992; Chen *et al.*, 2009).

Si des composés comme les acides hydroxycinnamiques et autres flavonoïdes sont ubiquistes (Dixon *et al.*, 2002), d'autres classes de composés peuvent être de distribution beaucoup plus restreinte. Ainsi, les isoflavonoïdes sont principalement limités à la sous-famille des *Papilionoideae* des *Fabaceae*. Les stilbènes, quant à eux, sont retrouvés dans de nombreuses espèces telles que les *Leguminosae*, les *Vitaceae* et les *Pinaceae*.

Le rôle des polyphénols est diversifié et ces composés peuvent être synthétisés par les plantes pour se protéger des facteurs abiotiques tels que les rayonnements ultraviolets (qui

induisent des mutations au niveau de l'ADN) car ils sont capables d'absorber ce rayonnement. Par ailleurs, ces composés sont des pigments, dont le rôle primaire chez les plantes est la capture de photons pour la photosynthèse (Schmelzer *et al.*, 1988; Shirley, 1996). De la même manière, les pigments des fruits interviennent dans la dissémination des graines, via l'attraction qu'ils exercent sur les animaux tels que les oiseaux capables de les percevoir (Van der Meer *et al.*, 1992; Kong *et al.*, 2003). Par ailleurs, les composés phénoliques (phénols et polyphénols) sont des molécules essentielles dans la stratégie de défense des plantes. En effet de nombreux acides phénoliques comme l'acide caféique, ou l'acide gallique ont des activités antivirales, antibactériennes ou antifongiques importantes (Murphy Cowan, 1999).

Nous remarquons que la distinction entre métabolites primaires et métabolites secondaires n'est pas clairement établie. Il est indéniable qu'il existe une interconnexion étroite entre les métabolites secondaires et primaires car ces derniers sont souvent à la base de la synthèse des métabolites secondaires mais sont également utilisés comme cofacteurs dans leurs voies de biosynthèse. En effet, la synthèse des acides aminés et notamment le tryptophane, est le point de départ de la synthèse des composés indoliques et plus particulièrement des alcaloïdes indoliques. Du fait de la grande réactivité de ces composés, aussi bien pour la vitesse de leur synthèse que pour les effets de protection qu'ils confèrent à la plante, il est évident que ces métabolites secondaires ont un rôle écologique important. Ce constat relance donc la notion même de métabolite secondaire car nous l'avons vu précédemment, ces composés ont des rôles complexes et multiples allant de la dissémination à la protection de l'espèce.

Les plantes interagissent fortement avec les différents organismes présents dans leur environnement. Au sein de la rhizosphère des plantes, peuvent cohabiter différents micro-organismes tels que des bactéries, des champignons filamenteux, des protistes, qui peuvent interagir différemment avec la plante hôte. Ces interactions s'établissent sur un continuum

allant du parasitisme au mutualisme et sont souvent à la base de la synthèse de métabolites particuliers en réponse à ces interactions. Les molécules organiques intervenant dans ces interactions sont classées en trois grands groupes : les phytoalexines, les phytoanticipines et les molécules signal. Les phytoalexines sont des molécules antimicrobiennes de faible poids moléculaire, synthétisées et accumulées dans les plantes après une exposition à des micro-organismes. Les phytoanticipines sont, quant à elles, synthétisées constitutivement dans la plante en anticipation d'une attaque de pathogène. Les molécules signal sont des molécules permettant de transmettre un signal entre deux cellules de même organisme ou entre deux organismes, et induisent une réponse spécifique. Les interactions entre les plantes et des organismes divers mettent en jeu ces différents mécanismes (interaction et synthèse de métabolites secondaires), ce qui induit une réponse de l'organisme partenaire.

Au cours de cette synthèse, nous nous focaliserons sur les principales interactions mutualistes (bénéfices réciproques) entre des plantes et des micro-organismes du sol et les modifications au niveau de la biosynthèse de métabolites secondaires chez la plante. La plupart des symbioses mutualistes entre une plante hôte et des bactéries rhizosphériques sont des symbioses dites fixatrices d'azote atmosphérique. En effet, les plantes ne sont pas capables d'utiliser et de transformer l'azote atmosphérique. Au cours de l'évolution, elles se sont donc associées, de façon durable ou non, avec des organismes pouvant opérer cette transformation. Lors d'une association entre un micro-organisme fixateur d'azote et une plante, celle-ci développe des organes particuliers permettant aux bactéries d'effectuer la fixation d'azote atmosphérique et de transférer les produits à la plante. Une des symbioses les plus étudiées à l'heure actuelle est la symbiose *Rhizobium*/Légumineuse qui met en jeu une α -protéobactérie et des plantes dicotylédones de la famille des légumineuses. Cette interaction joue un rôle économique important, car un grand nombre de ces plantes sont cultivées à des fins alimentaires. Une autre grande symbiose, mettant en jeu des bactéries fixatrices d'azote,

est la symbiose actinorhizienne qui associe des bactéries du genre *Frankia* à des plantes angiosperme actinorhiziennes. Dans ces deux cas, la plante forme des structures différenciées qui sont les nodules, dans le cas de la symbiose *Rhizobium*/légumineuse et, des pseudonodules, dans le cas de la symbiose actinorhizienne. Enfin, il existe également un autre type d'interaction liée à la fixation d'azote dont nous allons parler par la suite, la symbiose associative (coopération). Cette symbiose associe des bactéries dites PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) à des monocotylédones en grande majorité. Elle n'induit pas de formation de structures particulières chez la plante hôte et fait intervenir deux types de bactéries PGPR. Tout d'abord des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique, qui sont les bactéries phytostimulatrices (*e.g. Azospirillum*) et stimulent la croissance de la plante hôte via la synthèse de phytohormones et la fixation d'azote atmosphérique. L'autre type de bactérie PGPR est les bactéries phytoprotectrices ou biocontrôles (*Pseudomonas* ou *Bacillus* par exemple) qui augmente la croissance de la plante mais de façon indirecte en la protégeant contre des phytopathogènes et augmentant la solubilité du phosphate. Toutefois de rares souches de *Pseudomonas* peuvent fixer l'azote atmosphérique mais elles représentent une minorité des PGPR biocontrôles.

Pour finir nous parlerons d'une grande classe de symbiose mutualiste qui fait intervenir des champignons mycorhiziens. Il s'agit sans doute de la symbiose la plus répandue dans le règne végétal. Lors de cette synthèse nous ferons la distinction entre les symbioses faisant intervenir des champignons mycorhiziens à arbuscules, puis les symbioses faisant intervenir les champignons mycorhiziens à vésicules. Ces deux types représentent la majorité des symbioses mycorhiziennes.

1) Interactions fixatrices d'azote

La plante interagit fortement avec son environnement biotique *via* la synthèse de métabolites secondaires, le plus souvent « diffusibles ». L'exsudation racinaire modifie donc les propriétés physico-chimiques du sol environnant les racines, appelé rhizosphère (Hiltner, 1904). Cet environnement est donc propice à la survie des micro-organismes autour des plantes car, la plupart du temps, les exsudats incluent ions, enzymes, molécules riches en carbone organique (métabolites primaires et secondaires) qui sont potentiellement source de nutriments pour les organismes telluriques (Bertin *et al.*, 2003). Souvent, les métabolites secondaires exsudés sont source de chimiotactisme permettant la sélection d'organismes (pathogènes, mutualistes ou commensaux) autour des racines. Cet environnement est alors favorable pour l'établissement de diverses interactions en particulier avec des micro-organismes.

Concernant les symbioses, une des symbioses les plus importantes pour les plantes, est la symbiose fixatrice d'azote. Les plantes ne sont capables d'utiliser l'azote que sous forme de nitrate. Ainsi l'azote est un facteur limitant, et un des moyens pour les plantes d'obtenir suffisamment d'azote pour leur développement est de profiter des bactéries, dites nitrifiantes qui métabolisent l'ammonium en nitrate et ainsi, enrichissent l'environnement proche de la racine en azote directement assimilable. Une autre stratégie consiste à s'associer à des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique. Cette propriété est limitée aux seuls procaryotes et elle est largement répandue dans tous les grands phylums bactériens. Ces bactéries possèdent notamment les gènes *nif* (nitrogen fixation) organisés en opéron comprenant *nifH*, *nifD* et *nifK* codant pour les sous-unités de la nitrogénase. Le complexe nitrogénase comprend : (i) la dinitrogénase (protéine I), hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ directement responsable de la réduction de N_2 en NH_3 , (ii) la dinitrogénase réductase (protéine II), homodimère qui assure le transfert des

électrons nécessaires à la réduction de N_2 , d'un donneur à la dinitrogénase. La nitrogénase fonctionnant uniquement en milieu anaérobie, la plante différencie des structures particulières au niveau des racines appelées nodules (*Rhizobia*-légumineuses) ou pseudonodules (Actinoriziennes) ayant une architecture limitant les entrées d'oxygène. Les bactéries fixatrices libres d'azotes, possèdent également les gènes *nif*, et la nitrogénase fonctionne uniquement en milieu microaérobie avec des faibles teneurs en azote. Toutefois, malgré ces traits communs, des divergences peuvent ponctuellement se produire. Ainsi Ribbe *et al.*, (1997) ont montré que la nitrogénase de *Streptomyces thermoautotrophicus*, était capable de fonctionner sous une atmosphère aérobie.

1.1 La symbiose *Rhizobia*-Légumineuse

1.1.1 Généralités

Une des symbioses mutualistes la plus décrite est la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse. Elle autorise l'association durable entre une α -protéobactérie de l'ordre des *Rhizobiales* et une plante dicotylédone de la famille des *Fabaceae*. Cette famille comprend 18 000 espèces réparties dans trois sous-familles (sous-familles des *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée, *Mimosoideae* avec une fleur régulière et des *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon). Les Fabacées, au sens large, sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. C'est une famille cosmopolite des zones froides à tropicales.

Dans le cadre de la symbiose, l'interaction s'établit préférentiellement au niveau des racines et permet la formation d'organes particuliers appelés nodosités où les bactéroïdes réalisent la fixation atmosphérique de l'azote (Figure 3).

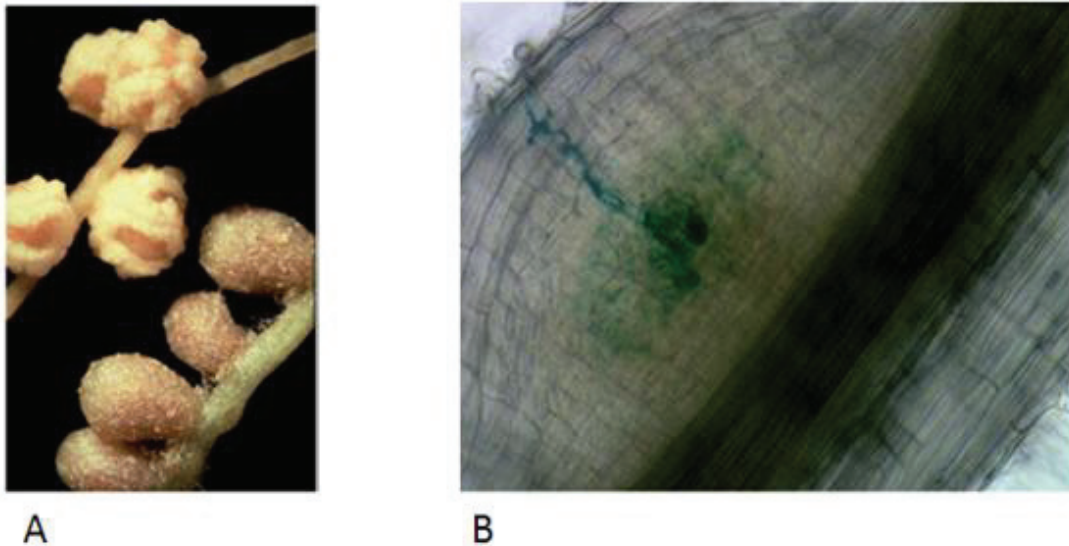


Figure 3: A) Photographie de nodules déterminés sur des racines de *Phaseolus vulgaris* (haut) et nodules indéterminés sur des racines de *Vesce* (bas), B) Photographie au microscope optique d'une section de nodule montrant le tube d'infection sur une racine de *Pois*

Cette symbiose, relativement récente dans l'évolution, dérive d'une ancienne symbiose mycorhizienne qui était répandue dans le règne végétal et permettait à la plante d'obtenir des nutriments phosphatés essentiels (Harrison, 2005). La capacité des *Rhizobia* à coloniser aurait été acquise par un événement de transfert horizontal de gène symbiotique il y a 60 millions d'années, date à laquelle serait apparues des légumineuses dans le monde vivant (Sprenst, 2008).

Les gènes de *Rhizobium*, impliqués dans la symbiose, sont souvent localisés au sein d'îlots chromosomiques ou dans des plasmides comme c'est le cas chez *Sinorhizobium meliloti*. Ainsi, les gènes impliqués dans la synthèse des facteurs de nodulation (*nod*, *dol*, *noe*) et la fixation d'azote (*nif* et *nix*) sont localisés sur le plasmide pSymA (Galibert *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que le transfert horizontal de ces plasmides ou de ces gènes chromosomiques était possible entre espèces de *Rhizobia* (Biondi *et al.*, 2006).

1.1.2 Les Flavonoïdes : molécules signal de la symbiose

Les légumineuses via les racines exsudent dans le sol une grande diversité de métabolites secondaires, dont des flavonoïdes et en particulier des flavones et des iso-

flavonoïdes, dans la rhizosphère. Ces flavonoïdes, quand ils sont reconnus (degré d'oxydation, nature et position des substituants, ...) par les récepteur NodD de la bactérie, régulent l'expression des gènes *nod* (A, B, et C) et la production de facteurs Nod (lipo-chitine-oligosaccharides) (Tableau 1).

Tableau 1: Différents polyphénols induisant l'expression des gènes *nod*. EG : exsudats de graine, ER : Exsudats de racine

Composés	Substitutions							Origine	Souche	Références
	3	4	5	7	3'	4'	5'			
Flavones										
Lutéoline			OH	OH	OH	OH		Luzerne (E.G.)	<i>R. meliloti</i>	(Hartwig <i>et al.</i> , 1990)
Chrysoériol			OH	OH	OCH ₃	OH		Luzerne (E.G.)	<i>R. meliloti</i>	(Hartwig <i>et al.</i> , 1990)
Apigénine			OH	OH	OH			<i>Vicia sativa</i>	<i>R. leguminosarum</i>	(Zaat <i>et al.</i> , 1987)
4',7-dihydroxyflavone				OH		OH		Luzerne (E.R.)	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	(Maxwell <i>et al.</i> , 1989; Guerreiro <i>et al.</i> , 1997)
Flavonols										
Myricétine	OH		OH	OH	OH	OH	OH	Luzerne	<i>R. meliloti</i>	(Peters <i>et al.</i> , 1986)
Myricétine-OGlc	O- Glc		OH	OH	OH	OH	OH	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Quercétine	OH		OH	OH	OH	OH		Luzerne	<i>R. meliloti</i>	(Peters <i>et al.</i> , 1986)
Quercétine -OGlc	O- Glc		OH	OH	OH	OH		<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Kaempférol	OH		OH	OH		OH		<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Kaempférol-OGlc	O- Glc		OH	OH		OH		<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Flavanones										
Eridictyol			OH	OH	OH	OH	OH	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Naringénine			OH	OH		OH		<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Hespéritine			OH	OH	OH	OCH ₃		Luzerne (E.R)	<i>R. meliloti</i>	(Peters et Long, 1988)
Liquiritigénine				OH		OH		Luzerne (E.G.)	<i>R. meliloti</i>	(Maxwell <i>et al.</i> , 1989)
Anthocyanes										
Delpinidine -OGlc	O- Glc		OH	OH	OH	OH	OH	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Petunédine-OGlc	O- Glc		OH	OH	OCH ₃	OH	OH	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Malvidine-OGlc	O- Glc		OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	(Hungria <i>et al.</i> , 1991)
Isoflavones										
Génistéine			OH	OH		OH		Soja (E.R)	<i>B. japonicum</i>	(Kosslak <i>et al.</i> , 1987)
Daidzéine				OH		OH		<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>B. japonicum</i>	(Pueppke <i>et al.</i> , 1998)

Biochanine A	OH	OH	OCH ₃		Soja (E.R)	<i>B. japonicum</i>	(Kosslak <i>et al.</i> , 1993)
Formononetine		OH	OCH ₃		Soja (E.R)	<i>B. japonicum</i>	(Kosslak <i>et al.</i> , 1993)
Formononetine-7-O-Glc		O-Glc	OCH ₃		Luzerne (E.R.)	<i>R. meliloti</i>	(Dakora <i>et al.</i> , 1993)
Formononetine-7-O-(6''-O-malonylglucoside)		Manoyl-glucoside	OCH ₃		Luzerne (E.R.)	<i>R. meliloti</i>	(Dakora <i>et al.</i> , 1993)
7-hydroxyisoflavone		OH	OH		Soja (E.R)	<i>B. japonicum</i>	(Kosslak <i>et al.</i> , 1993)
5,7-dihydroxyisoflavone	OH	OH			Soja (E.R)	<i>B. japonicum</i>	(Kosslak <i>et al.</i> , 1993)
Prunétine	OH	OCH ₃	OH		Soja (E.R)	<i>B. japonicum</i>	(Kosslak <i>et al.</i> , 1993)

Composés	Substitutions				Origine	Souche	Références
	3	2'	4'	5'			
Chalcones							
4,4'-Dihydroxy-2'-methoxychalcone	OH		OH		Luzerne (E.R)	<i>R. meliloti</i>	(Maxwell <i>et al.</i> , 1989)
4,2',4'-trihydroxychalcone	OH	OH	OH		<i>Vicia sativa</i>	<i>R. leguminosarum</i>	(Recourt <i>et al.</i> , 1992)

Les bactéries compatibles sont alors capables de se diriger vers le flux de flavonoïdes par chimiotactisme, ce qui suppose que la spécificité d'hôte s'établit avant le contact physique entre la bactérie et sa plante hôte. Les facteurs Nod, synthétisés par les *Rhizobiaceae*, sont alors spécifiquement reconnus par la plante hôte en fonction de leur structure (longueur et instauration de la chaîne acyle, nombre de monomères de N-acetyl-glucosamine, substituant...)(Gibson *et al.*, 2008) (Figure 4).

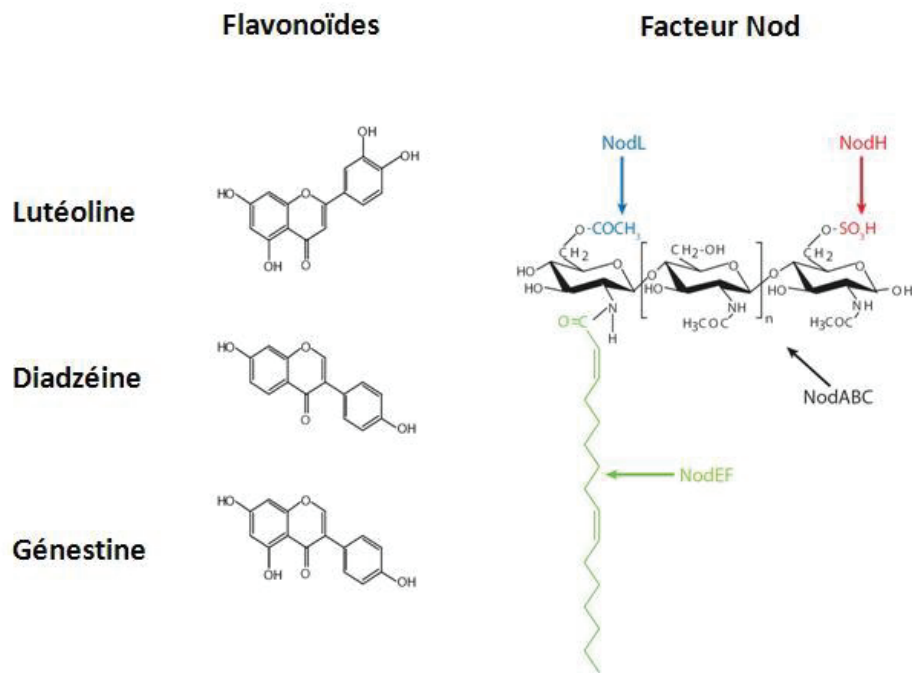


Figure 4:Quelques flavonoïdes impliqués dans l'interaction Rhizobia-légumineuses. Structure des facteurs Nod (adapté de Gibson *et al.*, 2008).

Par ailleurs la spécificité d'interaction dans la symbiose *Rhizobium*/légumineuse est dépendante de la reconnaissance des composés phénoliques inducteurs des gènes *nod*. De ce fait cela conduit à des différences d'effets des composés impliqués. Ainsi, certains flavonoïdes sont connus pour être des inhibiteurs ou des antagonistes d'activateurs de l'expression des gènes *nod* (Peters & Long, 1988), empêchant ainsi la mise en place précoce de l'interaction. Par exemple, la fromonentine a un effet inhibiteur de l'expression des gènes *nod* chez *Rhizobium trifolii* (Djordjevic *et al.*, 1987), alors que ce même composé active l'expression des gènes *nod* de *Bradyrhizobium japonicum*.

1.1.3 Etapes précoces de la symbiose *Rhizobium*/Légumineuses

Pour l'établissement de la symbiose, les *Rhizobia* induisent la formation d'un nouvel organe au niveau de la racine de la plante hôte appelé nodule. Le nodule racinaire est alors le lieu où la prolifération bactérienne est possible, ainsi que la réalisation de la fixation d'azote par ces micro-organismes. La mise en place des nodosités se déroule en trois étapes majeures. En premier lieu, les racines de la plante sécrètent des flavonoïdes (flavones, flavanol, isoflavonoïdes...) dans la rhizosphère. La reconnaissance des flavonoïdes par la protéine NodD des *Rhizobia* va permettre l'activation des gènes de l'opéron *nod*, induisant ainsi la synthèse des facteurs Nod (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Les facteurs Nod induisent la déformation d'un poil absorbant piégeant ainsi les bactéries et permettant le développement du tube d'infection. La spécificité d'interaction se situe principalement à ce niveau de l'interaction car la structure du facteur Nod produit par la bactérie sera reconnue (symbiose) ou non (échec de la symbiose) par la plante (Long, 1996). La deuxième étape est la forte induction de la biosynthèse des facteurs Nod pendant le développement du tube d'infection. L'expression des gènes *nod* à l'intérieur du tube d'infection a été observée dans de nombreuses espèces de *Rhizobia* (Sharma & Signer, 1990). Les bactéries peuvent cheminer à

l'intérieur du tube d'infection et se loger dans le cytoplasme de la cellule hôte par un mécanisme ressemblant à l'endocytose. La présence de flavonoïdes dans les racines semble être essentielle pour stimuler la synthèse de facteurs Nod dans le tube d'infection (Zhang *et al.*, 2009). La présence de facteurs Nod dans la racine augmenterait la biosynthèse de keampférol. La présence localement de ce flavonol inhiberait le transport d'auxine, ce qui faciliterait la division cellulaire et l'initiation du nodule (Figure 5).

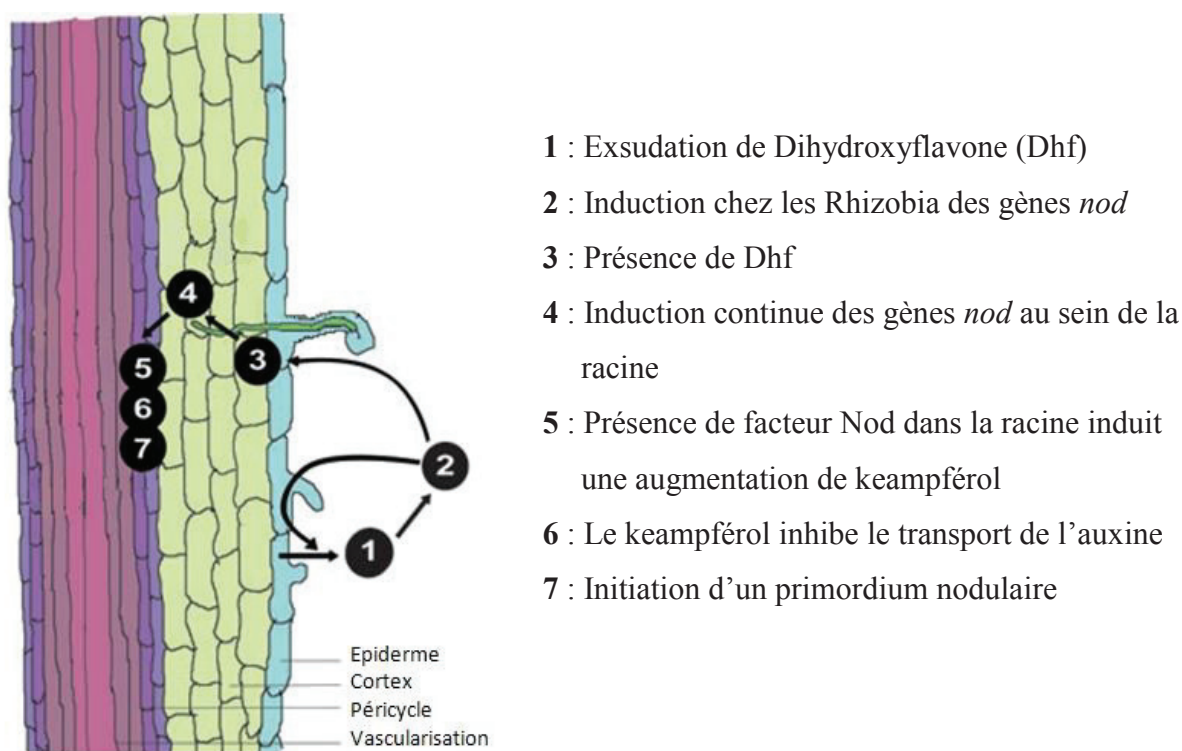


Figure 5: Modèle schématique de la mise en place des nodules chez la Luzerne. Implication des flavonoïdes dans les étapes précoces de l'interaction *S. meliloti*-Luzerne. Dhf : 7,4'-dihydroxyflavone (adapté de (Zhang *et al.*, 2009))

Dès lors, les bactéries se différencient en bactéroïdes et activent leur capacité de fixation de l'azote. Les nodules sont classés en deux types morphologiques basés sur la croissance du méristème. On distingue classiquement les nodules indéterminés et les nodules déterminés. Ces derniers ont une durée de vie courte, prédestinée. Par conséquent, comme la racine grandit dans le sol, de nouveaux nodules sont formés et d'autres sont perdus sur les parties plus vieilles du système racinaire. Le nodule est une élaboration sphérique dans le cortex de la racine. Les nodules indéterminés ont une croissance continue (en théorie) de

plusieurs mois. Le nodule est une structure spécialisée pour favoriser le fonctionnement de la nitrogénase des bactéries. En effet, cette enzyme nécessite de l'ATP, mais est complètement inhibée par l'oxygène. Les plantes ont donc dû évoluer pour élaborer une barrière physique avec l'extérieur (endoderme sclérifié au niveau du nodule), mais produit également dans le nodule de la leghémoglobine, protéine fixatrice d'O₂.

1.1.4 Réponse de la plante aux facteurs de nodulation en termes de métabolites secondaires

1.1.4.1 Réponse au niveau de la synthèse en phénols et polyphénols de la plante hôte

La réponse de la plante aux facteurs de nodulation en termes de métabolites secondaires a été très peu étudiée. Toutefois, il existe des arguments en faveur d'un effet de la symbiose *Rhizobium*/légumineuse sur la modification de la synthèse de la plante en métabolites secondaires. L'inoculation de *Bradyrhizobium japonicum* sur le soja induit des modifications d'expression de la phénylalanine amonialiase (PAL) et de la chalcone synthase (CHS), qui sont les principales enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (PHP), voie majeure dans l'élaboration des métabolites secondaires phénoliques (Estabrook & Sengupta-Gopalan, 1991). La PAL est l'enzyme permettant, entre autres, de synthétiser des composés tels que les phénols et polyphénols comme les flavonoïdes, mais également les chalcones par le biais de la CHS. De plus, l'inoculation de facteurs Nod sur des suspensions de calls de *Medicago sativa* peut induire l'expression de l'IFR (IsoFlavone Réductase), enzyme qui est une enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes (Savouré *et al.*, 1994). Cette induction d'enzymes de la voie des PHP indique la possibilité qu'a la plante de synthétiser, en réponse à la perception de molécules signal comme les facteurs Nod ou bien des *Rhizobiae*, de nombreux métabolites secondaires notamment activés (feruloly CoA, sinapoyl CoA...). Donc potentiellement, la surexpression des enzymes de la voie des PHP induite par les facteurs

Nod, peut provoquer une augmentation de synthèse de composés phénoliques et notamment, les composés tels que les flavonoïdes. Ainsi, il est possible que la présence de facteurs Nod dans l'environnement de la plante induise un rétrocontrôle positif par la plante de son infection par des *Rhizobia*. Par ailleurs, des études réalisées sur la symbiose *Arachis hypogaea* L./ *Rhizobium* spp. (*Rhizobium* isolé de l'arachide) se sont attachées à évaluer les différences observables entre la synthèse en composés phénoliques de plants inoculés et de plants non inoculés (Charitha Devi & Reddy, 2002). Les résultats de cette étude montrent, qu'outre le fait que le contenu phénolique total ($\mu\text{g/g}$ de matière fraîche) augmente dans les plants inoculés, des différences en termes qualitatifs et quantitatifs sont pointées et ce, au cours du temps. En condition inoculée, la plante augmente spécifiquement sa synthèse d'acides hydroxycinnamiques et d'acides hydroxybenzoïques, tels que les acides *trans* et *cis* caféique, l'acide chlorogénique, l'acide *p*-coumarique, les acides *trans* et *cis* férulique, l'acide vanillique. D'autres composés voient leur synthèse non affectée, voire diminuée, en présence de *Rhizobium* comme l'acide *p*-hydroxybenzoïque (Tableau 2).

Tableau 2: Tableau représentant les variations observées sur les composés phénoliques racinaires de l'Arachide en condition inoculée avec *Rhizobium* sur un suivi de 6 semaines après inoculation. (+ et - représentent l'augmentation ou l'absence de variation par rapport au Témoin (non inoculé)). Adapté de Charitha Devi & Reddy, 2002.

Composés	2 semaines	2,5 semaines	6,5 semaines
Acide <i>trans</i> caféique	+10, 59	+ 32,97	+6,20
Acide <i>cis</i> caféique	+100,00	+33,33	+25,00
Acide protocatéchique	-	+99,95	+33,33
Acide chlorogénique	+66,67	+60,00	+66,67
Acide <i>trans-p</i> -coumarique	+33,33	+200,00	+233,25
Acide <i>cis-p</i> -coumarique	+99,99	+37,50	+25,00
Acide <i>p</i> hydroxybenzoïque	+83,33	+60,00	+99,99
Acide <i>trans</i> férulique	+99,99	+116,61	+37,50
Acide <i>cis</i> férulique	+166,67	+37,50	+60,0
Acide vanillique	+116,67	+116,61	+100,00

D'autres auteurs, (Chakraborty & Mandal, 2008; Mandal *et al.*, 2009) ont fait des études sur les composés présents dans les nodules formés par *Rhizobium* sur l'Arachide et montrent, sans ambiguïté, que le contenu en composés phénoliques totaux, à l'intérieur du nodule, est 1,6 fois supérieur à celui des racines non nodulées.

D'autres ont montré que dans les plants de luzerne inoculés par *Rhizobium meliloti*, trois isoflavonoïdes (l'aglycone et le glucoside de la médicarpine, ainsi que le glycoside de la formononétine) étaient retrouvés alors qu'ils n'étaient pas présents dans les plants non inoculés (Dakora *et al.*, 1993). Parmi ces composés, seul, le glycoside de la formononétine est capable d'induire les facteurs Nod chez *Rhizobium meliloti*. De plus, une étude récente effectuée sur les exsudats de haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) en conditions non inoculée et inoculée avec une souche de *Rhizobium tropici* CIAT899, montre que la synthèse en flavonoïdes est fortement affectée par la bactérie (Dardanelli *et al.*, 2008). Au temps de collection 4 jours après inoculation, le taux de pinocembrine, d'apigénine d'hésperétine est détectable dans les exsudats de plants non-inoculés. Alors que dans les plants inoculés avec *Rhizobium tropici* CIAT899, ces composés ne sont plus détectables. Au contraire, alors que la morine n'est pas présente dans les exsudats de plants non inoculés, elle se retrouve dans les plants inoculés avec la souche de *Rhizobium*. 14 jours après inoculation, les exsudats de Pois ne présentent plus aucun des flavonoïdes étudiés.

Une étude effectuée sur le pouvoir activateur des gènes *nod* de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* de l'hésperétine montre que, même à faible concentration, ce flavonoïde empêche l'expression des gènes de nodulation (Novak *et al.*, 2002). Une répression de la synthèse de ce flavonoïde au niveau des plants nodulés pourrait être en faveur d'une régulation positive du taux de nodulation chez la plante. Il est reconnu également que l'apigénine est un facteur stimulant l'expression des gènes *nod* (Rolfe, 1988).

Ces études démontrent que la plante est très réactive à son environnement et qu'elle est très sensible aux changements biotiques de l'écosystème. Un changement dans la synthèse des flavonoïdes exsudés par la plante en condition inoculée pourrait être en faveur d'un mécanisme de régulation de la nodulation des plants en symbiose avec des *Rhizobia*, permettant de limiter ou induire la nodulation des racines.

1.1.4.2 Impact des facteurs Nod sur la synthèse en composés volatils de la plante hôte

Les modifications provoquées par l'inoculation d'oligosaccharides microbiens chez une légumineuse comme *Medicago truncatula* sur sa synthèse en composés volatils ont été évaluées par chromatographie gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) (Leitner *et al.*, 2008). Différents types d'oligosaccharides sont inoculés et les modifications obtenues sur le métabolisme secondaire de la plante sont observées. Deux facteurs Nod, impliqués dans la symbiose *Sinorhizobium meliloti* / *Medicago truncatula*, sont testés (2 molécules partageant une chaîne d'acide gras en C16:2, avec un groupe sulfate pour l'une des deux). La présence de ces deux types de facteurs Nod au niveau de la plante induit de forts changements au niveau de la quantité de composés volatils émis par la plante. En effet, différentes familles de molécules ont leurs synthèses affectées en réponse à ces deux types de molécules. En premier lieu, les alcanes et alcènes, avec une synthèse différentielle de composés comme le *n*-tétradécane et 1-tétradécène, des aldéhydes avec une induction de la synthèse de *n*-octanal, des sesquiterpènes avec une augmentation spécifique de la synthèse de géranylacétone, mais également de ϵ -nerolidol, γ -himachalène, α -ylangène, le cyclosativène..., et un homo-sesquiterpène indéterminé (Figure 6).

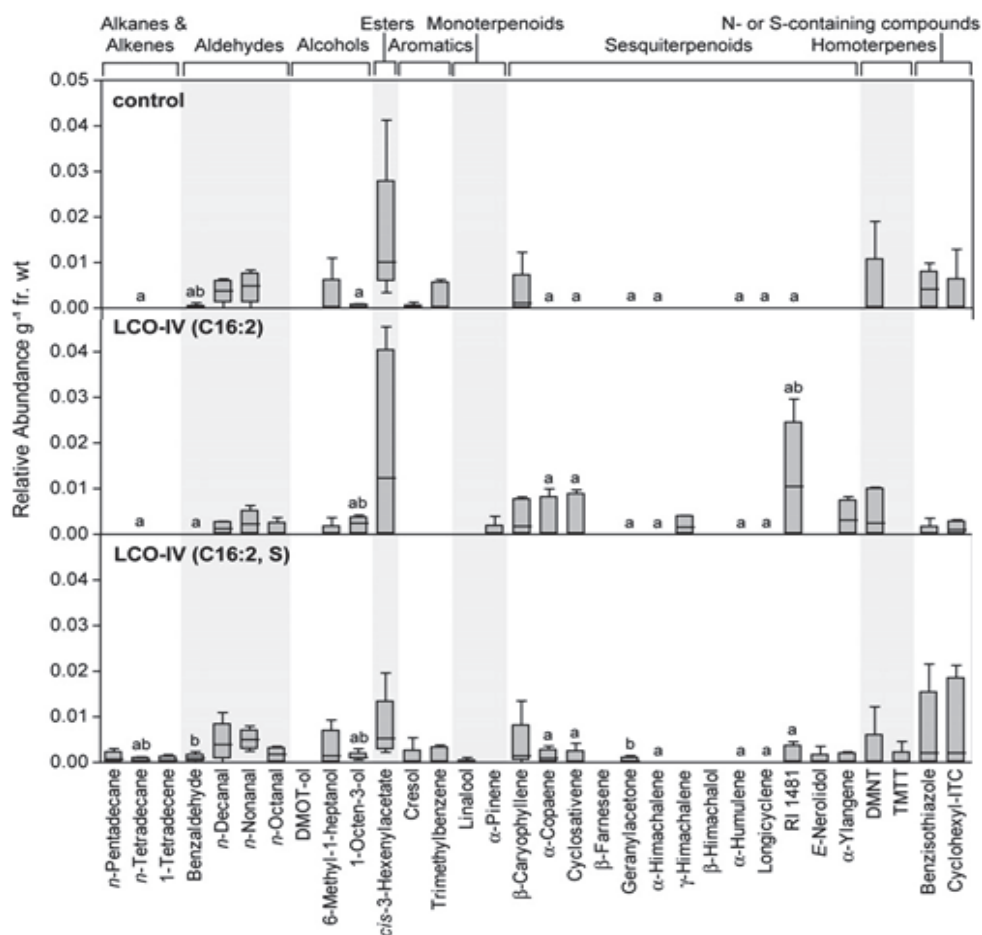


Figure 6: Variations qualitatives et quantitatives des composés volatils détectés sur des plantes induites par deux facteurs Nod différant par un groupe sulfate. Les lettres différentes indiquent des différences significatives avec le témoin non inoculé.

1.1.5 Impact écologique des acides phénoliques dans les interactions

Rhizobium/Légumineuses

Nous avons vu précédemment que la synthèse de la plante en métabolites secondaires est très réactive car de nombreux composés voient leur concentration augmentée ou diminuée en condition inoculée. Nous pouvons dès lors nous demander quel est le rôle écologique de ces modifications. En effet, les plantes peuvent par diffusion exsuder les composés phénoliques dans la rhizosphère et ainsi entrer en contact avec les micro-organismes du sol. Une grande partie de ces composés sont souvent synthétisés par la plante en réponse à un stress, qu'il soit biotique ou abiotique (Nicholson & Hammerschmidt, 1992 ; Kutchan, 2001).

Certaines souches de *Bradyrhizobium* ont la capacité de métaboliser un grand nombre d'acides phénoliques comme le 4-hydroxybenzoate, l'acide vanillique, l'acide caféique et l'acide paracoumarique, qui font partie des phénols les plus représentés dans le monde végétal (Van Rossum *et al.*, 1995). Par ailleurs, il a été montré que *Rhizobium loti* nodulant *L. subbiflorus* était capable d'utiliser comme source de carbone, l'acide ferulique ainsi que l'acide paracoumarique. De plus, la synthèse par la plante hôte de ces composés, avec également les flavonoïdes, induisent un chimiotactisme positif chez *Rhizobium* et permettent d'autre part d'induire les facteurs Nod (Prinsen *et al.*, 1991). Le fait que la plante augmente la synthèse de ce type de composé lors de la symbiose *Rhizobia*/Légumineuse laisse supposer que ces composés peuvent être utilisés par la plante pour sélectionner les micro-organismes présents autour de ces racines et ainsi favoriser les bactéries qui ont su s'adapter à ces molécules présentant des toxicités avérées. D'autre part, la modification spécifique de synthèse de ces composés phénoliques résulte probablement d'un mécanisme de coévolution des *Rhizobia* et de leur plante hôte de manière à fournir un avantage sélectif aux bactéries pour la mise en place de nouvelles nodulations au niveau des racines.

1.2 La symbiose actinorhizienne.

1.2.1 Généralités et mise en place de l'interaction

Une deuxième grande symbiose racinaire fixatrice d'azote est la symbiose actinorhizienne. Cette symbiose associe des bactéries filamenteuses du sol, les actinomycètes du genre *Frankia*, à des angiospermes dicotylédones, les plantes actinorhiziennes. Les plantes actinorhiziennes appartiennent à 8 familles d'angiospermes dicotylédones (*Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Elaeagnaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* et *Rosaceae*) parmi lesquelles on compte 25 genres et plus de 200 espèces actinorhiziennes, dont le filao (*Casuarina equisetifolia*), l'aulne (*Alnus* sp), l'olivier de Bohême (*Elaeagnus*

angustifolia) et le myrte des marais (*Myrica gale*). Leur répartition géographique est très large et regroupe divers habitats comme la toundra arctique, les dunes côtières, les forêts tropicales ou tempérées.

Les bactéries du genre *Frankia*, appartenant à la famille des *Frankiaceae*, sont des bactéries filamenteuses, microaérophiles ou aérobies et, pour la plupart, fixatrices d'azote à l'état libre et symbiotique (Normand *et al.*, 1988). Morphologiquement, *Frankia* se différencie en plusieurs structures spécialisées : les hyphes, impliqués dans le premier stade de la symbiose à partir desquels deux autres structures peuvent se différencier : les sporanges donnant naissance à des spores, et les vésicules présentes en condition de carence azotée, qui sont le lieu privilégié de la fixation d'azote (Sasakawa *et al.*, 1988). Phylogénétiquement, les souches de *Frankia* peuvent être divisées en 3 clusters majeurs sur la base de leur séquence 16S (Normand *et al.*, 1996). Les différentes souches possèdent donc des spécificités d'hôte bien particulières, ce qui permet de distinguer des souches compatibles et incompatibles d'une espèce de plante (Huguet *et al.*, 2005).

A l'instar de la symbiose Rhizobium/légumineuses, la bactérie peut pénétrer les racines de la plante hôte grâce au facteur Had (Hair deforming) qui est similaire au facteur Nod de rhizobium, mais dont la structure n'est pas encore à ce jour élucidée pour *Frankia*, induisant la déformation des poils absorbants (Cérémonie *et al.*, 1999). Ce facteur Had serait constitutif ou inductible par la plante hôte (par la synthèse de composés comme les myrigalones) alors que pour les *Rhizobia*, le facteur Nod est inductible par les métabolites secondaire végétaux et en particulier les flavonoïdes (Prinsen *et al.*, 1991).

1.2.2 Impact de *Frankia* sur les métabolites secondaires de la plante hôte

Tout comme pour la symbiose *Rhizobia*/Légumineuse, même si les symbioses actinorhiziennes sont bien étudiées du point de vue de la biologie moléculaire, très peu

d'études se sont intéressées à l'impact de la symbiose sur les métabolites secondaires de la plante hôte. Toutefois, Hammad *et al.*, (2003) ont mis en évidence l'activation des gènes végétaux *pal* et *chs* lors de la symbiose entre *Frankia* et l'Aulne, gènes responsables de la production des acides hydroxycinnamiques et des chalcones respectivement. L'unique étude visant à déterminer la réponse de la plante hôte à l'inoculation de souches compatibles (établissement de la symbiose) et incompatibles (pas d'établissement de la symbiose) a été réalisée sur le modèle *Frankia/Myricaceae* (Popovici *et al.* en préparation).

Deux souches de *Frankia* (Ea112 compatible avec *Morella cerifera* et la souche ACN14a compatible avec *Myrica gale* et *Morella cerifera*) sont introduites en simple inoculation sur les deux plantes hôtes. Les extraits racinaires sont réalisés 2 jours et 15 jours après inoculation. L'analyse des extraits montrent indéniablement des variations quantitatives de certains métabolites secondaires des *Myricaceae* (Tableau 3) appartenant aux composés phénoliques, dont les structures ont été proposées (Figure 7).

Tableau 3: Principaux pics discriminant les inoculations. a longueur d'onde (nm), b P: phénols; F: flavonoïdes; HCA: acide hydroxycinnamique. sh: épaulement. ND non déterminé, c Ions spécifiques positif et négatifs

<i>M. cerifera</i>					<i>M. gale</i>			
	UV spectra ^a	Mass Spectra	Compound family ^b		UV spectra	Mass Spectra ^c	Compound family ^b	
<u>Peaks equally affected by both strains</u>								
	n°				n°			
<u>increased</u>	C1	280	ND	P	G3	274,358	655 [M+Na] ⁺ , 633 [M+H] ⁺ 631 [M-H] ⁻	F
	C2	276	ND	P	G4	260,356	487 [M+Na] ⁺ , 465 [M+H] ⁺ , 303 [M-hexose+H] ⁺ 463 [M-H] ⁻ , 301[M-hexose-H] ⁻	F
	C3	288,340	ND	F	G6	280,375	ND	F
<u>decreased</u>	C4	sh298,324	ND	HCA	G2	260,368	ND	F
<u>Peaks increased with ACN14a</u>					G1	284	379 [M+Na] ⁺ , 357 [M+H] ⁺ , 195 [M-hexose+H] ⁺ 355 [M-H] ⁺ , 193 [M-hexose-H] ⁻	P
				G5	285,332	435 [M+H] ⁺ , 273 [M-hexose+H] ⁺ 433 [M-H] ⁻	F	
				G10	sh300,322	ND	HCA	
<u>Peaks increased with Ea112</u>					G7	sh298,328	327 [M+Na] ⁺ , 305 [M+H] ⁺	HCA
				G8	sh300,324	411 [M+Na] ⁺ , 389 [M+H] ⁺ , 371 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 149	HCA	
				G9	sh300,324	493 [M+Na] ⁺ , 471 [M+H] ⁺ 469 [M-H] ⁻	HCA	

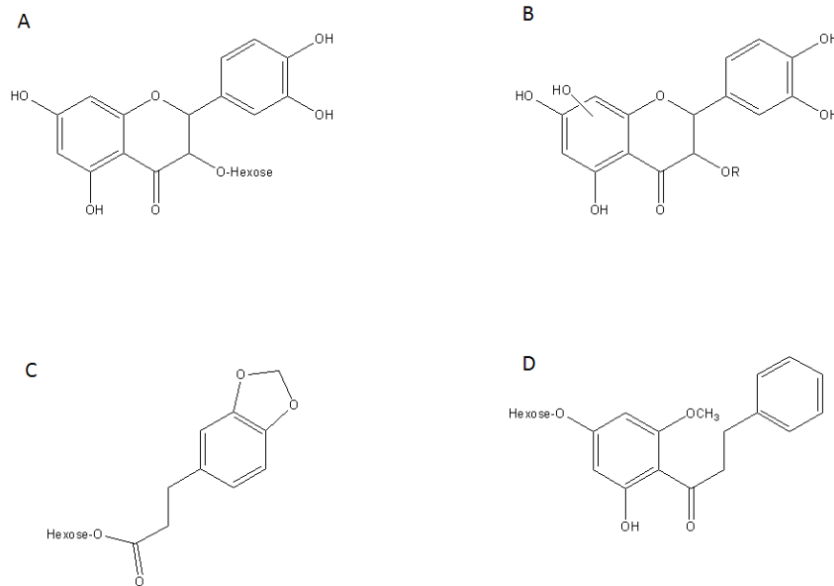


Figure 7: Structures proposées pour les composés racinaires de *M. gale* affectés par l'inoculation avec des souches de *Frankia*, basées sur les spectres UV et de masse. A: molécule G4, B: molécule G3, C: molécule G1, D: molécule G5 (tableau 3)

La spécificité d'interaction semble ici être reliée à la synthèse de métabolites secondaires phénoliques de type flavonoïdes.

1.2.3 Rôle écologique des phénylpropanoïdes dans la symbiose Actinorhizienne

Un grand nombre de molécules du type acide hydroxycinnamique voient leur synthèse modifiée (augmentation ou diminution en fonction des souches inoculées). La diminution des HCA dans la symbiose *Frankia/ Myrica gale* (cas de la souche ACN14a) pourrait être reliée à la modification de la lignine dans la voie de biosynthèse de ces molécules. La modification de la biosynthèse de la lignine est un mécanisme classique permettant à la plante de réguler la pénétration des bactéries dans ses tissus (Huckelhoven, 2007). Cette diminution de biosynthèse des HCA permettrait donc de faciliter la colonisation des tissus de la plante hôte par *Frankia*. Au contraire, la souche incompatible Ea112 induit une augmentation de ces HCA limitant ou empêchant la symbiose avec *Myrica gale*. Par ailleurs, la synthèse différentielle de certains flavonoïdes, composés souvent impliqués dans les mécanismes de

défense des plantes mais aussi indispensables pour la symbiose *Rhizobium*/Légumineuse, pourrait être le résultat d'un mécanisme de coadaptation au cours de l'évolution des partenaires de la symbiose actinorhizienne.

2) Cas particulier des symbioses associatives

Parmi les symbioses mutualistes fixatrices d'azote, nous pouvons faire une distinction entre différentes classes d'interaction. Alors que dans la plupart des interactions mutualistes, la symbiose se caractérise par la formation de structures spécialisées, comme c'est le cas pour les symbioses *Rhizobium*/Légumineuses et Actinorhiziennes avec la formation de nodules et pseudonodules, un autre type de bactérie est capable d'entrer en symbiose mutualiste avec sa plante hôte sans formation de ces structures spécialisées. Les bactéries établissant ce type de symbiose (symbiose associative), sont dites PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Les bactéries PGPR sont principalement représentées par les genres *Pseudomonas* et *Azospirillum*. Elles appartiennent respectivement aux γ -protéobactéries et α -protéobactéries. Toutefois, une distinction a été faite pour caractériser deux phénomènes. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont dites agents de biocontrôle car elles ont la capacité d'inhiber la croissance de certains pathogènes des plantes, via différents mécanismes comme la synthèse de sidérophores qui induit une compétition entre les différents micro-organismes de la rhizosphère pour la ressource en fer. De plus, ces bactéries sont capables de synthétiser des antibiotiques comme le 1,4-diacylphloroglucinol (DAPG) et ainsi limiter la croissance d'autres organismes (Raaijmakers *et al.* 2009 ; Richardson *et al.* 2009). Au contraire, les bactéries du genre *Azospirillum* sont des bactéries dites phytostimulatrices car elles peuvent fixer l'azote atmosphérique et le transférer sous des formes assimilables pour la plante, mais elles peuvent également synthétiser des auxines comme l'acide indole acétique et ainsi stimuler la croissance de la plante hôte (Bashan *et al.* 2004 ; Dobbelaere *et al.* 2003). Ces

bactéries ont des larges spectres d'hôtes allant des plantes monocotylédones aux plantes dicotylédones, même si une affinité d'interaction est détectable au niveau de l'efficacité de la promotion de la croissance racinaire et aérienne.

2.1 Mise en place de la symbiose associative

2.1.1 Reconnaissance des bactéries PGPR par la plante hôte

2.1.1.1 Perception du genre *Pseudomonas*

Les bactéries PGPR sont des bactéries rhizosphériques dont l'écosystème est constitué de la racine de la plante hôte, des mucilages, des composés exsudés par la plante, du sol environnant les racines et directement sous son influence, mais également des autres organismes du sol. Parmi les composés exsudés par le blé par exemple, de nombreux acides organiques sont retrouvés tels que les acides fumarique et succinique, des acides aminés ainsi que des sucres simples comme le fructose et le maltose, mais également des oligosaccharides (Rovira, 1969). Il a été montré que les premiers substrats utilisés par les PGPR du genre *Pseudomonas* sont des sucres simples, des acides organiques et des acides aminés, ce qui explique un fort chimiotactisme vers les racines des plantes (Lugtenberg *et al.*, 2002; Preston, 2004). La perception de la bactérie par la plante hôte n'est pas un mécanisme complètement élucidé. Deux molécules bactériennes sont à la base de la reconnaissance de la bactérie par la plante. En effet, la flagelline (peptide Flg22) qui est une sous-unité du flagelle polaire des *Pseudomonas* est reconnue par la plante grâce à une protéine kinase associée à la membrane. Toutefois, cette protéine kinase est habituellement une structure permettant à la plante de reconnaître les pathogènes et de mettre en place une cascade de réactions afin de se défendre. De plus, la reconnaissance de la flagelline est un mécanisme hôte et souche spécifique (Gómez-Gómez & Boller, 2002). L'autre type de molécule permettant la reconnaissance spécifique des bactéries sont les lipopolysaccharide (LPS). La reconnaissance des LPS a été

principalement étudiée dans la cadre de la reconnaissance de pathogènes, mais cela s'applique également pour les *Pseudomonas* PGPR. En effet, si la reconnaissance de certains pathogènes se fait par rapport à la structure du LPS et permet la libération par la plante de composés antimicrobiens (Dangl & Jones 2001), la reconnaissance spécifique de *Pseudomonas* PGPR se fait également grâce au LPS sans induction de la réponse hypersensible (HR). Il est capable en revanche d'induire une résistance locale induite (LIR), ainsi qu'une réponse systémique induite (ISR), permettant à la bactérie de coloniser la plante tout en la protégeant contre d'éventuels pathogènes. De plus, le DAPG produit par ces mêmes bactéries est également capable d'induire l'ISR chez la plante (Jourdan *et al.*, 2008).

2.1.1.2 Perception du genre *Azospirillum*

La colonisation des racines des plantes par *Azospirillum* commence, tout comme pour les *Pseudomonas*, par un chimiotactisme positif des bactéries vers les racines pour les mêmes raisons (sources de carbone importantes, nécessaires pour la croissance et la fixation d'azote atmosphérique). *Azospirillum* présente également un chimiotactisme positif (basé sur un gradient de concentration) pour les sucres, les acides organiques et les acides aminés qui sont exsudés par les racines (Okon *et al.*, 1980). Ce phénomène de chimiotactisme permet aux deux partenaires de se rencontrer. Les étapes suivantes menant à la mise en place de la symbiose ne sont pas bien connues. La bactérie va adhérer à la racine de la plante hôte grâce à sa membrane externe, les LPS, les exopolysaccharides, les protéines membranaires (Michiels *et al.*, 1991; Yegorenkova *et al.*, 2001). Du côté de la plante, les mucilages, les polysaccharides, et les protéines de surface (lectines) sont également impliqués dans la reconnaissance (Mora *et al.*, 2008). Une fois reconnues, les bactéries adhèrent à la surface racinaire et colonisent les espaces intercellulaires du cortex de la racine. Les sites

d'attachement préférentiels des bactéries sur la racine se situent au niveau de la zone d'élongation et les poils absorbants (Bashan & Holguin, 1997).

2.1.2 Mécanismes de protection et de promotion de la croissance de la plante hôte

2.1.2.1. Mécanismes de protection par les bactéries phytoprotectrices

Les bactéries PGPR du genre *Pseudomonas* sont dites agents de biocontrôles car elles confèrent à leur plante hôte une protection contre divers phytopathogènes. Cette protection induite par les *Pseudomonas fluorescens* à la plante hôte est dépendante de trois mécanismes majeurs qui sont la rhizocompétence, l'antibiose et la stimulation de la défense des plantes.

La rhizocompétence est définie comme étant la capacité d'une souche à coloniser plus ou moins efficacement la rhizosphère. Cette rhizocompétence implique que la souche bactérienne ou fongique ait la capacité de coloniser de façon efficace la racine par différents moyens tels que la présence de flagelles, la présence de LPS de surface impliqués dans la reconnaissance plante/bactérie... D'autre part, la rhizocompétence implique également que le micro-organisme soit bien adapté à l'utilisation des composés exsudés par la plante (sucres, acides carboxyliques, certains acides aminés...). Par ailleurs, une compétition pour les ressources trophiques explique également une importante adaptation et ceci est étudié pour la compétition pour les ressources en fer grâce à un système spécifique de sidérophores (Kloepper *et al.* 1980; Cornelis & Matthijs, 2002). Cet élément est indispensable au métabolisme des organismes aérobies. Toutefois ces capacités ne sont pas limitées aux souches biocontrôles et peuvent être retrouvées chez les micro-organismes pathogènes des plantes (*Agrobacterium tumefaciens*, *Dickeya dadantii* anciennement *Erwinia chrysanthemi*...).

L'antibiose quant à elle implique principalement la synthèse de composés antimicrobiens par les bactéries du genre *Pseudomonas*. Un grand nombre de métabolites

bactériens, synthétisés par *Pseudomonas* (phenazines, DAPG, pyolutéoline, pyrrolnitrine...), ont été détectés et quantifiés dans la rhizosphère et sont décrits comme ayant des propriétés antimicrobiennes (Raaijmakers *et al.*, 1999). D'autre part, certains composés volatils (HCN) émis par les bactéries du genre *Pseudomonas* ont des effets antibiotiques et jouent un rôle dans la protection de la plante hôte (Voisard *et al.*, 1989).

Enfin, la résistance des plantes contre des pathogènes est essentiellement due à deux voies de signalisation. La première est la SAR dont la molécule signal est l'acide salicylique. Lors d'une infection par un pathogène (virus, bactéries ou champignon), la plante répond en augmentant la production d'acide salicylique au niveau du site d'infection aussi bien que dans la plante entière. Dans certains modèles plante/pathogènes, l'acide salicylique, apporté de façon exogène par des *Pseudomonas* fluorescents, a conféré une protection contre les pathogènes (Maurhofer *et al.*, 1998).

La deuxième voie de défense des plantes implique le jasmonate comme molécule signal et est appelée ISR. Ce mécanisme peut être activé par certaines bactéries rhizosphériques non pathogènes principalement par la présence de déterminants enchâssés dans leur paroi et synthétisent des molécules diffusibles qui sont perçues par la plante et induisent un mécanisme de résistance (Tableau 4).

Tableau 4: Déterminants des *Pseudomonas* induisant de l'ISR (adapté de Bakker *et al.*, 2007)

Déterminants	Souche bactérienne	Plante hôte	Références
Lipopolisaccharides	<i>P. fluorescens</i> WC374	Radis	(Leeman <i>et al.</i> , 1995)
	<i>P. fluorescens</i> WC417	<i>Arabidopsis</i>	(Van Wees <i>et al.</i> , 1997)
		Radis	(Leeman <i>et al.</i> , 1995)
		Céillet	(Van Peer & Schippers, 1992)
Sidérophores	<i>P. fluorescens</i> CHA0	Tabac	(Maurhofer <i>et al.</i> , 1994)
	<i>P. fluorescens</i> WC374	Radis	(Leeman <i>et al.</i> , 1996)
Acide salicylique	<i>P. fluorescens</i> P3 pchBA	Tabac	(Maurhofer <i>et al.</i> , 1998)

Déterminants	Souche bactérienne	Plante hôte	Références
DAPG	<i>P. fluorescens</i> CHA0	<i>Arabidopsis</i>	(Iavicoli <i>et al.</i> , 2003)
		Tomate	(Siddiqui & Shahid Shaukat, 2003)
	<i>P. fluorescens</i> Q2-87	<i>Arabidopsis</i>	(Weller <i>et al.</i> , 2004)

Toutefois, certaines souches de *Pseudomonas* possèdent le gène de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) qui est impliqué dans l'amélioration de la croissance de la plante hôte (Glick *et al.*, 1998). Cette enzyme peut cliver le précurseur de l'éthylène l'ACC et donc ainsi réduire le taux d'éthylène dans la plante. L'éthylène est une phytohormone qui inhibe la croissance racinaire, et sa diminution, grâce à l'ACC désaminase, permet d'observer une elongation racinaire (Figure 8)

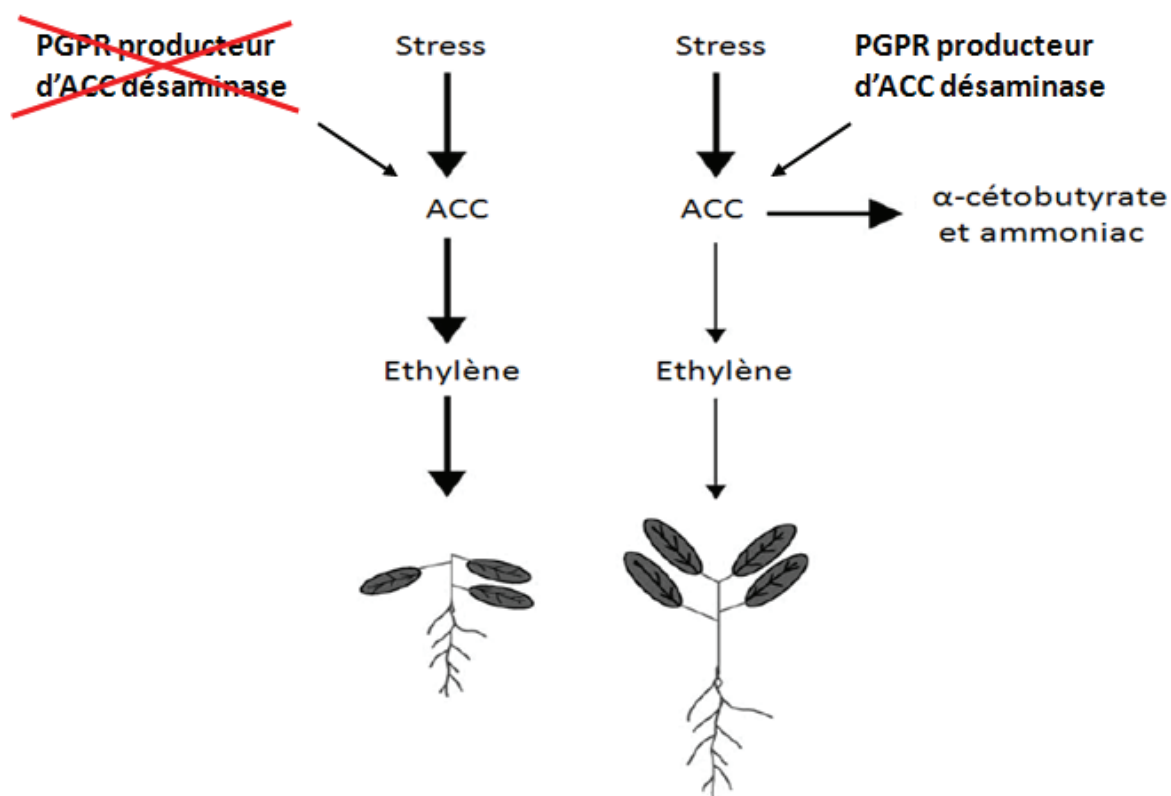


Figure 8: Représentation schématique de l'effet de l'absence (gauche) ou de la présence (droite) de PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique). La taille des flèches indique le degré relatif du flux. (Adapté de Glick *et al.*, 2004)

2.1.2.2 Mécanismes de phytostimulation

Le mécanisme d'action des bactéries du genre *Azospirillum* est différent. Une fois la colonisation microbienne des racines de la plante hôte effectuée, la promotion de la croissance est régie par différents mécanismes. Ces bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique et le transférer à la plante hôte sous des formes assimilables. De plus, elles peuvent synthétiser des hormones végétales (auxines (AIA, AIB), gibberelines cytokinines) (Steenhoudt & Vanderleyden 2000). De fait, une interaction avec des PGPR du genre *Azospirillum* permet à la plante une nutrition minérale améliorée car son système racinaire est plus développé et permet un recrutement des nutriments plus important (Fages, 1994).

2.2 Impact des bactéries PGPR sur le métabolisme de la plante hôte

2.2.1 Impact des PGPR biocontrôles sur la plante hôte

Concernant l'impact des bactéries PGPR biocontrôles sur l'expression métabolique de la plante hôte, peu de données sont disponibles aujourd'hui. Outre l'induction de l'ISR et des composés liés à cette résistance (acide jasmonique, éthylène...), l'inoculation des plants par des PGPR biocontrôles peut modifier la synthèse métabolique de la plante hôte. Des études réalisées sur le pois chiche (*Cicer arietinum*) montrent qu'en condition inoculée avec la souche *Pseudomonas fluorescens* Pf4 et la souche *P. aeruginosa* Pag, une modification du contenu de la plante, au niveau des ses molécules phénoliques totales, est observée. Une augmentation du contenu phénolique total dans les feuilles de pois chiche est notée dès 3 semaines après l'inoculation avec un maximum après 4 semaines. Cette même variation est observable sur différentes parties de la plante, que ce soit au niveau des feuilles, des racines ou du collet. Plus précisément, la plante inoculée montre spécifiquement des concentrations en acide férulique plus importantes que dans les plants Témoins 3 semaines après inoculation.

La concentration en acide cinnamique devient détectable uniquement au niveau des racines et de feuilles des plants inoculés (Singh *et al.*, 2003). Par ailleurs, une inoculation du bétel (*Piper betle* L.) par une autre PGPR biocontrôle, *Serratia marcescens* NBRI1213 montre une modulation de la synthèse d'acides phénoliques. La synthèse de l'acide protocatéchique diminue de 50 % et celle de l'acide ellagique de 40 % dans les feuilles avec disparition dans les racines par rapport aux plantes non inoculées. La plante synthétise spécifiquement de l'acide chlorogénique en condition inoculée et la synthèse d'acide férulique augmente spécifiquement dans les racines (Lavania *et al.*, 2006). Ces variations peuvent être mises en rapport avec la défense et la protection de la plante par les PGPR biocontrôles puisque ces composés ont été largement décrits comme des composés antifongiques et pouvant induire l'ISR.

2.2.2 Impact des PGPR phytostimulatrices sur la plante hôte

Concernant l'impact des bactéries PGPR phytostimulatrices sur le métabolisme de la plante hôte, peu de choses sont connues. Toutefois, l'inoculation de *Burkholderia phytofirmans* PsJN sur la vigne, permet d'observer une augmentation du contenu total en phénols dans la plante entière. Par ailleurs, cette souche induit également une augmentation du contenu en proline libre dans les tissus de la plante hôte (Ait Barka *et al.*, 2006).

La présence d'*Azospirillum brasilense* Cd sur *Phaseolus vulgaris* induit une synthèse d'un flavonoïde particulier, la naringénine, et cela dès le quatrième jour après l'inoculation (Dardanelli *et al.*, 2008). Ces observations n'ont toutefois pas fait l'objet d'interprétations en ce qui concerne la corrélation entre l'accumulation de ce flavonoïde et son rôle physiologique au niveau de la plante.

2.3 Impacts écologiques des modifications métaboliques

Nous avons vu précédemment que les composés les plus influencés par l'inoculation de bactéries PGPR sont des composés appartenant à la voie des phénylpropanoïdes. Malgré tout, il semblerait également que l'interaction entre la plante et ces bactéries se traduise, dans certains cas, par la modification de la synthèse de certains acides aminés. La plupart des acides phénoliques sont impliqués dans des mécanismes de défense des plantes. Ainsi l'acide férulique dès 250µg/ml est capable d'inhiber la croissance radiale du champignon *Sclerotium rolfsii*, pathogène du pois chiche (Sarma & Singh, 2003). Les acides cinnamiques impliqués dans les interactions plantes/bactéries PGPR peuvent se retrouver dans la rhizosphère car ces composés sont facilement diffusibles. Une augmentation de concentration de ces molécules dans la rhizosphère modifie les propriétés physicochimiques du sol avoisinant les racines des plantes. Le fait que les bactéries PGPR soient capables de modifier la synthèse des composés phénoliques est en faveur d'un mécanisme supplémentaire de biocontrôle, permettant à la plante, en plus des composés antimicrobiens et des sidérophores synthétisés par les PGPR, de pouvoir lutter plus efficacement contre divers pathogènes.

3) Symbiose des plantes avec des champignons mycorhiziens

Le terme mycorhize a été employé pour la première fois en 1885 pour décrire que « certaines espèces d'arbres, ne se nourrissent pas indépendamment dans le sol mais établissent régulièrement une symbiose avec un mycélium fongique au niveau de leur système racinaire entier. Ce mycélium effectue l'alimentation entière de l'arbre à partir du sol » (Frank, 2005 (traduction du texte original)). Les hyphes mycorhiziens, en grandissant dans le sol, fournissent des ressources supplémentaires en nutriments, et forme une zone d'influence appelée mycorhizosphère. L'hyphes individuel dans la mycorhizosphère est lui-même entouré

par l'hydrosphère à travers laquelle ses exsudats influencent l'activité d'autres micro-organismes du sol et notamment les bactéries. Il existe deux catégories de mycorhizes qui sont les endomycorhizes et les ectomycorhizes. La caractéristique principale des endomycorhizes est que l'hyphe pénètre l'épiderme ou les cellules corticales des parties distales du système racinaire au contraire des ectomycorhizes où les mycorhizes vont proliférer à la surface des racines et former un réseau dense d'hyphe qui se situe à l'interface entre la racine et le sol. Plusieurs types de mycorhizes sont distingués à l'intérieur de ces deux catégories. Pour les endomycorhizes, sont distinguées les mycorhizes à arbuscules (arbuscules : AM et vésicules : VM), les mycorhizes éricoïdes (formation de pelotons) et les mycorhizes orchidoïdes (typique des Orchidées) (Figure 9).

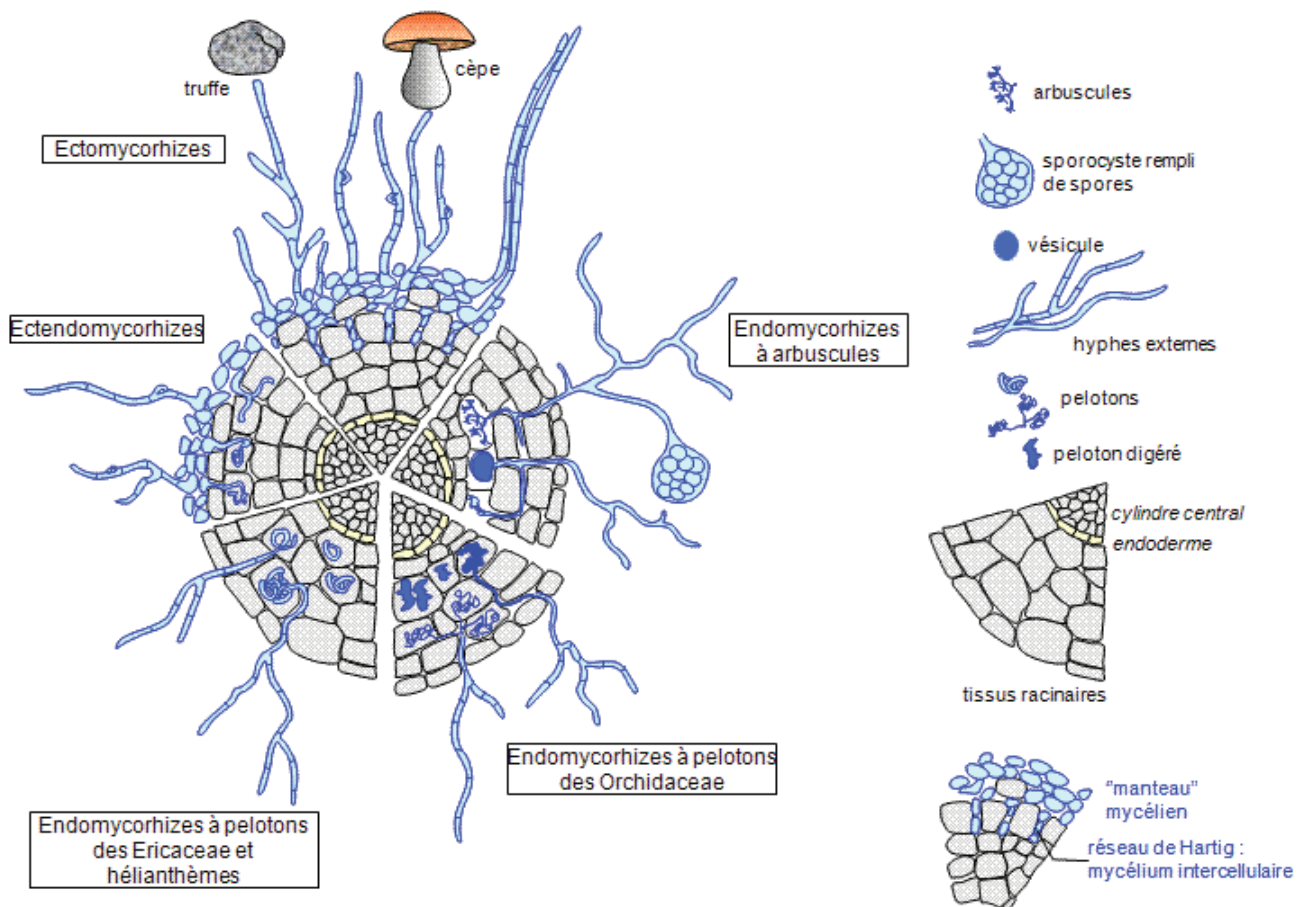


Figure 9: Principaux types mycorhiziens actuels représentés sur une coupe transversale de racine

Au cours de cette synthèse nous nous limiterons à l'évocation des interactions plantes/endomycorhizes car elles colonisent environ 90% des plantes vasculaires terrestres, c'est-à-dire plus de 400 000 espèces. Par ailleurs, il existe plus de 200 espèces de champignons endomycorhiziens, ce qui fait d'eux, des champignons à large spectre d'hôte dans leurs relations de symbiose.

3.1 Les molécules signal dans l'établissement de la symbiose

L'établissement de la symbiose mycorhizienne passe par la reconnaissance de molécules signal par les deux partenaires. La mise en place de l'interaction se fait par la perception par le CMA (Champignon Mycorhizien à Arbuscules) de molécules signal sécrétées par la plante et reconnues spécifiquement par le champignon. De nombreuses études se sont attachées à identifier ces molécules signal nécessaires pour l'établissement de la symbiose. Ces molécules sont des métabolites secondaires et plus particulièrement des composés de type flavonoïdes (Tableau 5).

Tableau 5: Effet des racines vivantes ou des composés racinaires sur la réponse de différents champignons mycorhiziens

Plant	Compound tested	Fungal stage
Clover	Flavonoids	<i>Gigaspora margarita</i> spore germination and germ-tube elongation
Clover	Flavonoids	<i>Glomus intraradices</i> germ-tube elongation
Alfalfa	Flavonoid spores	<i>Glomus etunicatum</i> germination and germ-tube elongation
Soybean	Flavonoids	<i>Glomus mosseae</i> spore germination and <i>Glomus intraradices</i> germ-tube elongation
	Flavonoids	<i>Gigaspora rosea</i> germ-tube elongation
	Flavonoids	<i>Gigaspora rosea</i> germ-tube elongation
	Flavonoids	<i>Glomus intraradices</i> and <i>G. rosea</i> germ-tube elongation
Carrot hairy roots	Phenolic acids	<i>Gigaspora gigantea</i> and <i>Gigaspora rosea</i> germ-tube elongation and branching
Root-organ culture, maize	Root volatiles	<i>Gigaspora gigantea</i> germ-tube attraction
Clover	Root volatiles	<i>Gigaspora margarita</i> root infection rate
Root organ culture, pea 'Sparkle' mutants	Root volatiles	<i>Gigaspora margarita</i> germ-tube elongation
Root-organ culture, maize	Root volatiles and exudates	<i>Gigaspora gigantea</i> spore germination and germ-tube attraction
Carrot hairy roots	Root exudates and CO ₂	<i>Gigaspora rosea</i> germ-tube elongation
Citrus, phosphorus deficient	Root exudates	<i>Glomus epigeum</i> spore germination and branching
White clover	Root exudates	<i>Glomus fasciculatus</i> germ-tube elongation
Root organ culture tomato and maize	Root exudates	<i>Gigaspora gigantea</i> germ-tube attraction
Lucerne, pea, pea mutant P2	Root exudates	<i>Glomus mosseae</i> germ-tube elongation
Onion, phosphorus deficient	Root exudates	<i>Gigaspora margarita</i> spore germination, germ-tube elongation and branching
<i>Ocimum basilicum</i> , <i>Lactuca sativa</i>	Root exudates	<i>Glomus etunicatum</i> spore germination and germ-tube elongation
Carrot hairy roots	Root exudates	<i>Gigaspora gigantea</i> germ-tube branching
Cucumber	Root exudates	<i>Glomus mosseae</i> , <i>Gigaspora rosea</i> , <i>Glomus intraradices</i> germ-tube elongation
Hairy roots of carrot, tomato, <i>Medicago sativa</i> and <i>Medicago truncatula</i> , seedlings of carrot, tobacco, maize, sorghum, pea, Myc ⁻¹ and Myc ⁻² pea mutants	Root exudates	<i>Gigaspora gigantea</i> , <i>Gigaspora rosea</i> , and <i>Gigaspora margarita</i> germ-tube branching
Cucumber	Root exudates	<i>Glomus mosseae</i> germ-tube elongation

Les flavonoïdes sont considérés comme les meilleurs candidats car ils sont impliqués dans d'autres types d'interactions plante/micro-organismes, comme dans le cas de la symbiose *Rhizobium*/Légumineuses. Ce sont des composés qui sont, la plupart du temps, systémiques des plantes supérieures, retrouvés dans toutes les parties de la plante et donc notamment dans les racines et pouvant être exsudés. Par ailleurs, ils sont présents à de fortes concentrations dans les racines et les exsudats de plantes poussant sous de faibles concentrations en phosphate et, pour des concentrations micromolaires, ont la capacité de faire croître le CMA

in vitro. De plus, les flavonoïdes peuvent stimuler la mycorhization, et il a été observé des modifications dans la composition des flavonoïdes dans les racines mycorhizées (Vierheilig, 2005). Toutefois, les flavonoïdes ne sont pas les seules molécules pouvant être considérées comme des molécules signal de la symbiose mycorhizienne car une étude effectuée sur des mutants de maïs, déficients pour la chalcone synthase, montrent des profils de mycorhization identiques à ceux des plantes sauvages (pour revue voir : (Bécard *et al.*, 2004)). Les strigolactones appartenant à la classe des terpènes et au groupe des sesquiterpènes, sont également des composés pouvant induire une germination des spores et une ramification des hyphes fongiques (Akiyama *et al.*, 2005). Toutefois, les strigolactones sont également des composés connus pour stimuler la germination de graines de plantes parasites comme le *Striga* et l'*Orobranche*.

En réponse à ces molécules signal, la spore de champignon en début de germination va mettre en place une cascade de réactions lui permettant d'induire un programme génétique spécifique et d'établir les premières étapes de la symbiose appelées « stade présymbiotique ». Cela provoque une intense activité mitotique et une prolifération cellulaire, se traduisant par une élongation des hyphes ainsi qu'une intense ramification, provoquant une augmentation considérable de chance de rencontre des deux partenaires. Juste avant celle-ci, le CMA va émettre des signaux qui sont reconnus par les racines de la plante hôte et essentiels au succès de l'interaction. Ces signaux sont appelés facteurs Myc, en analogie avec les facteurs Nod des *Rhizobia*. Toutefois, la structure de ces facteurs, au contraire des facteurs Nod, ne sont pas déterminés structurellement. La perception des facteurs Myc par la plante hôte induit des oscillations calciques dans les cellules de l'épiderme racinaire, activant ainsi les gènes liés à la symbiose par l'intermédiaire de canaux calciques (CASTOR et POLLUX) pour rétablir la charge à l'intérieur du noyau (Parniske, 2008).

Une fois en contact, le champignon va former un appressorium ou hyphopodium à partir duquel il pourra pénétrer les racines de la plante hôte grâce à la formation d'un appareil de pré-pénétration qui est guidé par le noyau de la cellule végétale. Dès lors, le champignon entré dans les cellules végétales, va développer des arbuscules séparés du cytoplasme de la cellule hôte par une membrane périarbusculaire facilitant les échanges trophiques entre les deux partenaires.

3.2 Impact de la symbiose sur les apocaroténoïdes végétaux.

Une fois la symbiose mycorrhizienne en place, outre le bénéfice qu'apporte le champignon à la plante en termes de croissance et nutrition (Tobar *et al.*, 1994), celui-ci induit de grandes modifications au niveau du profil métabolique de sa plante hôte. De nombreuses études ont été réalisées pour caractériser un pigment jaune (Figure 10A), spécifique des racines de légumineuses infectées par des parasites fongiques endophytes identifiés en 1924 et qui semble être localisé dans les cellules corticales, en dehors de l'épiderme (Jones, 1924). Soixante dix ans plus tard, des chercheurs ont décrit la structure chimique du chromophore comme un produit de clivage d'un caroténoïde linéaire en C₁₄ appelé « mycorradicine ». Une étude sur 61 membres de la famille des *Poaceae*, incluant de nombreuses céréales, montre que des composés dérivés des caroténoïdes comme les dérivés cyclohexenone (blumenine : 4-{3-O-[2'-O-β-glucopyranosyl]-butyl}-3,5,5-triméthyl-2-cyclohexen-1-one) s'accumulent continuellement dans les racines au cours de l'induction par des CMA (Figure 10B). Ils sont retrouvés sous forme de traces dans les racines des plantes non mycorrhisées. Toutefois, ces composés ne sont pas retrouvés dans tous les taxons étudiés. Ils sont présents dans les taxons appartenant aux familles des *Aveneae*, *Oeantheae*, *Paniceae*, *Phalarideae*, *Poeae*, et largement retrouvés chez les plantes du taxon des *Triticeae*. L'accumulation de dérivés apocaroténoïdes est fortement spécifique des CMA car, ni les

traitements biotiques comme des infections par des pathogènes ou des endophytes, ni les stress abiotiques comme la chaleur, le froid, une forte intensité lumineuse, les métaux lourds ou encore la sécheresse ne permet d'observer des augmentations de synthèse de ces composés (Maier *et al.*, 1997).

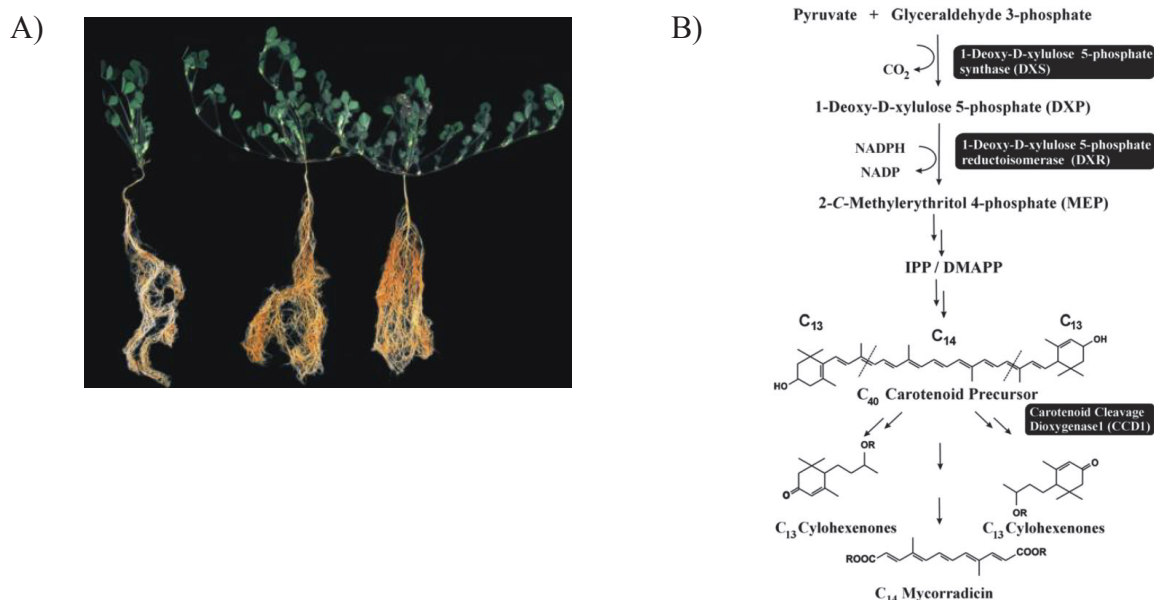


Figure 10: A) Coloration orangée des racines mycorhizées de *Medicago truncatula* colonisées par *Glomus intraradices* (centre), avec *Glomus mosseae* (droite) et non mycorhizées (gauche). B) Voie de biogénèse des dérivés en C₁₃ de cyclohexénone et C₁₄ de mycorradicine à partir d'un précurseur de type caroténoïde synthétisé via la voie de la méthylérythritol phosphate (MEP) (Walter *et al.*, 2007).

3.3 Impact des CMA sur la synthèse des composés phénoliques

L'interaction avec des CMA ne modifie pas seulement la synthèse de composés de type apocaroténoïde. D'autres composés, tels que les composés phénoliques, sont également influencés par la présence du champignon au sein de l'hôte végétal. En effet, une étude réalisée sur l'impact de la mycorhization des palmiers à dattes, au niveau des composés phénoliques solubles, montre une augmentation de la teneur de ces composés dans les palmiers inoculés avec *Glomus clarum* uniquement, alors que les palmiers inoculés avec d'autres souches de *Glomus* ne montrent pas d'augmentation significative de ces composés quand on les compare avec les plantes témoins. Cette augmentation est principalement due

aux isomères de l'acide caféolylshikimique (Jaiti *et al.*, 2008). Par ailleurs, des investigations sur d'autres espèces de plantes sont réalisées avec notamment des études sur le *Begonia*, où les auteurs ont montré une augmentation significative de la synthèse de différentes classes de composés dans les feuilles comme les *o*-dihydroxyphénols, les flavonoïdes, et plus généralement, les phénols totaux solubles quand la plante est inoculée avec *Glomus mosseae* (Selvaraj *et al.*, 2008). Plus récemment, une étude réalisée sur le *Rudbeckia* pourpre (*Echinacea purpurea*) démontre que plusieurs composés de type acide hydroxycinnamique voient leur synthèse augmentée quand la plante est inoculée avec le CMA *Glomus intraradices*. Cette variation est significative pour les acides hydroxycinnamiques uniquement au niveau des racines. Ainsi, l'acide cichorique (dérivé de l'acide tartrique et de l'acide caféique), l'acide caftarique, l'acide chlorogénique et l'acide dicaféylquinique (cynarine) voient leur concentration racinaire augmenter de 1,5, 1,7, 2,6 et 1,3 fois respectivement. De plus on peut également noter que le contenu total en composés phénoliques est 3 fois supérieur dans les feuilles inoculées (Araim *et al.*, 2009). D'autre part, la mycorhization des plantes hôtes induit généralement la synthèse par celle-ci de phytoalexines, molécules synthétisées par la plante à différents stades de la symbiose. Ainsi, la phytoalexine de *Medicago truncatula* la médicarpine (un isoflavonoïde) est détectée pendant les stades précoces de la symbiose, mais sa synthèse diminue fortement dans les stades plus tardifs de la symbiose mycorhizienne.

3.4 Impact des Champignons Mycorhiziens à Vésicules (CMV) sur les terpènes

D'autres études ont été menées sur l'effet de la mycorhization du basilic grand vert (*Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*) pour la production d'huiles essentielles. Différents

champignons sont utilisés lors de cette études avec notamment *Gigaspora margarita* et *Gigaspora rosea*. 42 et 63 jours après inoculation, une évaluation chimique des huiles essentielles des feuilles est réalisée. A 42 jours de croissance, aucune différence quantitative et qualitative dans le contenu phytochimique n'est observée. Toutefois, des différences significatives sont à noter quand on considère les composés de l'huile essentielle à 63 jours. En effet, quand on prend en compte le pourcentage de chaque composé détecté dans l'huile essentielle, des différences significatives sont observées (Tableau 6) au niveau de la concentration de différents terpènes tels que l' α -pinène, le β -myrcène, le limonène, le linalool, le camphore, l' α -terpinéol, l'eugénol et le caryophyllène.

	contrôle	<i>G. margarita</i>		<i>G. rosea</i>	
	%	%	tendance	%	tendance
α -pinène	0,197 ^a	0,407 ^b	↗	0,136 ^a	=
β -myrcène	0,547 ^a	1,042 ^b	↗	0,616 ^a	=
Limonène	0,180 ^a	0,488 ^b	↗	0,162 ^a	=
Linalool	39,388 ^a	24,487 ^b	↘	26,722 ^b	↘
Camphore	0,033 ^a	0,310 ^{ab}	=	1,390 ^b	↗
α -Terpinéol	0,795 ^a	1,340 ^b	↗	1,260 ^b	↗
Eugénol	51,072 ^a	62,997 ^b	↗	62,232 ^b	↗
Caryophyllène	0,117 ^a	0,755 ^b	↗	0,132 ^a	=

Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements. Contrôle: non mycorhizé. Adapté de Copetta *et al.* (2006)

Tableau 6: Proportion en pourcentage de chacun des composés de l'huile essentielle de Basilic grand vert en fonction des traitements

L'impact le plus important de l'interaction entre le basilic et le CM est observable avec le champignon *Gigaspora margarita* suivi de *Gigaspora rosea*. Seul *Glomus intraradices* n'induit aucune modification au niveau du contenu moléculaire de l'huile essentielle (Copetta *et al.*, 2006). Ce résultat est probablement dû à une affinité d'interaction et au fait que *Glomus intraradices* soit un CMA.

3.5 Impact des CMA sur les autres métabolites secondaires

D'autres types de métabolites secondaires sont influencés par la mycorhization. En effet Selvaraj *et al.*, (2008) ont montré que le contenu en tanins et alcaloïdes totaux des feuilles de *Rudbeckia* a été augmenté quand on le comparait avec la plante non inoculée. Toutefois il n'existe pas d'études identifiant clairement quels sont les alcaloïdes et les tannins impliqués lors de cette interaction. Les travaux sur le sujet se sont limités à une quantification globale.

3.6 Rôles écologiques supposés de ces modifications

A la lumière des modifications observées sur la synthèse des métabolites secondaires des plantes mycorhizées, des auteurs ont tenté de comprendre pourquoi la plante modifiait la synthèse de certains de ces métabolites secondaires. Certains ont essayé de proposer des hypothèses pour expliquer ce phénomène en termes écologiques. Pour commencer, l'augmentation des composés dérivés des apocaroténoïdes pourrait être une réponse de la plante afin de contrôler la colonisation racinaire par les CMA. Des expériences ont été réalisées avec un mutant de maïs *pale yellow 9* (*y9*) affecté dans la caroténoïde isomérase, catalysant la conversion du ξ -carotène en lycopène. Une diminution de la colonisation mycorhizienne et du taux de strigolactone est observée avec ce mutant. La mycorradicine n'est également pas détectée dans les racines. Les structures arbusculaires ne sont pas affectées mais leur nombre est largement diminué (Akiyama, 2007). De plus, l'application de la bluménine sur la moitié d'un système racinaire de cette plante, entraîne une suppression systématique de la colonisation racinaire des racines déjà mycorhizées, limitant ainsi la colonisation excessive des racines. Les strigolactones, dérivées de la biosynthèse des caroténoïdes (Gomez-Roldan *et al.* 2007), la mycorradicine et les dérivés de cyclohexénone

(blumerine, 13-hydroxy-blumenol-C-glucoside) sont donc des molécules indispensables à la plante pour contrôler le taux de mycorhization de ces racines (Walter *et al.*, 2007).

D'autres composés tels que les tanins, et les alcaloïdes voient leur synthèse augmentée en présence du CMA. Ces deux familles de composés peuvent être impliquées dans des mécanismes de résistance aux micro-organismes. En effet, certains tanins comme le pentagalloylglucose, la procyanidine B-2 ou l'ellagitannin ont la capacité de se complexer avec la paroi cellulaire des bactéries/champignons, de complexer les ions métalliques ou encore de perturber l'intégrité de la membrane, conférant à ces molécules des propriétés antimicrobiennes (Scalbert, 1991). La précipitation par les tanins des enzymes sécrétées par les champignons phytopathogènes nécrotrophes est une propriété qui peut contribuer à la résistance chez certaines plantes (Mole & Waterman, 1987). La synthèse des tanins est, dans certains cas, induite par la perception de stress et est médiée par des mécanismes de signalisation impliquant l'acide jasmonique et/ou l'éthylène. Concernant les alcaloïdes, la megistoquinone I et la megistoquinone II isolées à partir de *Sarcomelicope megistophylla* démontrent des propriétés antibactériennes principalement contre des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou encore *E.coli* (Fokialakis *et al.*, 2002).

Les acides hydroxycinnamiques sont généralement des précurseurs pour la synthèse de lignine. Les acides férulique et *p*-coumarique sont liés de façon covalente (liaisons ester) aux polymères d'hémicellulose chez les monocotylédones et aux substances pectiques chez les dicotylédones. Ils sont impliqués dans la formation de ponts inter-chaînes ou associés avec la lignine. L'augmentation de synthèse de composés de type hydroxycinnamiques peut donc conduire à un épaississement des parois végétales et ainsi limiter l'infection de différents organismes cellulolytiques.

Les composés terpéniques ont souvent des propriétés bactériostatiques, mais sont également des composés impliqués dans la signalisation plante-insecte. Par ailleurs, la

modification quantitative des terpènes des huiles essentielles en présence de CMV ainsi que l'augmentation de concentration de certains monoterpènes et sesquiterpènes dans les huiles essentielles de basilic pourrait induire une meilleure reproduction et dissémination quand la plante est associée avec le champignon mycorhizien.

CONCLUSION

De manière générale le rôle des métabolites secondaires des plantes dans les interactions phytobénéfiques a fait l'objet de peu d'études. Des exceptions notables concernent la symbiose *Rhizobia*-Légumineuses. Les médiateurs végétaux de l'interaction, de type flavonoïdes, sont bien décrits et leur rôle dans la mise en place de l'interaction symbiotique est bien documenté. Ainsi nous avons vu précédemment qu'un grand nombre de flavonoïdes des légumineuses étaient des inducteurs de gène *nod* de *rhizobia*. Ces flavonoïdes se répartissent en différentes classes telles que les flavones, les chalcones, les isoflavones, anthocyanines ou flavonol. Ces composés sont décrits dans de nombreuses espèces végétales, mais la capacité de production ne suffit pas, bien entendu, à la mise en place de l'interaction. Par ailleurs, certains flavonoïdes sont à la fois des inducteurs des gènes *nod* chez certaines espèces de *rhizobia*, mais des inhibiteurs pour d'autres. La balance entre flavonoïdes inducteurs et inhibiteurs produits par une plante participe donc certainement à la régulation de la nodulation et également à la spécificité d'interaction.

Si la symbiose *Rhizobia*-légumineuses est la symbiose à bénéfice réciproque la mieux décrite, le rôle des métabolites secondaires végétaux dans les symbioses plantes-champignons mycorhiziens est également bien connu. Au cours de la mise en place de la symbiose, de nombreux éléments suggèrent le rôle des métabolites secondaires des plantes. Ainsi, de nombreux composés phénoliques des exsudats des plantes ont un rôle dans la germination des

spores, dans la croissance et la ramification des hyphes. Une fois la symbiose établie, l'interaction agit sur la synthèse végétale en métabolites, notamment en augmentant la synthèse de composés tels que les caroténoïdes, phénols et polyphénols.

Il convient de garder à l'esprit que les métabolites secondaires végétaux sont également impliqués dans les interactions plantes/organismes pathogènes, et pas seulement comme phytoalexines, mais également comme inducteurs de gènes de virulence. Par exemple, l'expression des gènes *vir* d'*Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la galle du collet, intervient en réponse des signaux de la plante comprenant à la fois des composés glucidiques en association avec des composés phénoliques de type acétosyringone (Stachel *et al.*, 1995). Chez *Dickeya dadantii* et *E. carotovora*, l'expression de facteurs de virulences tels que des pectates lyases est influencée par des extraits de plante (Kelemu & Collmer, 1993) mais la nature de ces composés reste mal connue.

Concernant la symbiose associative, très peu d'études mettent en évidence à ce jour un rôle certain des métabolites secondaires dans le processus symbiotique. Il s'agit donc d'un domaine de recherche très prometteur qui mérite d'être étudié avec la plus grande attention.

CHAPITRE 2 :

**MISE AU POINT DE LA MÉTHODE D'ANALYSE DE LA
RÉPONSE MÉTABOLIQUE PRECOCE DU MAÏS À
L'INOCULATION DE BACTÉRIES PGPR
PHYTOSTIMULATRICES EN CONDITIONS *IN VITRO***

INTRODUCTION

Les études métabolomiques visent à analyser le contenu métabolique global à un instant donné dans des conditions physiologiques contrôlées. A cette fin, le plan expérimental, choix du solvant d'extraction des composés, et les techniques d'analyses sont primordiales car les composés extraits et analysés doivent pouvoir refléter l'état physiologique de la plante étudiée. Une des limitations de ces analyses est due au fait qu'il est, à l'heure actuelle, impossible d'analyser en une fois l'ensemble du métabolome. En effet, le métabolome constitue l'ensemble des métabolites d'un organisme, ou d'un tissu, et prend en compte les métabolites primaires et secondaires. Cette incapacité résulte de la diversité des propriétés de l'ensemble des métabolites secondaires (propriétés physicochimiques principalement), de la variabilité dans la biosynthèse de biomolécules dans le vivant mais également la limitation de faisabilité des expériences. Les propriétés chimiques des métabolites vont des composés inorganiques ioniques aux hydrates de carbone hydrophiles, des lipides hydrophobes jusqu'aux produits naturels complexes. Cette diversité et la complexité chimique des métabolites rendent l'analyse simultanée de tout le métabolome extrêmement difficile (Hye Kyong & Rob, 2010). D'autre part, la variation biologique résulte de variations, quantitatives et qualitatives des métabolites synthétisés, observées au sein d'une même espèce de plante cultivée sous des conditions identiques. La variation biologique est nettement plus importante que les variations observables dues aux instruments de mesure. Roessner et collaborateurs (2000) ont démontré que la variation biologique était supérieure à la variabilité analytique (analyses en GC/MS) d'un facteur 10. De ce fait, le « design » expérimental et la préparation des échantillons sont les éléments les plus déterminants pour réaliser des analyses métabolomiques. L'innovation de ce type d'étude résulte dans le fait que le métabolome représente l'état physiologique d'un organisme à un moment et dans un environnement

donnés. Cette approche prend donc tout son sens dans les interactions biotiques, où les protagonistes répondent de façon particulière à la présence du partenaire.

Dans la rhizosphère, les bactéries PGPR sont stimulées par les exsudats racinaires et peuvent avoir des effets positifs, négatifs (ou aucun des deux) sur la croissance de la plante hôte (Glick, 1995). Comme l'ont résumé Bally & Elmerich (2007), l'effet phytostimulateur des PGPR est dépendant de 3 facteurs : (i) les bactéries agissent comme des compétiteurs de pathogènes de plante (Dobbelaere *et al.*, 2003), (ii) certaines sont capables de modifier l'architecture racinaires (Dobbelaere *et al.*, 1999), et (iii) et d'autres synthétisent une large gamme de composés antimicrobiens qui inhibent la prolifération autour des racines de la plante hôte de phytopathogènes ou parasites de plante (Bouillant *et al.*, 1997; Miché *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2001). Ces différents modes d'action des bactéries PGPR permettent de les classer en deux catégories. D'une part nous distinguons les bactéries dites phytoprotectrices qui peuvent protéger la plante contre des agresseurs microbiens *via* la synthèse de composés antimicrobiens comme par exemple le DAPG (2,4-Diacetylphloroglucinol) pour les bactéries du genre *Pseudomonas*. D'autre part, nous pouvons distinguer les bactéries phytobénéfiques qui améliorent la croissance de la plante par la synthèse d'auxines (AIA) et celles-ci sont principalement représentées par le genre *Azospirillum*. Cette bactérie est la plus importante bactérie PGPR fixatrice d'azote isolée des racines des céréales (Bally *et al.*, 1983) stimulant la croissance des plantes (Jacoud *et al.*, 1999). L'association entre *Azospirillum* et les racines des herbes et céréales a été largement étudiée (Barbieri *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1998; Dobbelaere *et al.*, 2003; Bashan *et al.*, 2004). Les inoculations de nombreuses plantes avec *Azospirillum* provoque d'importants changements dans la morphologie de leur système racinaire (El Zemrany *et al.*, 2007), améliore la croissance via la production de phytohormones (Dobbelaere *et al.*, 2003) et facilite également la disponibilité en eau et en minéraux (Fallik *et al.*, 1994). L'inoculation

des bactéries PGPR sur la plante est dépendante à la fois de la densité de l'inoculum, mais également de la période de contact pour obtenir un effet sur la croissance. Cette période va de la germination à l'émergence de la racicule (Jacoud *et al.*, 1999). Par ailleurs, une inoculation de PGPR à une densité bactérienne trop importante se traduit le plus souvent par une diminution de la densité de l'appareil racinaire et un retard de croissance.

Nous avons vu, au cours du chapitre précédent, que l'inoculation de bactéries PGPR peut induire des modifications au niveau de la biosynthèse de composés particuliers de la plante hôte. Ces différents points nous ont conduits à supposer que l'inoculation de micro-organismes sur une plante hôte pouvait modifier sa synthèse métabolique et induire des profils métaboliques particuliers. De façon à vérifier ces hypothèses, nous avons décidé de développer un système analytique pour visualiser la réponse de la plante, au niveau de son métabolisme, à l'inoculation de bactéries PGPR. Les expérimentations seront donc menées, de façon à travailler sur des grands échantillonnages ($n > 30$) et en conditions contrôlées de manière à limiter la variabilité biologique. Nous essayerons par la suite d'identifier des variations de synthèse des métabolites au niveau des extraits racinaires, mais également d'identifier les composés exsudés par le maïs.

Le choix de notre modèle d'étude s'est porté sur le maïs car il représente la troisième céréale la plus cultivée à travers le monde en 2009 (après le blé et le riz) avec près de 160 millions d'hectares cultivés, la France se situant au septième rang mondial des producteurs avec 14 milliards de tonnes. Lors des cultures de maïs il est nécessaire d'apporter entre 60 et 160 Kg d'azote à l'hectare sous forme de fertilisant et 90 kg/ha d'engrais phosphatés. Par ailleurs, une grande partie de ces engrais minéraux ne sont pas assimilés par la plante, sont lessivés par les pluies et se retrouvent ainsi dans les eaux de surfaces ou souterraines, augmentant les zones polluées et eutrophisées, diminuant par conséquent la biodiversité des zones touchées. Du fait de l'intensité de la culture du maïs dans le monde, cette céréale

constitue un enjeu majeur pour tenter de réduire le taux d'intrants à apporter lors des monocultures. L'inoculation du maïs lors de sa culture par des micro-organismes bénéfiques tels que les PGPR, pourrait donc limiter les apports d'intrants. De plus, un grand nombre de bactéries PGPR ont été isolées des *Poaceae* comme le blé, le riz ou le maïs, ce qui témoigne d'une forte adaptation de ces bactéries aux exsudats de cette céréale. L'effet sur la physiologie de la plante hôte quand elle est inoculée avec ces bactéries n'est que très peu étudié. Nous avons donc fait le choix d'évaluer les variations métaboliques subies par le maïs quand il est inoculé avec ce type de micro-organisme.

Intérêt de l'analyse des exsudats

L'analyse des exsudats est un point important dans la compréhension du mécanisme d'interaction entre une plante et les micro-organismes présents dans l'environnement racinaire. En effet de nombreuses molécules sont synthétisées, et libérées par la plante dans la rhizosphère par diffusion, exsudation (sucres, acides aminés, acides organiques, stérols, enzymes...) (Dakora & Phillips, 2002), et l'origine de ces exsudats peut être variée (Figure 11).

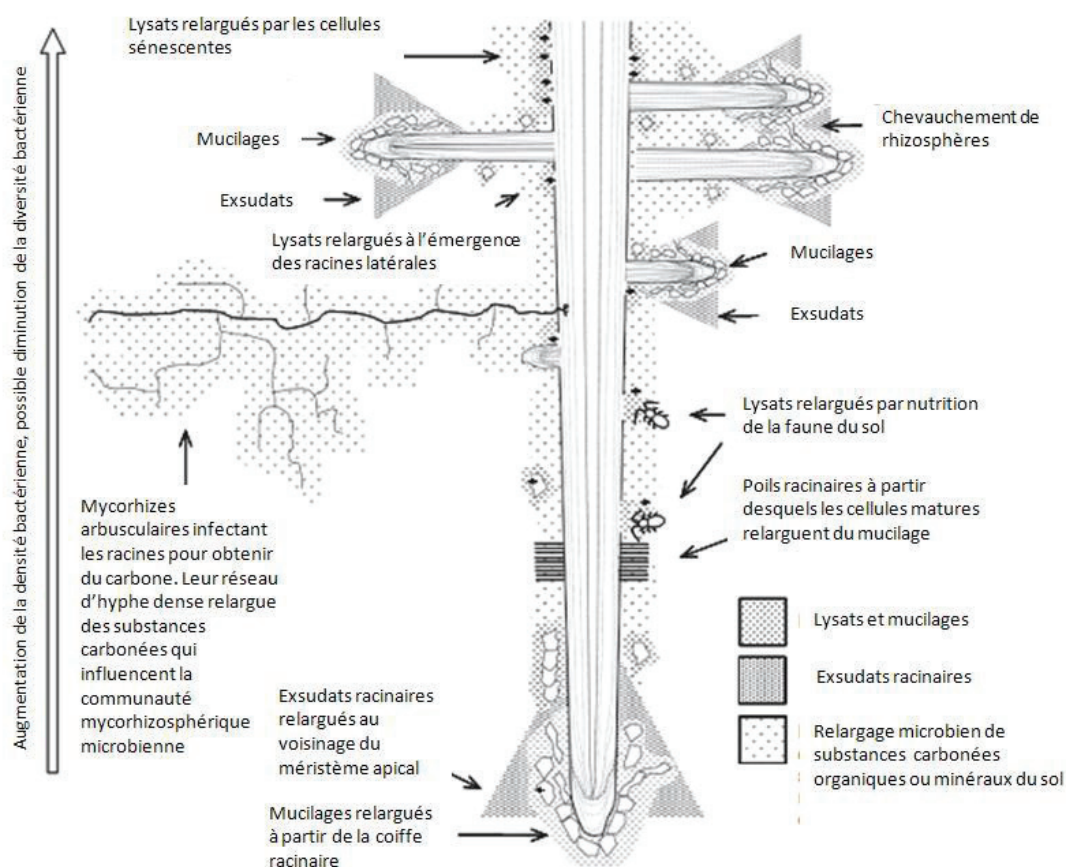


Figure 11: Origine et localisation des exsudats racinaires (adaptée de Dennis *et al.*, 2010)

Cette forte proportion de carbone organique au voisinage des racines suggère que la rhizosphère peut être le lieu de sélection notamment en augmentant la densité bactérienne dans les milieux copiotrophes. En effet, la proportion de bactérie cultivable augmente de moins de 1% dans un sol nu, jusqu'à 7% dans la rhizosphère (Zelenev *et al.*, 2005). Par ailleurs, les exsudats peuvent être des acteurs de la structuration des communautés microbiennes car outre les composés organiques utilisables comme sources de carbone par les micro-organismes, un grand nombre de composés exsudés dans la rhizosphère sont des molécules actives ayant des propriétés fongistatiques, bactéricides ou bactériostatiques, voire allélopathiques, synthétisées en réponse à des inducteurs comme les acides salicylique et jasmonique, ou les chitosans et stimulent la réponse de défense de la plante (Walker *et al.*, 2003). Toutefois, nous avons vu dans le chapitre précédent que les molécules exsudées par la plante en réponse à la présence d'un organisme ont une importance primordiale pour

l'initiation de la symbiose comme c'est le cas pour les flavonoïdes inducteurs ou répresseurs de gènes *nod* dans la symbiose *Rhizobium*/ Légumineuses.

Une des difficultés dans l'analyse des exsudats est que la concentration des exsudats autour de la racine décroît rapidement. Dans une zone comprise entre 0,4 et 7,2 mm de la racine, presque la totalité des composés exsudés est retrouvée, alors que dans une zone comprise entre 2 et 42 mm, seul 1 % des composés exsudés sont retrouvés (Foster, 1986). De ce fait, l'obtention de quantités suffisantes d'exsudats pour l'analyse est un point majeur de l'expérimentation.

La première approche développée pour ce travail a été d'effectuer les inoculations en conditions stériles de sorte à limiter les interactions possibles avec d'autres micro-organismes. Cette expérimentation vise à définir en conditions contrôlées la réponse physiologique précoce du maïs à l'inoculation de bactéries PGPR. Pour cela les plants ont été inoculés sur gélose car cette matrice permettra le cas échéant de récupérer des exsudats de maïs et de les analyser.

Les molécules synthétisées dans la racine ne témoignent pas toujours de la réalité au niveau de la rhizosphère. En effet un grand nombre de molécules sont synthétisées sous forme de glycoside et une fois exsudées, la partie osidique est clivée et, seule l'aglycone se retrouve dans l'environnement. Afin de comparer la synthèse racinaire et les molécules réellement exsudées par la plante, une expérience a été réalisée pour évaluer le contenu moléculaire des exsudats et des extraits.

PARTIE 1 : ANALYSE DES EXTRAITS RACINAIRES DE MAÏS EN CONDITION INOCULEE

1.1. Matériel biologique et conditions de culture

1.1.1. Matériel végétal

Pour cette expérimentation, afin de limiter les variabilités phénotypiques entre deux individus que l'on pourrait observer avec des maïs « naturels » et ainsi faciliter l'analyse des métabolites synthétisés et/ou exsudés nous avons choisi un maïs commercial semi tardif de la société Pioneer nommé PR37Y15. Ce cultivar de maïs est un hybride simple de grande taille. 80 graines de maïs sont stérilisées avec 300 ml d'hypochlorite de potassium (9,6%) puis lavées trois fois avec 300 mL l'eau distillée stérile pendant 30 min, les graines sont ensuite plongées dans 300 mL thiosulfate de sodium (2%) afin d'éviter toutes mutations induites par l'eau de javel dans le génome bactérien. 3 lavages avec 300 mL de $MgSO_4$ (10mM) sont alors effectués. Les graines sont mises à prégermer dans des boîtes de Pétri carrées (11,5 x 11,5cm) remplies d'eau gélosée à 1% pendant 2 jours à l'obscurité à 27°C.

1.1.2. Micro-organismes :

Toutes les souches utilisées pour cette expérimentation sont isolées de la rhizosphère du maïs, mais ont des provenances différentes. Ainsi la souche *Azospirillum lipoferum* CRT1 a été isolée de la rhizosphère du maïs en Camargue en France (Fages & Mulard, 1988). Les deux autres souches d'*Azospirilla* utilisées pour cette expérience sont les souches *Azospirillum brasilense* UAP-154 et CFN-535 isolées de la rhizosphère de maïs à Mexico (Dobbelaere *et al.*, 2001). Les différentes souches bactériennes ont été cultivées en milieu liquide NFb sous agitation (200 rpm) pendant 48 heures à 28°C jusqu'à obtenir une DO de 0,7

correspondant à la phase exponentielle de croissance, phase où les bactéries PGPR phytostimulatrices sont les plus compétentes pour induire une stimulation de croissance. Les cultures sont alors centrifugées et le culot lavé 3 fois au MgSO_4 (10mM) afin d'éliminer le milieu de culture et la suspension est ajustée à 1×10^9 CFU/ml.

1.1.3. Inoculations et cultures

Les bactéries sont alorsensemencées en masse dans la gélose (0,8%) pour obtenir une densité de 10^7 bactéries par boîte. Une densité supérieure pour le maïs induirait un effet négatif sur la croissance (Fallik *et al.*, 1988). Les graines prégermées sont alors sélectionnées afin de conserver pour l'expérimentation des plantules dont la racicule est de taille identique (1 mm). 2 plantules par boîtes sont introduites dans les boites de Pétri contenant la géloseensemencée et positionnées à 2 cm du bord. Les boîtes sont alors laissées en position horizontale pendant une journée de sorte que la racicule pénètre la gélose. Par la suite les différentes boites sont mises en culture en phytotron en position verticale pour favoriser la croissance racinaire (16 h jour à 28°C, 8 h nuit à 22°C, 75 % d'humidité) pendant 10 jours. 10 boîtes par traitement sont réalisées.

1.1.4. Mesure des paramètres morphologiques

Les mesures des paramètres physiologiques sont effectuées grâce au logiciel Winrhizo® à partir de 6 plantules par condition. Pour ce faire, les plantules sont prélevées des boîtes grâce à une pince et les racines sont débarrassées de la gélose résiduelle par rinçage à l'eau distillée, puis séparées du reste de la plantule en les coupant au niveau du collet. Différents paramètres morphologiques des racines sont alors mesurés comme la longueur totale des racines, le nombre de ramifications, le nombre d'extrémités. La mesure de la biomasse racinaire sèche est également mesurée après avoir plongé les racines dans de l'azote

liquide et procédé à une lyophilisation (72h -54°C). Toutefois, l'utilisation du logiciel WinRhizo® pour évaluer l'effet morphologique de l'inoculation de bactéries PGPR ne se fera que dans le système eau gélosée car, en système sol, la probabilité de détruire les racines adventives est nettement plus élevée et générerait donc l'interprétation de ces résultats.

1.1.5. Extraction des métabolites racinaires

Pour l'extraction des métabolites racinaires, les racines lyophilisées sont introduites dans des tubes Eppendorf 2mL et broyées en poudre grâce à un broyeur à billes pendant 2 minutes (TissueLyser II, Quiagen® S.A., Courtaboeuf, France). Les échantillons végétaux sont lyophilisés pour limiter les réactions enzymatiques telles que des oxydations ou réductions pouvant induire une altération (perte ou modification) du contenu phytochimique de l'échantillon végétal. Les poudres racinaires sont alors extraites au MeOH 100 % assisté par sonicateur (40 kHz) pendant 15 min à raison de 3 mL/50 mg de racines sèches. L'extraction est réalisée deux fois afin d'optimiser l'extraction. Le choix du solvant d'extraction s'est focalisé sur la capacité et les propriétés d'extraction des solvants organiques. Ainsi, il est admis que le méthanol possède une large gamme d'extraction des phytoconstituants avec des extractions pouvant aller des composés polaires, jusqu'aux composés à forte lipophilie. Cette extraction est assistée par sonication des échantillons. Cette technique utilise l'énergie microonde, une radiation non ionisante et cause une agitation moléculaire par migration des ions. De plus les microondes interagissent sélectivement avec les molécules d'eau présentes dans les systèmes vasculaires. Cette agitation provoque une montée de température qui induit subséquemment une rupture des parois cellulaires, permettant ainsi aux molécules organiques de se retrouver dans le solvant (Pare *et al.*, 1994). Cette technique est plus rapide qu'une macération classique de l'échantillon où le solvant d'extraction doit diffuser à travers les parois végétales. L'extrait ainsi obtenu est alors séché

au Speedvac puis pesé. Les extraits sont alors resuspendus dans le MeOH à une concentration normée de 10 mg/mL. Les extraits sont alors joints deux à deux (pour une même boîte) de sorte à homogénéiser les extraits et réduire la variabilité individuelle (Sumner *et al.*, 2003).

1.1.6. Extraction des exsudats racinaires

A partir de la gélose sur laquelle les plants ont été inoculés et cultivés, les exsudats sont récupérés afin de réaliser une analyse des phytoconstituants exsudés par le maïs. Une des limitations est la gélose qui est une matrice retenant en grande partie les métabolites secondaires exsudés par la plante. Afin de pouvoir extraire les composés de cette matrice, la gélose est prélevée, puis diluée dans l'eau (30 ml) dans un tube Falcon. Les tubes Falcon sont alors passés 15 min au sonicateur (42 kHz) puis centrifugés à 8 000 rpm pendant 1 heure. Le surnageant est alors récupéré puis filtré au filtre seringue RC 0,45µm. Le filtrat est alors congelé dans l'azote liquide puis lyophilisé. Le lyophilat est repris dans 10 ml d'eau distillée puis traité par SPE (Solid Phase Extraction) sur cartouche RP-18. Pour éliminer l'agar restant, une première élution de l'extrait est réalisée par 3 mL d'eau distillée. Les autres composés restent adsorbés sur la cartouche et sont élués par la suite par 3 mL de MeOH 100 % puis par 3 mL d'acétone 100 %. Les deux fractions organiques sont ensuite rassemblées et séchées au Speedvac. De façon à homogénéiser les résultats les exsudats secs sont repris dans du MeOH et ajustés à la même concentration (1,5 mg/mL).

1.1.7. Analyse des échantillons par HPLC

L'analyse des extraits racinaires obtenus est alors réalisée en HPLC. Nous avons choisi ce type d'analyse car elle s'applique aux composés solubles non volatils, et donc potentiellement relargués dans la rhizosphère. Les analyses HPLC sont réalisées sur un appareil Agilent Technologies série 1200 composé d'un dégazeur (degasser G132A), de

pompes quaternaires (Quat Pump G1311A), d'un passeur d'échantillons (ALS G1329A) et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD G1315B). La bonne élution et séparation des composés est très dépendante du couple phase stationnaire – phase mobile utilisé. Ainsi après optimisation des différents paramètres, notre choix s'est porté sur une colonne Macherey-Nagel Sphinx NUCLEODUR® (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å) greffée en C18. Le volume d'échantillon injecté sur la colonne est de 20 µL, les molécules sont éluées avec un débit de 1ml/min et suivies par une détection UV entre 200 et 700 nm. Quatre longueurs d'onde particulières sont utilisées pour la visualisation des chromatogrammes : 254, 280, 320 et 360 nm. Ces quatre longueurs d'onde sont choisies car elles représentent les maxima d'absorbance caractéristiques de la bande II des flavonoïdes (254 nm), des phénols simples (280 nm), des acides hydroxycinnamiques (320 nm) et de la bande I des flavonoïdes (360 nm). Ainsi, en se focalisant sur ces absorbances, nous pouvons obtenir une bonne représentativité du contenu en métabolites secondaires. Après différents tests (non montrés) pour choisir une phase mobile adéquate pour l'analyse des métabolites secondaires de maïs, notre choix s'est porté sur un gradient d'acétonitrile dans l'eau avec 0,4% d'acide acétique (H₂O-CH₃CN : 85-15 pendant 20 minutes puis 85-15 à 0-100 en 20 minutes).

Concernant les analyses des exsudats racinaires, les métabolites sont élués sur une colonne HPLC RP-8, plus polaire que la précédente afin de mieux trier les composés à forte hydrophilie. Un gradient optimisé d'acétonitrile dans l'eau a été développé comme suit : de 0 % à 40 % d'AcCN en 25 min, puis de 40 % à 100 % AcCN en 20 min. Les chromatogrammes obtenus en HPLC des exsudats racinaires sont enregistrés à 254, 280, 320 et 360 nm pour les mêmes raisons que précédemment. Parmi ces longueurs d'ondes enregistrées, seule la longueur d'onde à 280 nm sera retraitée car elle permet de visualiser un maximum de composés (signaux détectés sur les chromatogrammes).

1.1.8. Analyses statistiques

Pour comparer et déterminer les composés affectés par l'inoculation, des ACP discriminantes sont réalisées. L'analyse discriminante permet de rechercher les variables explicatives de l'appartenance à un groupe. L'ACP permet d'avoir une représentation la plus lisible de ces groupes. Toutefois, il convient de vérifier la pertinence des variables explicatives par des tests de signification. La matrice de données est construite en prenant en compte l'intensité relative de chacun des pics obtenus sur les chromatogrammes. Ainsi la valeur de l'aire sous le pic est normalisée en la ramenant au pourcentage d'aires intégrées sur le chromatogramme. Les valeurs inférieures à 0,5%, à condition qu'elles le soient pour tous les échantillons, ne sont pas prises en compte.

Toutes les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel de statistique R. La comparaison des biomasses racinaires est effectuée grâce au test de Tukey.

1.2. Résultats

1.2.1. Analyses sur la morphologie des plants inoculés par des PGPR phytostimulatrices

Les analyses des structures racinaires par le logiciel Winrhizo® (Figure 12 et 13) aussi bien que les mesures de biomasses ne montrent pas une amélioration nette de croissance de la plante hôte en condition inoculée. Les mesures de biomasse ainsi que les mesures des longueurs racinaires n'indiquent pas d'amélioration de croissance. Pour les biomasses des plants inoculés avec la bactérie *A. lipoferum* CRT1, nous observons même une diminution de la masse sèche racinaire. Au contraire, pour les mesures du nombre d'extrémités ainsi que pour les mesures du nombre de croisements, nous observons des différences significatives pour les plants inoculés avec la souche *A. lipoferum* CRT1 et *A. brasilense* CFN535 respectivement (Figure 13).

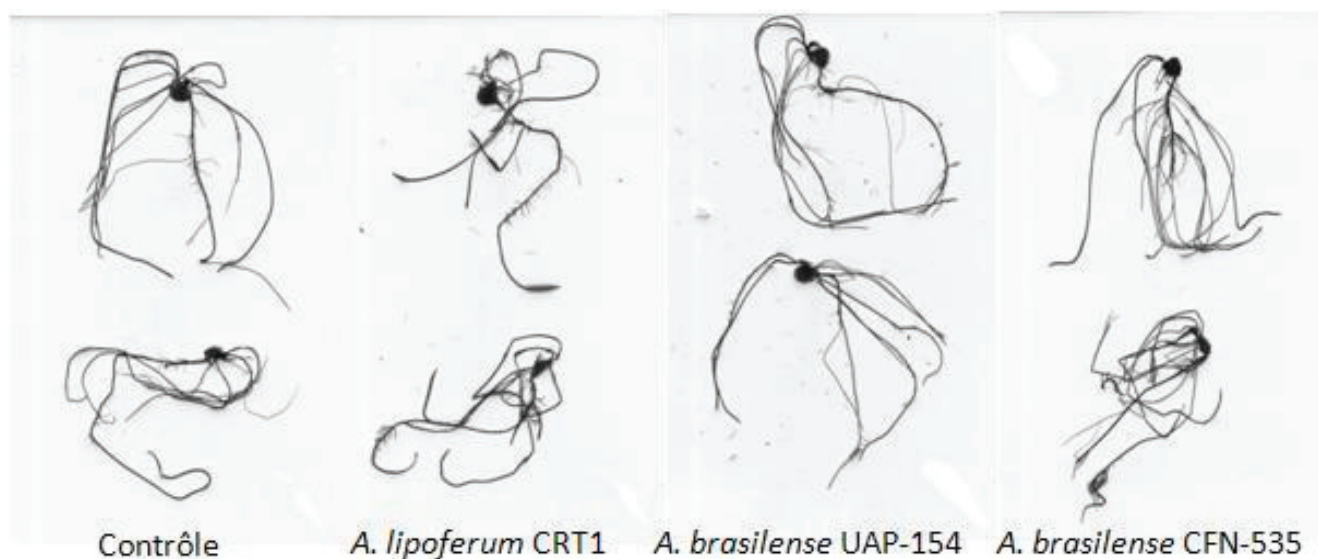


Figure 12: Images des systèmes racinaires de maïs inoculés ou non avec différentes bactéries PGPR obtenues avec le logiciel Winrhizo

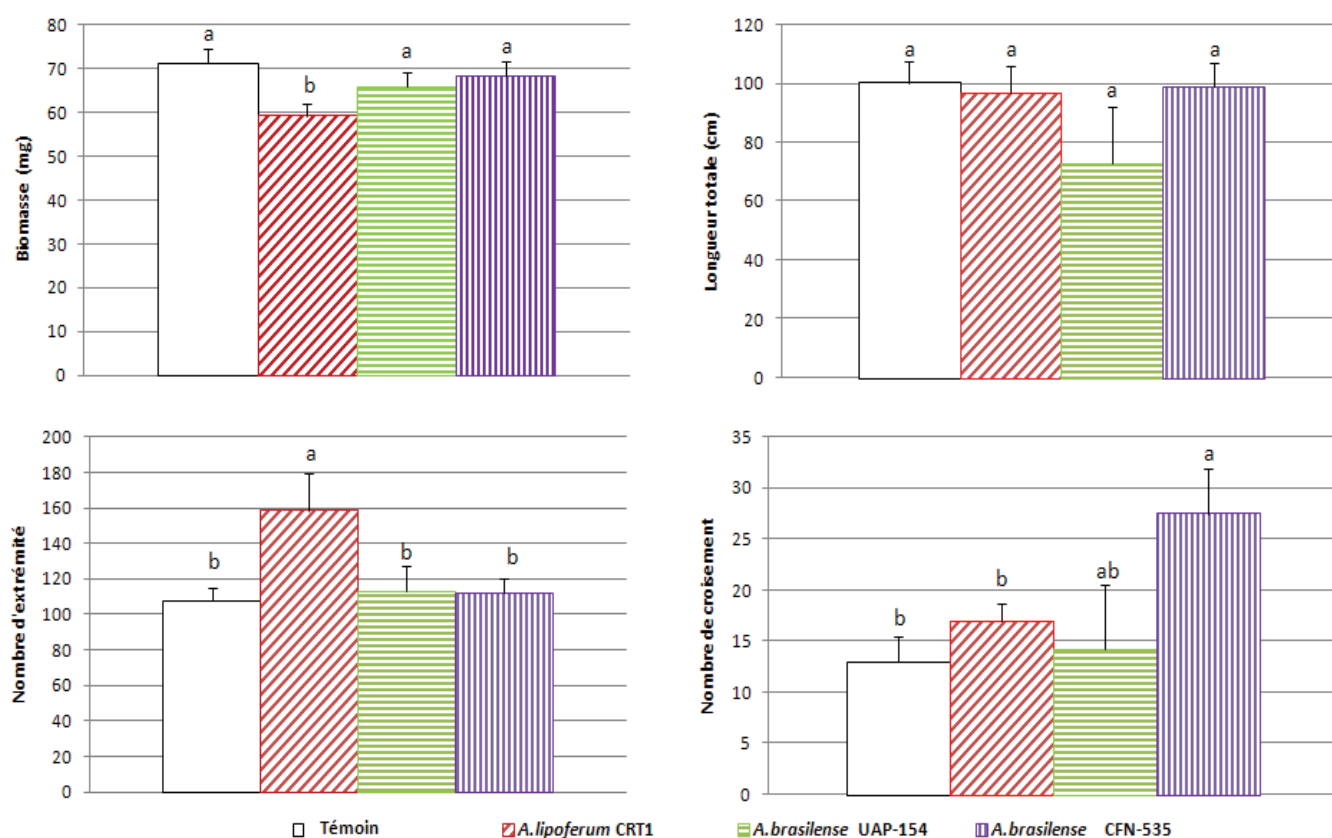


Figure 13: Mesures de biomasse et d'architecture racinaire mesurées à l'aide du logiciel Winrhizo. Les lettres différentes indiquent des différences significatives selon le test de Tukey ($p < 0,05$, $n=6$)

1.2.2. Chromatogramme des exsudats racinaires

Les chromatogrammes des exsudats racinaires montrent une grande diversité de pics correspondants aux molécules exsudées par le maïs en condition *in vitro*. Un total de 43 pics « visibles » est présent sur les chromatogrammes enregistrés à 280 nm (Figure 14).

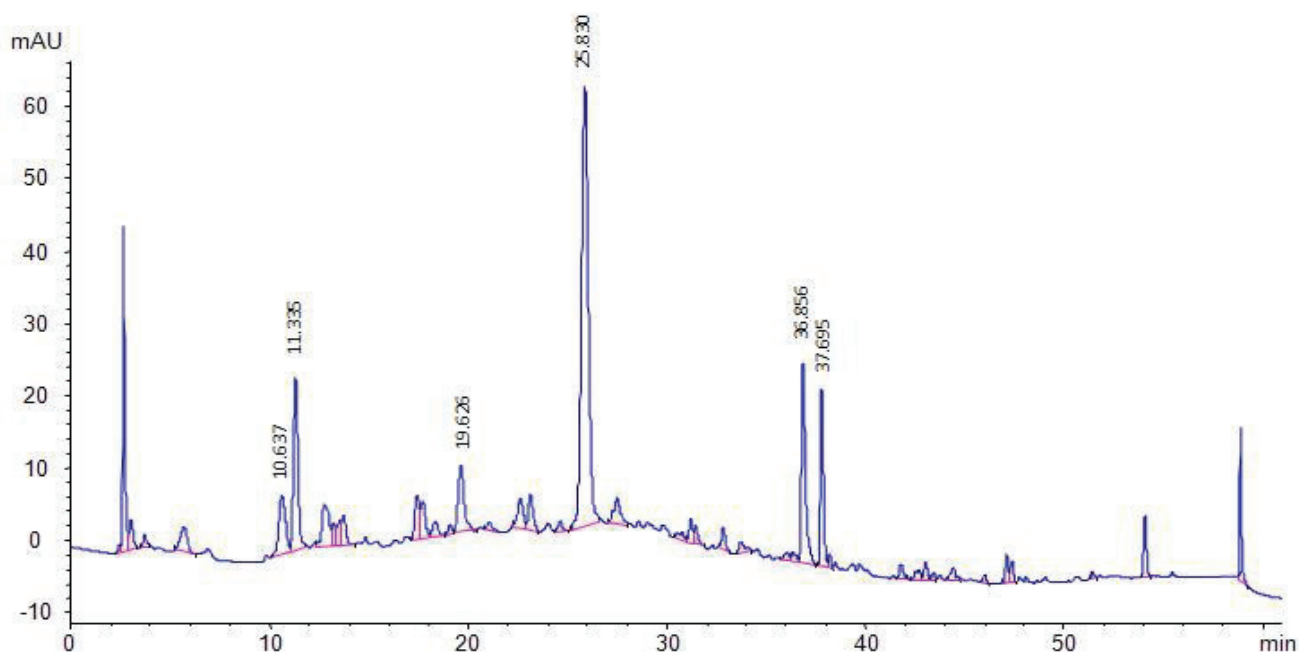


Figure 14: Chromatogramme type des exsudats racinaires de PR37Y15 non inoculé à 10 jours (280 nm)

Parmi ces composés nous pouvons repérer 6 composés majoritaires, qui ont des temps de rétention respectifs de 10,6; 11,3; 19,6; 25,8; 36,8 et 37,6 min. Ces métabolites secondaires sont donc potentiellement exsudés dans la rhizosphère du maïs. Nous remarquons également qu'une grande part de métabolites apolaires est exsudée dans l'environnement. Toutefois ils représentent des composés plutôt minoritaires dans la mesure où leur intensité d'absorption à 280 nm est faible de l'ordre de 15 mUA. Les spectres UV des différents pics nous donnent des indications quant à la famille chimique à laquelle ils appartiennent. La plupart de ces composés appartiennent à la famille des phénols simples. En effet en se basant sur les spectres UV de chacun des pics, nous ne repérons aucun signal de types flavonoïdes, acide cinnamiques, auquel nous pouvions nous attendre.

1.2.3. Chromatogramme des extraits racinaires

Les chromatogrammes des extraits racinaires présentent un total de 27 pics intégrés (Figure 15). Pour chacun des extraits des différents traitements, il est important de noter que les chromatogrammes sont quasiment identiques d'un traitement à un autre. Les différences observables au niveau individuel sont des variations d'intensité des différents composés. Nous ne détectons pas d'apparition ou de disparition de signal. Cette variation s'explique par une variation de quantité de chacune des molécules observables pour les pics fléchés (Figure 15).

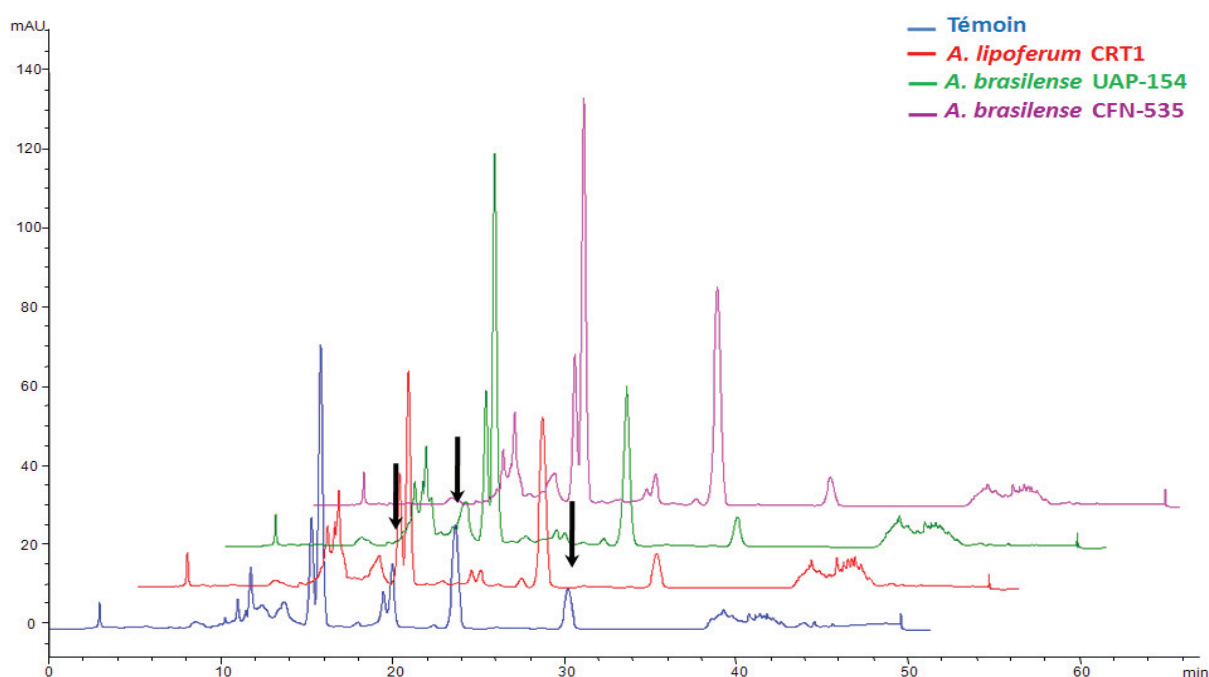


Figure 15: Superposition des chromatogrammes enregistrés à 280 nm des extraits racinaires *in vitro* des plantules de maïs inoculées avec différentes bactéries PGPR phytostimulatrices

1.2.4. Analyse discriminante et composés affectés par l'inoculation

1.2.4.1. Analyse discriminante des exsudats de racines

L'analyse complète des exsudats racinaires n'a pas pu être menée à bien car, du fait de l'instabilité des composés exsudés par le maïs, les échantillons préparés lors de cette manipulation se sont dégradés comme en témoigne le chromatogramme (Figure 16) obtenu après l'injection du même exsudat que dans la Figure 11, mais une fois les échantillons des 40

boîtes préparés. Le temps entre les deux analyses est de 1 mois et les échantillons sont conservés à l'obscurité à -20°C.

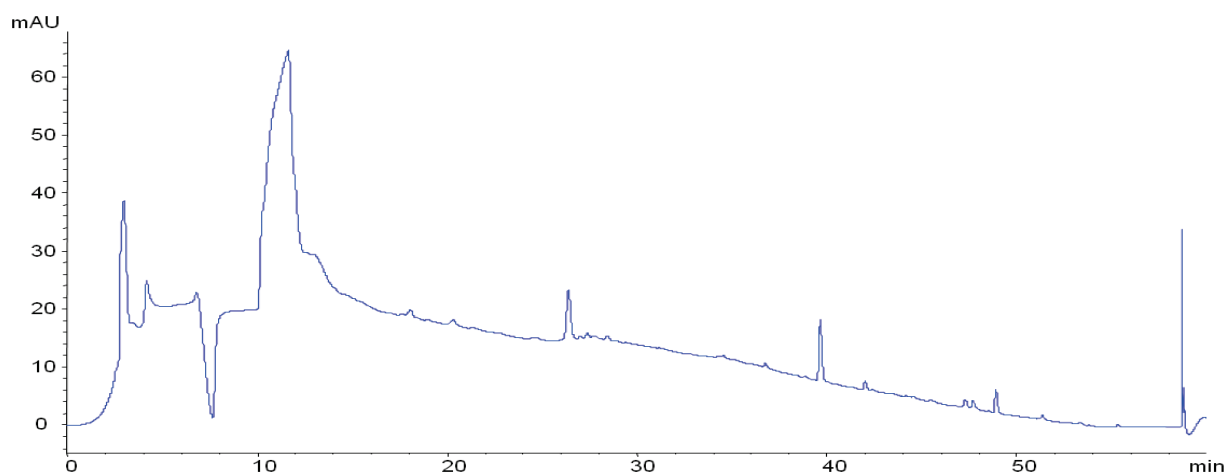


Figure 16: Chromatogramme (280nm) des exsudats obtenus après la préparation de tous les échantillons.

Nous remarquons que la majorité des composés sortent en début de gradient et proche du pic d'injection, indiquant qu'ils sont peu retenus par la colonne HPLC. Il est donc fort probable que la majeure partie des composés exsudés par le maïs dans la gélose se soient oxydés leur conférant alors des propriétés nettement plus polaires. Par ailleurs, il est connu que les composés majoritaires du maïs (acides hydroxamiques cycliques) sont très instables en milieu aqueux (Woodward *et al.*, 1978). Pour cette raison, les analyses plus poussées sur les métabolites exsudés par le maïs en présence des partenaires microbiens n'ont pas été menées. En effet, la dégradation des composés exsudés ne permet pas d'obtenir des informations sur la modification de l'exsudation du maïs en condition inoculée.

1.2.4.2 Analyse des extraits racinaires

A partir de l'analyse des extraits, les temps de rétentions et l'aire sous chacun des pics détectés sur les chromatogrammes sont les variables utilisées pour construire une matrice de données afin de procéder à une analyse en composante principale discriminante (Figure 17).

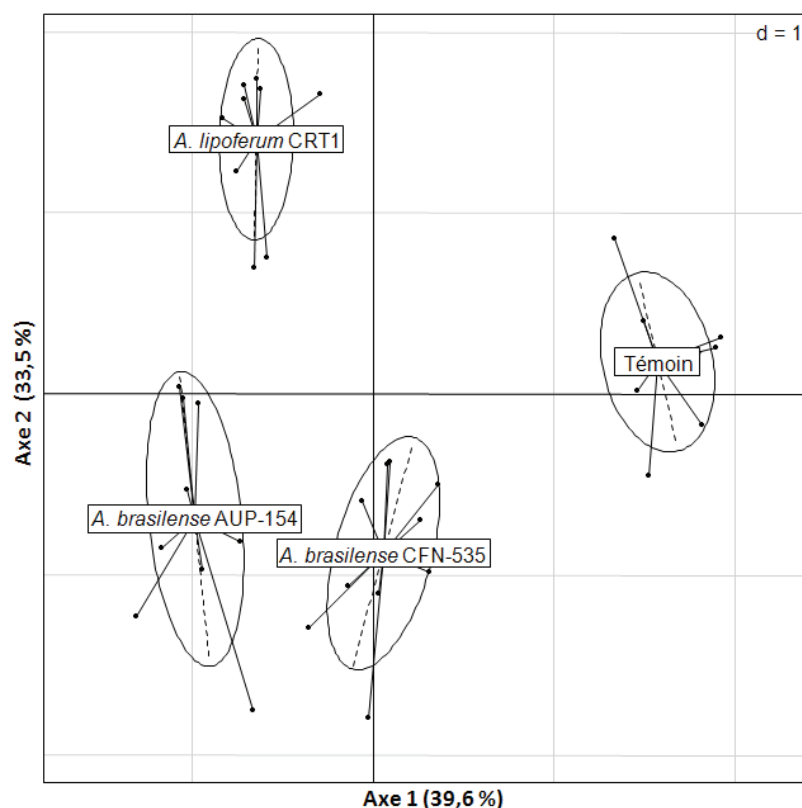


Figure 17: ACP discriminante obtenue à partir des chromatogrammes visualisés à 280 nm des extraits racinaires des plants cultivés in vitro

L'analyse discriminante effectuée représente 73,1 % de la variabilité observée. Le plan factoriel obtenu à partir des axes 1 et 2 permet de différencier trois groupes distincts. Tout d'abord, les plants non inoculés visibles sur la droite de l'ACP, ensuite les plantules inoculées avec la souche *A. lipoferum* CRT1 au niveau de la moitié inférieure gauche du plan factoriel et enfin le troisième groupe présentant à la fois des plants inoculés avec *A. brasilense* UAP-154 et CFN-535 regroupés dans le quart supérieur gauche du graphe.

Par la suite, une analyse effectuée sur le cercle des corrélations obtenu à partir de la précédente ACP (non montré), nous permet de connaître le poids de chacune des variables expliquant le mieux la répartition des échantillons sur le plan factoriel. Ces variables sont alors extraites de la matrice de données et des analyses statistiques (Test de Tukey) sont

effectuées sur l'intensité relative de chacun des signaux ciblés par le cercle des corrélations nous permettent de distinguer les composés qui ont été affectés par l'inoculation (Figure 18).

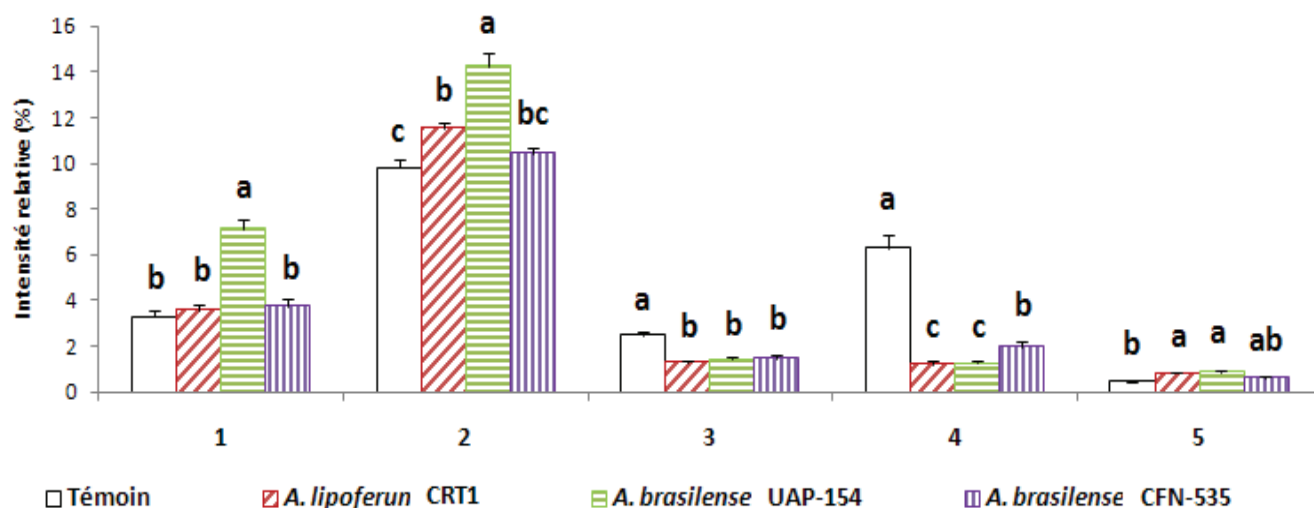


Figure 18: Variation quantitative des pics responsables de la séparation observée sur l'ACP.

Nous remarquons que les principales molécules affectées par l'inoculation des bactéries PGPR sont des molécules qui représentent entre 22 et 24 % des pics intégrés sur les chromatogrammes enregistrés à 280 nm. Les principales molécules affectées (molécules explicatives de la séparation des échantillons observables sur la Figure 17) par l'inoculation présentent des spectres UV caractéristiques des composés dits benzoxazines dont les maxima d'absorbance sont compris entre 258 et 272 nm avec des épaulements caractéristiques sur la droite de la bande principale autour de 285 nm. L'autre type de molécule affectée par l'inoculation est un composé de type acide hydroxycinnamique avec un maximum d'absorbance à 310 nm et un épaulement sur la gauche à 304 nm (Figure 19).

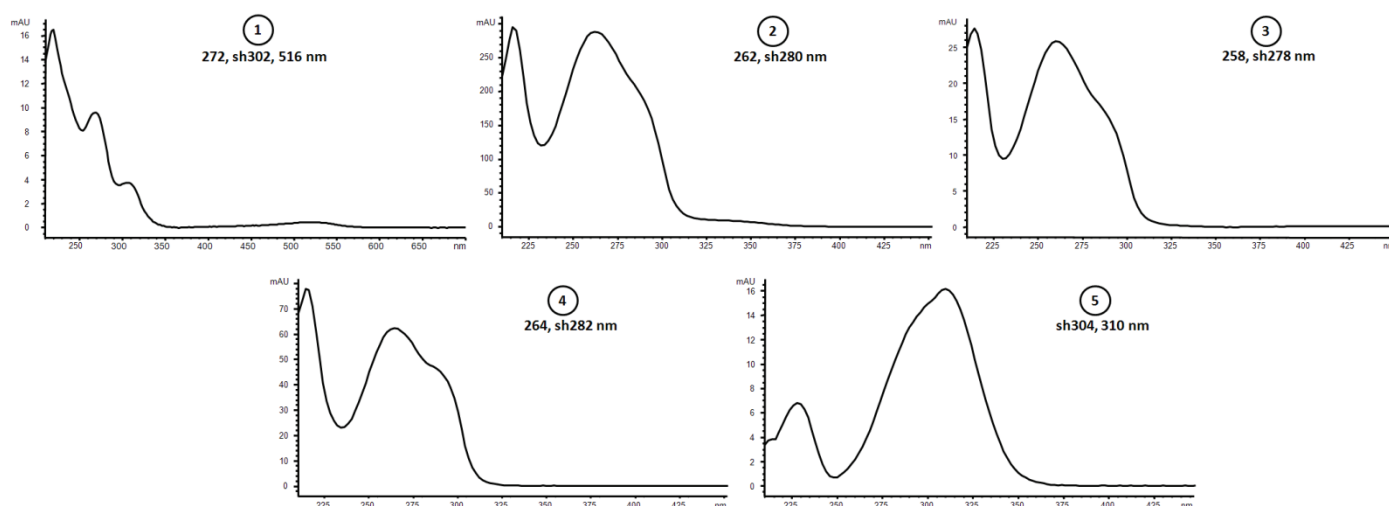


Figure 19: Spectres UV des molécules discriminantes. Les maxima d'absorbance sont indiqués en nm. sh: épaulement.

Globalement nous observons une diminution de synthèse des composés 3 et 4 en condition inoculée quelque soit la bactérie considérée. La molécule 1 semble affectée dans sa biosynthèse uniquement quand la souche *A. brasilense* UAP-154 est inoculée avec une augmentation significative de sa teneur dans les extraits racinaires. Au contraire, la molécule 2 est affectée par l'inoculation, avec une augmentation de sa biosynthèse, par la souche *A. lipoferum* CRT1 et la souche *A. brasilense* UAP-154.

PARTIE 2 : ANALYSE DES EXSUDATS

2.1. Matériel biologique et conditions de culture

Des graines de *Zea mays* du cultivar PR37Y15 sont stérilisées à l'hypochlorite de potassium 9,6% pendant 30 min, puis sont rincées 3 fois à l'eau distillée stérile pendant 30 min. Les graines ainsi stérilisées sont alors mises à germer en eau gélosée 0,7 % sur boîte de Pétri dans le noir pendant 48 h. Les graines germées sont alors plantées en pots de 3 litres sur du sol de La Cote St André. Les plantules sont sélectionnées suivant la longueur de la racine (5 mm) pour homogénéiser les cultures. 6 pots contenant 5 graines par pot sont alors misent

en culture en serre. Au bout de 10 jours de croissance, les plants sont récupérés de façon à réaliser les analyses phytochimiques.

2.2. Préparation des échantillons

Les plantules de 10 jours, sont alors rincées à l'eau distillée pour enlever les agrégats de terre, puis laissées 24 heures dans l'eau. La solution contenant les exsudats est alors soumise à un partage liquide/liquide avec de l'acétate d'éthyle (v/v). Cette extraction est réalisée deux fois pour chacun des six groupes obtenus. L'hypophase est alors séchée au lyophilisateur, et l'épiphase au Speedvac. Les résidus obtenus sont ensuite ramenés à la même concentration (5 mg/mL) dans du méthanol.

Afin de pouvoir comparer la diversité de composés synthétisés dans les racines de maïs à celle exsudée, des extraits racinaires sont préparés grâce à une macération méthanolique des broyats de racines lyophilisées (1,5 mL/30 mg sec). Là encore, les extraits sont ramenés à la même concentration massique (5 mg/mL) dans du méthanol.

2.3. Analyses chromatographiques et spectroscopiques

L'analyse du contenu racinaire et des exsudats est réalisé sur une chaîne HPLC Agilent 1200 series, grâce à une phase stationnaire en RP-18 (Macherey-Nagel, sphinx NUCLEODUR® 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å). Les molécules sont éluées grâce à un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'eau additionné d'acide acétique à 0,4%. Les composés racinaires et des exsudats sont élués grâce au même gradient optimisé pour les deux types d'échantillons comme suit : 0-5 min à 0 % d'ACN, 5-10 min à 15 % d'ACN, 15 % d'ACN pendant 30 min, puis de 15 % à 100 % d'ACN en 10 min. Pour les analyses spectrométriques, les composés des différents échantillons sont élués avec le même gradient que pour les analyses

chromatographiques, mais en diminuant le flux de solvant à 0,8 ml/min. La fragmentation utilisée pour l'analyse spectrométrique est de 75, avec un voltage de capillarité de 4000 V et la source utilisée est l'APCI. Ces analyses sont effectuées sur un Spectromètre de masse Agilent 1100 MSD.

2.4 Résultats

2.4.1 Chromatogrammes des exsudats racinaires

L'analyse HPLC des deux extraits (aqueux et EtOAc) des exsudats de maïs donne des chromatogrammes enregistrés à 280 nm. Nous remarquons que les chromatogrammes des échantillons aqueux ne donnent pas de signaux exploitables en UV (données non fournies). Ceci est du principalement à la grande présence de composés osidiques hydrosolubles dans ces échantillons, ne possédant pas de chromophores. Les exsudats extraits à l'acétate d'éthyle montrent quant à eux des chromatogrammes plus complexes (Figure 20)

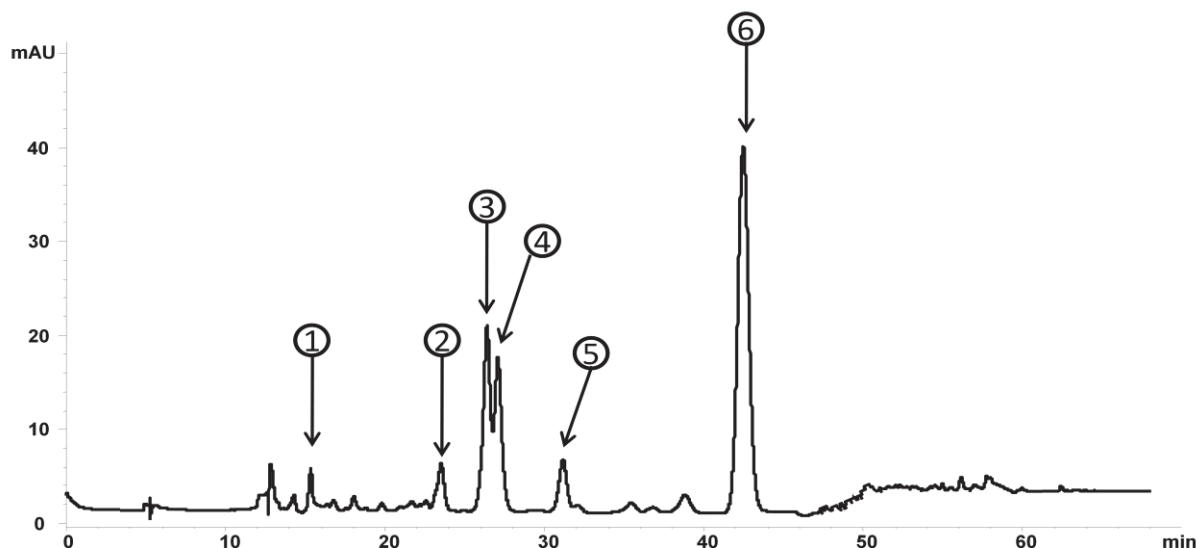


Figure 20 : Chromatogramme type des échantillons d'exsudats racinaires de 10 jours, extraits à l'acétate d'éthyle et enregistré à 280 nm. Les pics fléchés indiquent des composés avec des spectres UV caractéristiques.

Les pics fléchés sur la Figure 20 sont caractéristiques de composés de type phénolique dont les spectres UV sont présentés en Figure 21. La majorité de ces composés sont des composés polaires, puisque le système d'élution comporte une partie isocratique 10 à 40 min à 15% d'ACN. Ce résultat n'est pas surprenant car les exsudats sont généralement solubles en milieux aqueux.

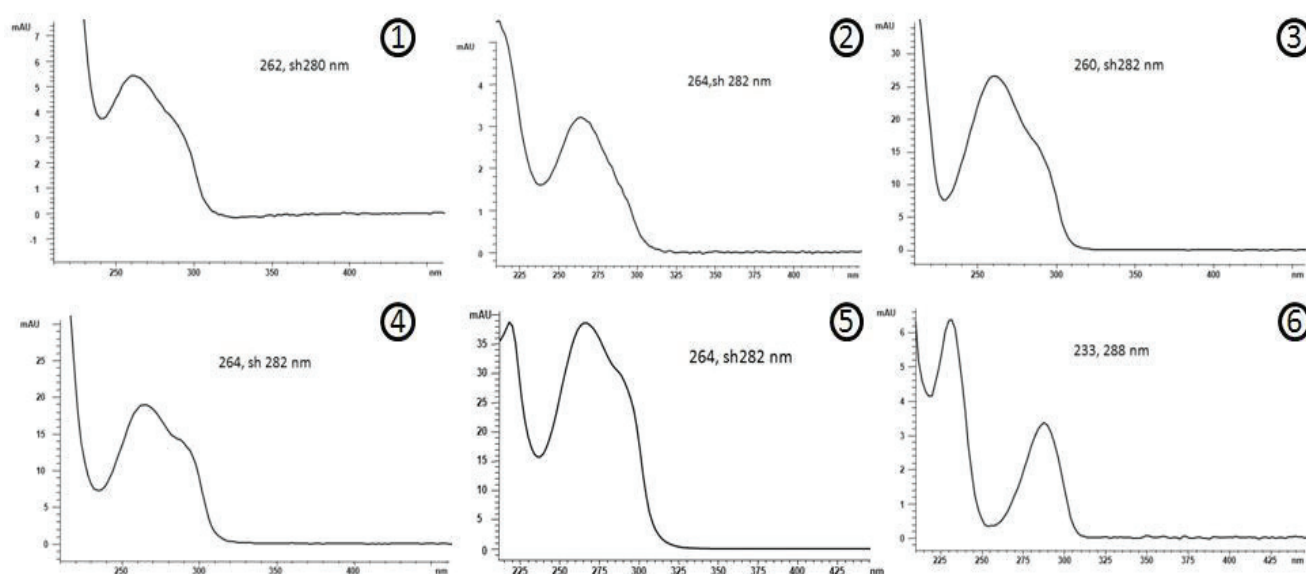


Figure 21: Spectres UV-visible des composés fléchés en Figure 20. Les maxima d'absorbance sont indiqués en nm.

2.4.2. Comparaison des composés exsudés et synthétisés par les racines de maïs cv. PR37Y15.

Nous observons que le contenu racinaire de maïs PR37Y15 est plus riche et plus diversifié que les exsudats. Ceci est visible sur la Figure 22 qui montre une superposition des deux échantillons.

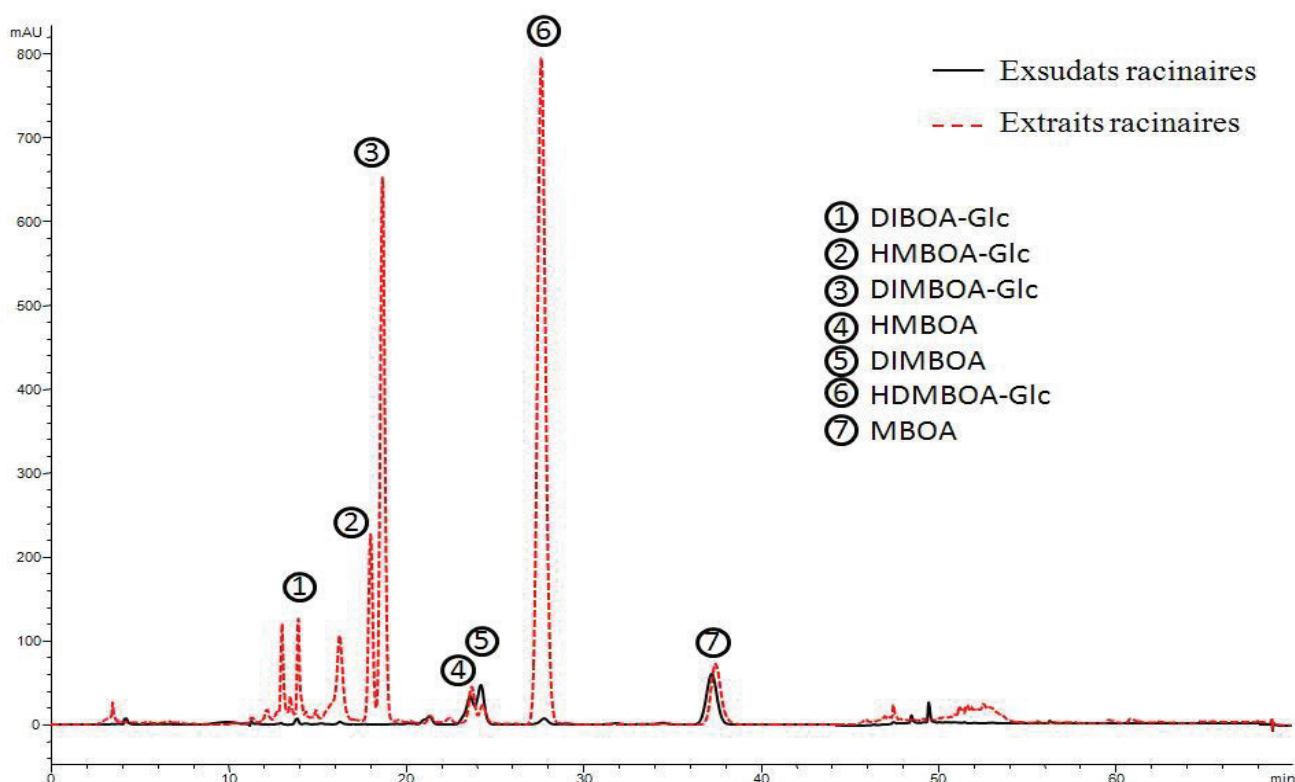


Figure 22: Superposition de chromatogrammes types des extraits racinaires de PR37Y15 (pointillé) et des exsudats de ce même cultivar (plein) enregistrés à 280 nm. Chaque pic majoritaire est annoté avec l'identification des composés obtenue par HPLC/MS (Tableau 7).

Par ailleurs, nous remarquons que quatre composés de l'extrait racinaire sont présents dans les exsudats. Seuls deux composés ne se retrouvent pas dans l'extrait et témoignent de possibles modifications structurales des composés racinaires lors de l'exsudation. De plus, 6 composés racinaires majoritaires (Tr 13, 14, 16 min, n°2, n°3, n°6), ne semblent pas exsudés (ou sont dégradés) et leurs spectres UV sont caractéristiques de la famille des benzoxazinones (autour de 260 nm et épaulement vers 285 nm).

2.4.3. Analyse en spectrométrie de masse des exsudats racinaires

Grâce aux analyses en spectrométrie de masse des échantillons des extraits et des exsudats racinaires, nous avons pu identifier sept composés majoritaires de ces échantillons. Les différentes fragmentations des composés sont indiquées dans le tableau 7.

Tableau 7: Tableau récapitulatif des données spectrales des composés identifiés en Figure 22. ép. : épaulement

N° du pic (Fig. 22)	Nom	Masse théorique	UV (nm)	ESI-MS positif	ESI-MS négatif
1	DIBOA-Glc	343	262, ép. 280	761.0[2M+Na] ⁺ , 381.9[M+K] ⁺ , 366.0[M+Na] ⁺	684.9[2M-H] ⁻ , 377.9[M+Cl] ⁻ , 342.0[M-H] ⁻ , 180.0[M-Glc] ⁻
2	HMBOA-Glc	357	264, ép. 290	735.1[2M+Na] ⁺ , 396.0[M+K] ⁺ , 380[M+Na] ⁺ , 178.1[M-OGlc] ⁺	356.0[M-H] ⁻ , 164.1[M-Glc-Frag] ⁻
3	DIMBOA-Glc	373	266, ép. 292	785.0[2M+K] ⁺ , 769[2M+Na] ⁺ , 411.9[M+K] ⁺ , 396.0[M+Na] ⁺ , 166.1[M-Frag] ⁺	744.9[2M-H] ⁻ , 407.9[M+Cl] ⁻ , 371.9[M-H] ⁻ , 163.9[M-Frag] ⁻
4	HMBOA	195	260, ép. 282	Nd	193.9[M-H] ⁻
5	DIMBOA	211	264, ép. 294	250.1[M+K] ⁺ , 234.1[M+Na] ⁺ , 166.1[M-Frag]	nd
6	HDMBOA-Glc	387	264, ép. 282	797.1[2M+Na] ⁺ , 426.0[M+K] ⁺ , 410.0[M+Na] ⁺ , 226.1[M-Glc] ⁺	773.1[2M-H] ⁻ , 386.0[M-H] ⁻ , 164.1[M-Glc-Frag] ⁻
7	MBOA	165	233, 288	166.1[M+H] ⁺	164[M-H] ⁻

Parmi les composés observés sur les chromatogrammes, nous pouvons identifier le DIBOA-Glc, le HMBOA-Glc, le DIMBOA-Glc, le HMBOA, DIMBOA, le HDMBOA-Glc et le MBOA (Figure 23)

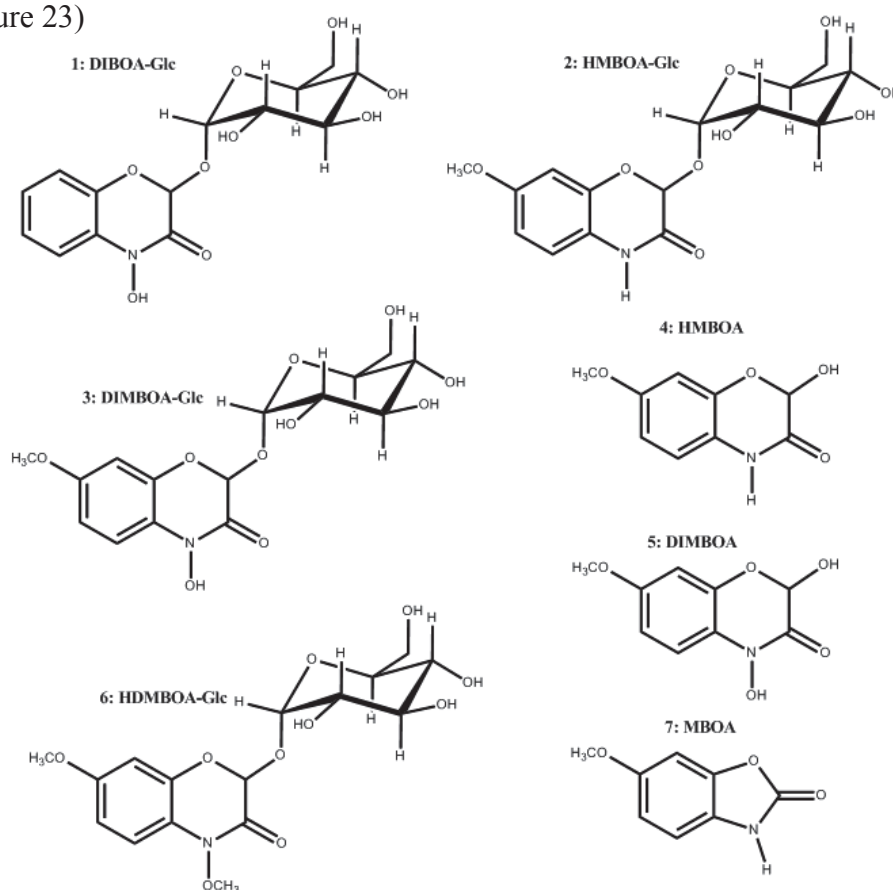


Figure 23: Structure des benzoxazinoïdes identifiés dans les exsudats et les extraits racinaires

Toutefois, il demeure une incertitude pour le HDMBOA-Glc, en effet, la masse de ce composé est identique avec le HM₂BOA (m/z 387) car il s'agit de deux isomères de position avec pour le HDMBOA-Glc un O-méthyle au niveau de l'azote intracyclique, alors que pour le HM₂BOA-Glc, le groupement O-méthyle est en position 2. Toutefois, nous observons un fragment en ionisation positive à m/z 166, qui correspondrait selon certains auteurs à la dégradation du HDMBOA en MBOA (Maresh *et al.*, 2006). Ce fragment nous incite donc à trancher pour le HDMBOA-Glc. Ces composés sont largement décrits chez le maïs comme des composés de défense des graminées, mais également des composés allélopathiques (Niemeyer, 1988; Niemeyer, 2009). Par ailleurs, nous observons que la plus grande partie des composés exsudés par le maïs sont des composés de type aglycones comme le HMBOA, le DIMBOA et le MBOA. Les composés glycosylés semblent être présents principalement au niveau des racines de la plante et ne sont que très faiblement exsudés. Seuls le DIBOA-Glc et le HDMBOA-Glc sont retrouvés au niveau des exsudats racinaires, mais à de très faibles concentrations en comparaison des teneurs observées au niveau des extraits racinaires.

DISCUSSION

Nous remarquons que pour cette expérimentation, l'effet PGPR ne se manifeste pas sur les biomasses ni sur les longueurs racinaires en condition *in vitro*. Il est à noter que la croissance de la plantule pendant 10 jours se fait uniquement sur les réserves de la graine car le milieu gélosé utilisé pour la culture n'est pas supplémenté en nutriments. Toutefois, quelques paramètres sont encourageants et permettent de soupçonner un effet des souches phytostimulatrices car les données concernant le nombre d'extrémités ainsi que le nombre de croisements sont plus élevées pour la souche *A. lipoferum* CRT1 et *A. brasilense* CFN-535 respectivement que pour les plants Témoins (Figure 13).

L'analyse HPLC des métabolites présents dans les racines des différents plants montre des variations en termes quantitatifs uniquement. Ces variations permettent d'obtenir des profils spécifiques en fonction de la souche bactérienne inoculée. Ainsi, sur le plan factoriel, obtenu pour l'analyse des métabolites des racines, nous observons clairement un regroupement des plants inoculés avec les souches du genre *A. brasilense* (UAP-154 et CFN-535). Ces traitements sont séparés à la fois des plants témoins, indiquant un effet de l'inoculation sur la biosynthèse en métabolites secondaires du maïs, mais également séparés des plants inoculés avec la souche de l'espèce *lipoferum* laissant supposer une reconnaissance spécifique des souches de bactéries PGPR par la plante. Cette reconnaissance se ferait en modulant la synthèse des composés de la plante (cf. symbiose *Rhizobium*/légumineuses). Il est à noter que les molécules affectées par l'inoculation des bactéries PGPR sont des molécules dont le spectre UV est caractéristique de composés dits : « dérivés de benzoxazinoïdes » avec des maxima d'absorbance autour de 260 nm et un épaulement à 285 nm. Ces composés sont bien connus pour avoir de nombreuses propriétés antimicrobiennes ainsi qu'allélopathiques. Ces analyses nous permettent d'observer qu'il se dégage des profils chromatographiques caractéristiques en fonction de l'inoculation apportée à la plante. Par ailleurs, il semblerait que l'inoculation de 50µM d'AIA au niveau des racines de maïs n'induit pas de modification au niveau de la synthèse de benzoxazinoïdes (Oikawa *et al.*, 2001), donc la modulation de synthèse observée ne serait pas la conséquence de la synthèse bactérienne de phytohormones comme l'AIA. Nous en concluons donc que la plante répond de façon spécifique à l'inoculation *in vitro* de micro-organismes de type PGPR phytostimulatrices, ce qui pourrait être la base d'un dialogue moléculaire entre les deux partenaires de l'interaction.

Nous avons vu dans ce chapitre, qu'un certain nombre de composés de type benzoxazinoïde sont potentiellement exsudés dans la rhizosphère. En comparant les composés racinaires et les exsudats, une chose frappante est à noter. La plus grande partie des composés

exsudés sont sous forme d'aglycone telles que le DIMBOA, le HMBOA et le MBOA. Il a été montré que *in planta* la forme majoritaire des composés de type benzoxazinoïde, chez le maïs, est la forme glycosylée (Jonczyk *et al.*, 2008). Par ailleurs, lors de l'exsudation, des β -glucosidases clivent la partie osidique de sorte à rendre le DIMBOA-Glc et le DIBOA-Glc bio-actifs (Morant *et al.*, 2008). Dans le cas de cette expérimentation, nous avons observé une présence de DIMBOA et de HMBOA au niveau des exsudats racinaires de maïs. Toutefois certains auteurs suggèrent que le HDMBOA est très instable en milieu aqueux (Maresh *et al.*, 2006) et cela pourrait expliquer pourquoi il n'est pas repéré dans les exsudats alors que sa forme glycosylée représente le composé majoritaire dans les extraits racinaires. Par ailleurs, ces mêmes auteurs proposent une voie de dégradation du HDMBOA, DIMBOA et HMBOA en MBOA. Cette voie de biodégradation pourrait expliquer la forte concentration de MBOA retrouvée au niveau des exsudats racinaires. De plus, le HDMBOA aurait d'importantes activités de défense chez le maïs et serait un inhibiteur spécifique naturel du système senseur qui régule l'expression des gènes *vir* chez *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang *et al.*, 2000). La synthèse de ce type de composé expliquerait donc pourquoi, *Agrobacterium tumefaciens* n'est pas virulent envers le maïs et par extension, toutes les *Poaceae* produisant des benzoxazinoïdes.

Toutefois, nous avons observé la présence de MBOA au niveau des extraits racinaires de maïs. Les racines de maïs ont été traitées de sorte à stopper toutes réactions enzymatiques par surgélation des racines à -196 °C, suivie d'une lyophilisation. Ainsi la présence de MBOA au niveau de ces extraits nous laisse penser que le maïs est capable de synthétiser ce composé.

D'autre part, il est intéressant de voir que les composés majoritaires exsudés par le maïs, à un stade de développement précoce, sont impliqués dans des mécanismes de reconnaissance ou de défense (Friebe, 2001).

Par la suite nous transposerons cette expérimentation dans un sol non stérile afin d'observer si la modification de la biosynthèse de la plante observée *in vitro* est effective également dans des conditions plus proche de la réalité environnementale. Nous y ajouterons également un cultivar de maïs pour évaluer si une spécificité d'interaction se dégage au niveau du métabolisme.

CONCLUSION

Une méthodologie efficace a donc été développée pour l'analyse des métabolites secondaires du maïs. Elle repose sur l'extraction méthanolique des composés racinaires de maïs suivie d'analyses en HPLC des extraits ainsi obtenus. Les variations induites par l'inoculation sont évaluées par analyse statistique en ACP discriminantes. Les pics responsables de la discrimination obtenue sur le plan factoriel sont alors recherchés sur les chromatogrammes et les spectres UV correspondant sont un début de piste pour l'identification des composés les plus affectés par l'inoculation. L'analyse des exsudats racinaires en gélose n'a, quant à elle, pas pu être menée à bien du fait de l'instabilité des composés en milieu aqueux. Toutefois, une expérimentation réalisée sur les exsudats de maïs cultivés en terre nous a permis d'établir qu'une faible proportion de composés synthétisés dans les racines pouvait être exsudée. Par ailleurs la quantité de ces composés exsudés est très inférieure à celle présente dans les racines de la plante. Quatre composés majoritaires sont retrouvés dans les exsudats de maïs et sont le DIMBOA, le HDMBOA-Glc, le MBOA et un composé non identifié. Ces composés sont des composés de type benzoxazinoïde. Cette méthode d'analyse permet donc de visualiser une différence due à une inoculation microbienne et ce, à des stades précoces de la symbiose associative.

Par ailleurs, l'analyse effectuée sur les extraits racinaires de maïs inoculés par différentes souches d'*Azospirillum* montre que ces bactéries sont capables de modifier le contenu racinaire du maïs de façon spécifique à la souche utilisée.

Il résulte de cette expérience préliminaire que les bactéries PGPR du genre *Azospirillum* ont la capacité de modifier le contenu en métabolites secondaires de la plante hôte en milieu *in vitro* même si l'effet de stimulation racinaire n'est pas encore détectable et que, la présence de ces bactéries, est susceptible de modifier la composition chimique de la rhizosphère.

CHAPITRE 3 :

RÉPONSE MÉTABOLIQUE DU MAÏS À L'INOCULATION PAR *AZOSPIRILLUM*

INTRODUCTION

Au cours du chapitre précédant une méthodologie a été développée puis mise en œuvre pour analyser les modifications du métabolisme secondaire du maïs en condition inoculée avec des souches de bactéries PGPR en conditions *in vitro*. Toutefois, les résultats déjà obtenus ne témoignent pas de la réalité environnementale dans laquelle se trouvent la plante ainsi que les micro-organismes. En effet, dans la rhizosphère, du fait de l'abondance relative de composés organiques au niveau des racines, de nombreux micro-organismes sont présents (pathogènes, prédateurs ou non) et ont de grandes interactions entre eux. Il est donc important de faire entrer une composante « microbes indigènes » du sol dans le système pour évaluer si les interactions entre micro-organismes indigènes/inoculum/plante peuvent induire des changements dans les réponses préalablement observées lors de l'expérimentation *in vitro*. En effet, les bactéries du sol produisent un grand nombre de métabolites, qui se retrouvent dans l'environnement proche de ces microbes. La nature de ces composés est diverse et va des acides organiques simples, à des molécules plus variées pouvant servir de molécule signal comme les AHL (Acyle Homosérine Lactone), ou encore des composés antimicrobiens comme le DAPG. Or il est connu que le DAPG seul au voisinage des racines des plantes pouvait induire l'ISR et donc par la suite modifier la synthèse en métabolites végétaux (Bakker *et al.*, 2007). De plus des molécules de signalisation bactérienne comme les AHL peuvent avoir un impact important sur l'expression de protéines végétales comme le montre une étude sur la luzerne avec une réponse significative de la plante à deux AHL (C12 et C16) différentes (Mathesius *et al.*, 2003). La présence de faibles concentrations d'AHL (de l'ordre du nM) peut provoquer une forte surexpression de l'isoflavone réductase, mais également des sous expressions modérées de la chalcone réductase ainsi que de la vestitone réductase (responsable de la conversion de la vestitone en medicarpine). Ces enzymes sont

retrouvées dans les voies de biosynthèse des métabolites secondaires et peuvent donc influencer le profil métabolique de la plante. Toutefois les interactions inter micro-organismes sont encore mal connues et peu décrites dans la littérature. De plus, les AHL peuvent également induire l'expression d'enzyme du métabolisme primaire comme une méthionine synthase et une aminoacylase. Du fait de la communauté microbienne du sol, une vaste diversité de molécules peut avoir un impact différentiel sur la physiologie de la plante et modifier son « comportement ».

Afin d'évaluer la réponse de la plante en termes métaboliques aux différents inocula, et pour vérifier que nous observons bien la même modulation de synthèse des métabolites du maïs, nous avons effectué une expérience d'inoculation. Par ailleurs, dans cette expérimentation, nous avons introduit un cultivar supplémentaire de maïs afin d'évaluer si la réponse du maïs à l'inoculation en termes de balance métaboliques était cultivar dépendante.

Les cultivars de maïs choisis pour cette expérience sont le cultivar PR37Y15, déjà utilisé dans le chapitre 2, et le cultivar DK315. Ce dernier cultivar est un hybride simple semi-précoce avec un temps de germination plus court et une montée en grain plus rapide que le cultivar PR37Y15. Il est possible que le contenu métabolique diffère entre ces deux cultivars notamment de par leur spécificité de croissance.

Les travaux présentés ci après font l'objet d'un article publié dans New Phytologist.

Host plant secondary metabolite profiling shows complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*.

Vincent Walker^{1,2,3}, Cédric Bertrand⁴, Floriant Bellvert^{1,2,3}, Yvan Moënne-Loccoz^{1,2,3}, René Bally^{1,2,3}, and Gilles Comte^{1,2,3}

¹ Université de Lyon, F-69622, Lyon, France

² Université Lyon 1, Villeurbanne, France

³ CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France

⁴ Université de Perpignan, Laboratoire de Chimie des Biomolécules et de l'Environnement, F-66860, Perpignan, France

Corresponding author: Gilles Comte:

E-mail: gilles.comte@univ-lyon1.fr

Summary

- Most *Azospirillum* PGPR benefit plant growth by source effects related to free nitrogen fixation and/or phytohormone production, but coevolution has probably resulted in a more complex type of associative symbiosis with the plant partner. These effects were assessed by comparing the early impacts of three *Azospirillum* inoculant strains on secondary metabolite profiles of two different maize cultivars.
- After 10 days of growth in non-sterile soil, maize methanolic extracts were analyzed by RP-HPLC and secondary metabolites identified by LC/MS and NMR.
- Seed inoculation resulted in enhanced shoot biomass (and also root biomass with one strain) of hybrid PR37Y15 but had no stimulatory effect on hybrid DK315. In parallel, *Azospirillum* inoculation led to major qualitative and quantitative modifications of maize contents in secondary metabolites, especially benzoxazinoids. These modifications depended on the PGPR strain $\times$ plant cultivar combination.
- Thus, *Azospirillum* inoculation resulted in early, strain-dependent modifications in the biosynthetic pathways of benzoxazine derivatives of maize in compatible interactions. This is the first study documenting a PGPR effect on plant secondary metabolite profiles, and it points to the establishment of complex interactions between *Azospirillum* PGPR and maize.

Additional keywords: *Azospirillum*, metabolite profiling, phytostimulation, rhizosphere, *Zea mays*.

1) Introduction

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) colonize roots and engage in associative symbiosis with various host plants (Bashan *et al.*, 2004). This interaction takes place at the root/soil interface (rhizosphere), where PGPR are stimulated by plant root exudates and exert, in return, positive effects on plant growth (Richardson *et al.*, 2009). For certain PGPR, these positive effects on plant growth are indirect and result in fact from biocontrol mechanisms involving antagonism towards phytopathogens (Raaijmakers *et al.*, 2009) and/or the induction of systemic resistance pathways in the plant (Verhagen *et al.*, 2004). In contrast, many others PGPR act mostly by phytostimulation, i.e. direct positive effects on plant growth (Richardson *et al.*, 2009).

In the case of phytostimulatory *Azospirillum* strains, the main modes of action studied are associative nitrogen fixation (Bashan *et al.*, 2004) and phytohormone production (Dobbelaere *et al.*, 2003). The latter can lead to stimulation of root growth and ramification (Jacoud *et al.*, 1999; El Zemrany *et al.*, 2006), thereby enhancing water and mineral uptake by the plant (Fallik *et al.*, 1994). These modes of action rely on source effects, respectively for supply of fixed nitrogen and phytohormone signals, which suggests that complex recognition phenomena (between the two partners) and responses may not be needed for effective functioning of this associative symbiosis. However, the association between plant-beneficial microbes (including PGPR) and their host plant(s) is thought to be ancient (Lambers *et al.*, 2009) and has probably been shaped by coevolution processes, which suggests that the microbial partners could have significant effects on host physiology. This may be expected especially in the case of microorganisms whose mode of action implicates phytohormonal effects, as the latter must be fine-tuned to the partners' needs to achieve successful phytostimulation (Remans *et al.*, 2008; Baudoin *et al.*, 2010). If true, one consequence is that

PGPR strains differing in root-colonization level and/or the expression of their plant-beneficial traits would be expected to differ in phytostimulation efficacy, which is the case with *Azospirillum* (Jain & Patriquin, 1984; Fages & Mulard, 1988).

Global approaches targeting partners' functioning are needed to assess plant-microbe interactions. They have been implemented in recent years to probe PGPR interactions, but so far (i) the focus has been on biocontrol PGPR rather than phytostimulatory PGPR such as *Azospirillum*, and (ii) they have mostly targeted plant transcriptomics (Cartieaux *et al.*, 2003; Verhagen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005) and proteomics (Miché *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2010). As far as plant physiology/metabolomics is concerned, only a few investigations have assessed PGPR effects on plant enzymatic activities (Çakmakç *et al.*, 2007), photosynthetic and auxiliary photoprotective pigments (Bashan *et al.*, 2006), free amino acids (Ait Barka *et al.*, 2006) and cinnamic acids (Singh *et al.*, 2003).

The objective of this work was to assess whether the associative symbiosis between phytostimulatory PGPR and plant involves complex, partner-dependent changes in plant physiology. The focus was put on plant secondary metabolism because of its importance in plant-microbe interactions and in plant ecological adaptation (Manuwoto & Scriber, 1985; Hartman, 2007), and also because inoculation effects on plant primary metabolism were modest (our unpublished preliminary results on organic acids). To this end, maize was inoculated by nitrogen-fixing phytohormone-producing *Azospirillum* strains, grown in non-sterile soil, and roots and shoots were analyzed by chromatographic profiling of secondary metabolites. In addition, metabolic plant markers of *Azospirillum* / maize interaction were identified by chemical means.

2) Results

2.1. Effect of *Azospirillum* inoculation on early plant growth

In comparison with the noninoculated control, at 10 d, seed inoculation of maize cultivar PR37Y15 resulted in higher root biomass with *A. brasilense* UAP154 and higher shoot biomass (up to 70% higher) with all three PGPR (Fig. 24a). By contrast, inoculation had no effect on the root or shoot biomass of the other maize cv DK315, regardless of the bacteria used (Fig. 24b).

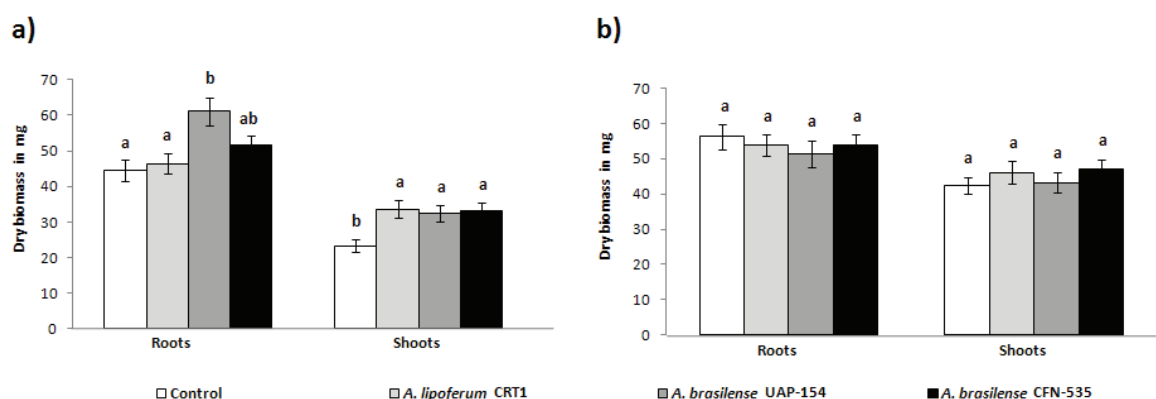


Figure 24: Effect of seed inoculation on dry biomass of maize at 10 days. a) PR37Y15 cultivar, b) DK315 cultivar. For roots and shoots of each cultivar, different letters indicate significant differences between treatments according to ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$)

2.2. Identification of maize secondary metabolites

Mass spectra recorded both in negative and positive modes allowed us to perform identification of each major secondary metabolite found in maize tissues (Fig. 25, Table 8). For compound 8, additional NMR experiments confirmed that it was 6-methoxybenzoxazolin-2-one MBOA (Fig. 26)

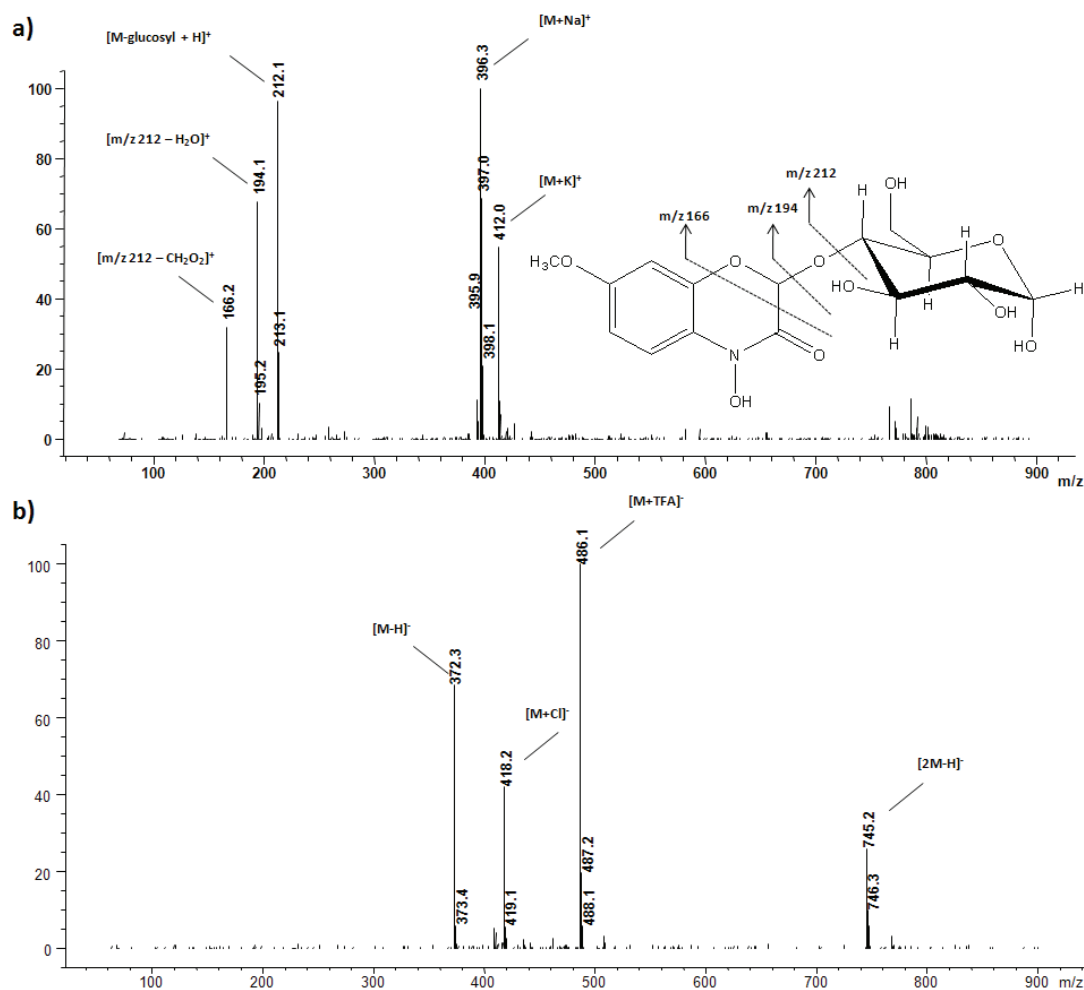
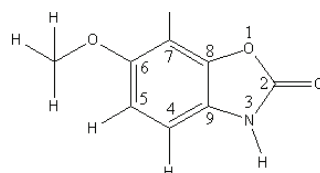


Figure 25: Mass spectra and identification of DIMBOA-Glc in roots extracts by HPLC/Electro Spray Ionization Mass Spectrometry. A) positive ion fragmentation, B) negative ion fragmentation. TFA, Trifluoroacetate.



Position	^1H	^{13}C
2		158.38
9		124.96
4	7.09 <i>d</i> (1H; 8.56)	111.95
5	6.83 <i>br d</i> (1H; 8.56)	111.20
6		156.62
7	6.97 <i>br s</i> (1H)	98.24
8		145.90
CH ₃ O	3.81 <i>s</i> (3H)	57.13
N-H	8.46 <i>s</i> (1H)	

δ (ppm) and chemical shift in bracket J (Hz). *d*: doublet, *s*: singlet, *br*: broad. Spectra recorded in CD₃OD-D₂O (1-1) at 125 Mhz for ^{13}C and 500 MHz for proton. Solvent was used as reference

Figure 26: NMR data of MBOA (compound 8).

Tableau 8: Spectral data for compounds 1-10 classified by polarity. a maximum spectral absorbance wavelengths (nm), b identified in roots, c identified in shoots; sh, spectral shoulder; Nd, not determined; Hex, hexose.

N°	Name	Formula	UV (nm) ^a	ESI-MS positive	ESI-MS negative	Cultivar
(1)	DIBOA-Glc	C ₁₄ H ₁₇ NO ₉	264, sh296	366.1 [M+Na] ⁺ , 344.1 [M+H] ⁺	378.0 [M+Cl] ⁻ , 342.3 [M-H] ⁻ , 181.1 [M-Hex-H] ⁻	PR37Y15 ^{bc}
(2)	DIMBOA	C ₉ H ₉ NO ₅	264, sh294	234.1 [M+Na] ⁺ , 212.1 [M+H] ⁺ , 166.1 [M-(CH ₂ O)] ⁺	nd	DK315 ^{bc} PR37Y15 ^c
(3)	DIMBOA-Glc	C ₁₅ H ₁₉ NO ₁₀	266, sh292	412.0 [M+K] ⁺ , 396.1 [M+Na] ⁺ , 212.1 [M-Hex+H] ⁺ , 166.1 [M-(Hex-CH ₂ O)] ⁺	372.3 [M-H] ⁻ , 418.2[M+Cl] ⁻ , 486.1[M+TFA] ⁻	PR37Y15 ^{bc}
(4)	DIM ₂ BOA	C ₁₀ H ₁₁ NO ₆	264, sh292	264.1 [M+Na] ⁺ , 242.1 [M+H] ⁺	240.1 [M-H] ⁻	DK315 ^b
(5)	HMBOA	C ₉ H ₉ NO ₄	268, sh292	218.1 [M+Na] ⁺ , 196.1 [M+H] ⁺	nd	DK315 ^b
(6)	HMBOA-Glc	C ₁₅ H ₁₉ NO ₉	264, sh290	396.1 [M+K] ⁺ , 380.1 [M+Na] ⁺ , 196.2 [M-Hex+H] ⁺	392.1 [M+Cl] ⁻ , 356.3 [M-H] ⁻	PR37Y15 ^{bc}
(7)	HDIMBOA-Glc	C ₁₆ H ₂₁ NO ₁₀	264, sh288	410.1 [M+Na] ⁺ , 226.2 [M-Hex+H] ⁺ , 194.1 [M-Hex-OCH ₃], 166.2 [M-(Hex-CH ₂ O)] ⁺	nd	PR37Y15 ^b
(8)	MBOA	C ₈ H ₇ NO ₃	288	188.1 [M+Na] ⁺ , 166.1 [M+H] ⁺	164.1 [M-H] ⁻	DK315 ^{bc} PR37Y15 ^{bc}
(9)	M ₂ BOA	C ₉ H ₉ NO ₄	282	234.2 [M+K] ⁺ , 218.1 [M+Na] ⁺ , 196.1 [M+H] ⁺	nd	DK315 ^{bc}

All compounds identified in one or both cultivars are summarized in Figure 27.

Hydroxamic acids:

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(1) DIBOA-Glc	H	H	Glc	OH
(2) DIMBOA	OCH ₃	H	H	OH
(3) DIMBOA-Glc	OCH ₃	H	Glc	OH
(4) DIM ₂ BOA	OCH ₃	OCH ₃	H	OH

Lactam type:

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(5) HMBOA	OCH ₃	H	H	H
(6) HMBOA-Glc	OCH ₃	H	Glc	H

Methyl derivatives:

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(7) HDMBOA-Glc	OCH ₃	H	Glc	OCH ₃

Benzoxazolinones:

	R ₁	R ₂
(8) MBOA	OCH ₃	H
(9) M ₂ BOA	OCH ₃	OCH ₃

Figure 27: Main benzoxazinone derivatives and benzoxazolinone compounds identified in maize extracts and already reported in the literature.

In shoot methanolic extracts of cultivar PR37Y15, glycoside and aglycone forms of benzoxazines derivatives (benzoxazinones and benzoxazolinones) were found. These were 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA- β -D-glycoside) (compound 1), 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) (compound 2), 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA- β -D-glycoside) (compound 3), 2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA- β -D-glycoside) (compound 6), and 6-methoxybenzoxazolin-2-one (MBOA) (compound 8). The same compounds were also found in root extracts of cultivar PR37Y15, which also contained 2-(β -D-glucopyranosyloxy)-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HDMBOA- β -D-glycoside) (compound 7).

In the case of cv DK315, only the aglycone forms DIMBOA (compound 2), 2,4-dihydroxy-6,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIM₂BOA) (compound 4), 2-hydroxy-7-

methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA) (compound 5), MBOA (compound 8) and 6,7-dimethoxy-2-benzoxazolinone (M₂BOA) (compound 9) were identified. Furthermore, DIM₂BOA and HMBOA were found only in root extracts.

2.3. Effect of *Azospirillum* inoculation on secondary metabolic profiles of maize cv. PR37Y15

Chromatograms obtained for root methanolic extracts of maize cv. PR37Y15 at 10 d showed a total of 45 integrated peaks. Using retention times and peak areas at 280 nm (Fig. 28), a data matrix was built in order to carry out discriminant PCA to compare inoculation treatments (Fig. 29A). The factorial plan defined by axes 1 and 2 explained 68.5% of data variability. Discriminant analysis separated all four treatments from one another. Unexpectedly, there was as much difference between the two *A. brasilense* strains as between *A. brasilense* CFN-535 and *A. lipoferum* CRT1.

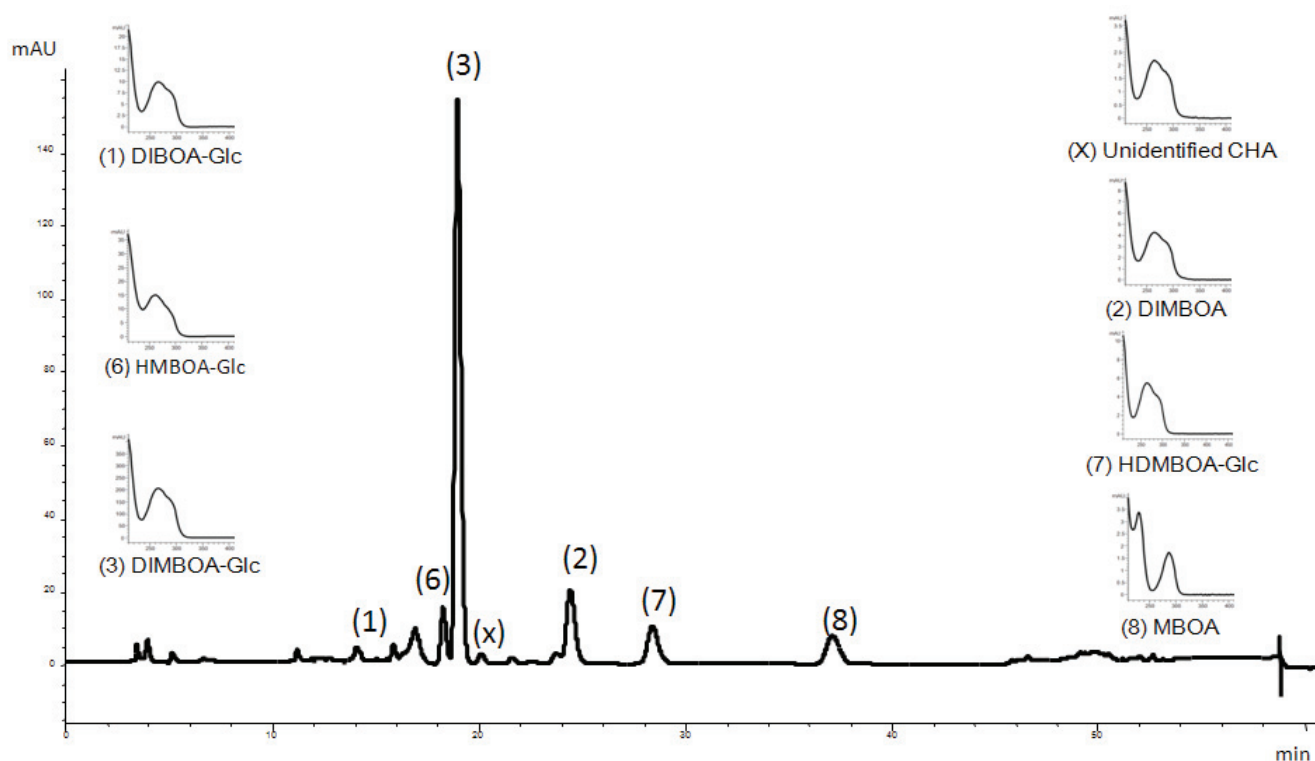


Figure 28: Standard chromatogram obtained at 280 nm in Reverse Phase-HPLC for methanolic root extracts of PR37Y15 cultivar. Each of the main peaks was identified by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry analysis except for peak 8 identified by NMR analysis.

Chromatograms for shoot methanolic extracts of maize cv PR37Y15 yielded a total of 28 integrated peaks. Discriminant analysis (73.2% variability along axes 1 and 2) gave three distinct groups of treatments, that is, no-inoculation, inoculation with *A. brasilense* UAP-154, and inoculation with *A. lipoferum* CRT1 or *A. brasilense* CFN-535 (Fig. 29B).

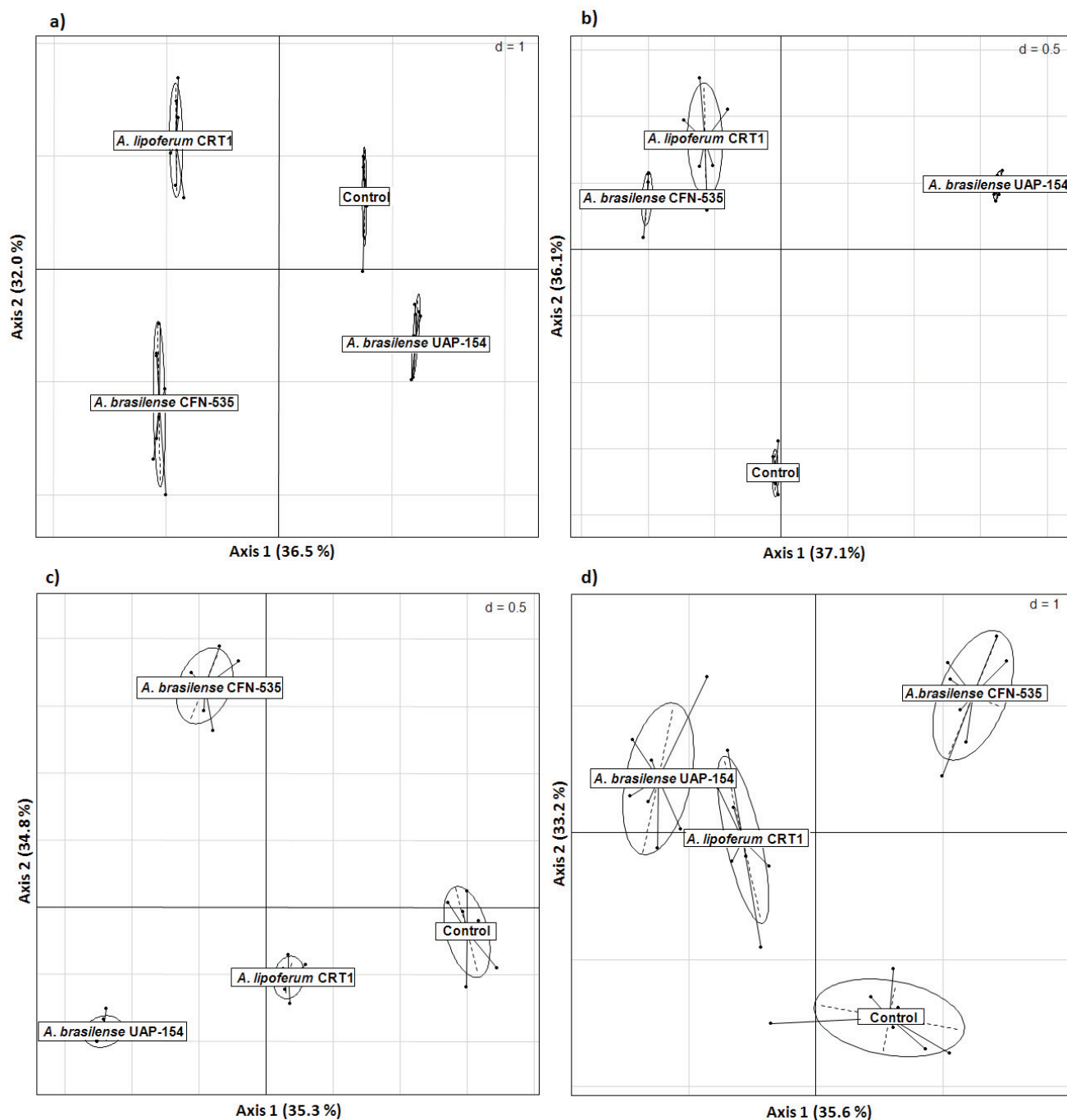


Figure 29: Discriminant PCA performed on chromatographic data obtained for each methanolic extract of maize. Analyses were done with the integration of peaks with a relative intensity up to 1% of chromatogram. Each point represents four pooled extracts of the same treatment (4 plants). A) PR37Y15 root extracts, B) PR37Y15 shoot extracts, C) DK315 root extract, D) DK315 shoot extracts. The weight of each axis is indicated.

2.4. Effect of *Azospirillum* inoculation on secondary metabolic profiles of maize cv. DK315

Chromatograms obtained for root methanolic extracts of maize cv DK315 showed a total of 56 integrated peaks. Discriminant analyses (70.1% of data variability with axes 1 and 2) allowed the separation of all four treatments, the main difference being between *A. brasilense* CFN-535 and the three other treatments (Fig. 29C).

Chromatograms for shoot methanolic extracts of maize cv. DK315 gave 34 integrated peaks. Discriminant analyses (68.8% of data variability) yielded three distinct groups, which were no inoculation, inoculation with *A. brasilense* CFN-535, and inoculation with *A. lipoferum* CRT1 or *A. brasilense* UAP-154 (Fig. 29D).

2.5. Effect of *Azospirillum* inoculation on individual secondary metabolites of maize

At 10 d, the total amount of benzoxazinoid compounds (based on total absorbance data) did not differ between treatments, regardless of the maize hybrid (data not shown). For PR37Y15 cultivar, the prevalence of nine PCA-discriminant secondary metabolites, that is, six for roots (Fig. 30A) and five for shoots (Fig. 30B), differed significantly between treatments based on ANOVA and Tukey's test. For root extracts, all were benzoxazine derivatives (Fig. 30A). Of these, DIMBOA-Glc, DIMBOA, HDMBOA-Glc and MBOA represented 62% - 81% of integrated peak areas on chromatograms. In contrast to PGPR strain *A. brasilense* UAP-154, the PGPR strains *A. lipoferum* CRT1 and *A. brasilense* CFN-535 resulted in higher HMBOA-Glc (except for CFN-535), DIMBOA-Glc and HDMBOA-Glc contents and lower DIMBOA (except for CFN-535) and MBOA contents in comparison with the noninoculated control. Shoot extracts did not display DIMBOA and HDMBOA-Glc,

but two unknown cinnamic acids were detected (Fig. 30B). Treatment effects on DIMBOA-Glc and MBOA shoot contents were similar as those on roots. In addition, *A. lipoferum* CRT1 and *A. brasilense* CFN-535 resulted in lower shoot contents for cinnamic acid 2.

For DK315 cultivar, 10 PCA-discriminant secondary metabolites, that is, five for roots (Fig. 30C) and five for shoots (Fig. 30D), differed in prevalence according to treatment. Two other root secondary metabolites were identified (HMBOA and DIM₂BOA), but they were not discriminant (data not shown). For root extracts, three benzoxazine derivatives differed with treatment namely M₂BOA and two unidentified cyclic hydroxamic acid (Fig. 30C). Except for M₂BOA, all compounds responsible for segregation between treatments were minor compounds (i.e. compounds representing less than 5% of total chromatogram). For shoot extracts, two other cyclic hydroxamic acid and several minor compounds, including a flavonol differed in prevalence according to treatment (Fig. 30D). Inoculation with *A. lipoferum* CRT1 or *A. brasilense* UAP-154 gave similar results for several of these compounds.

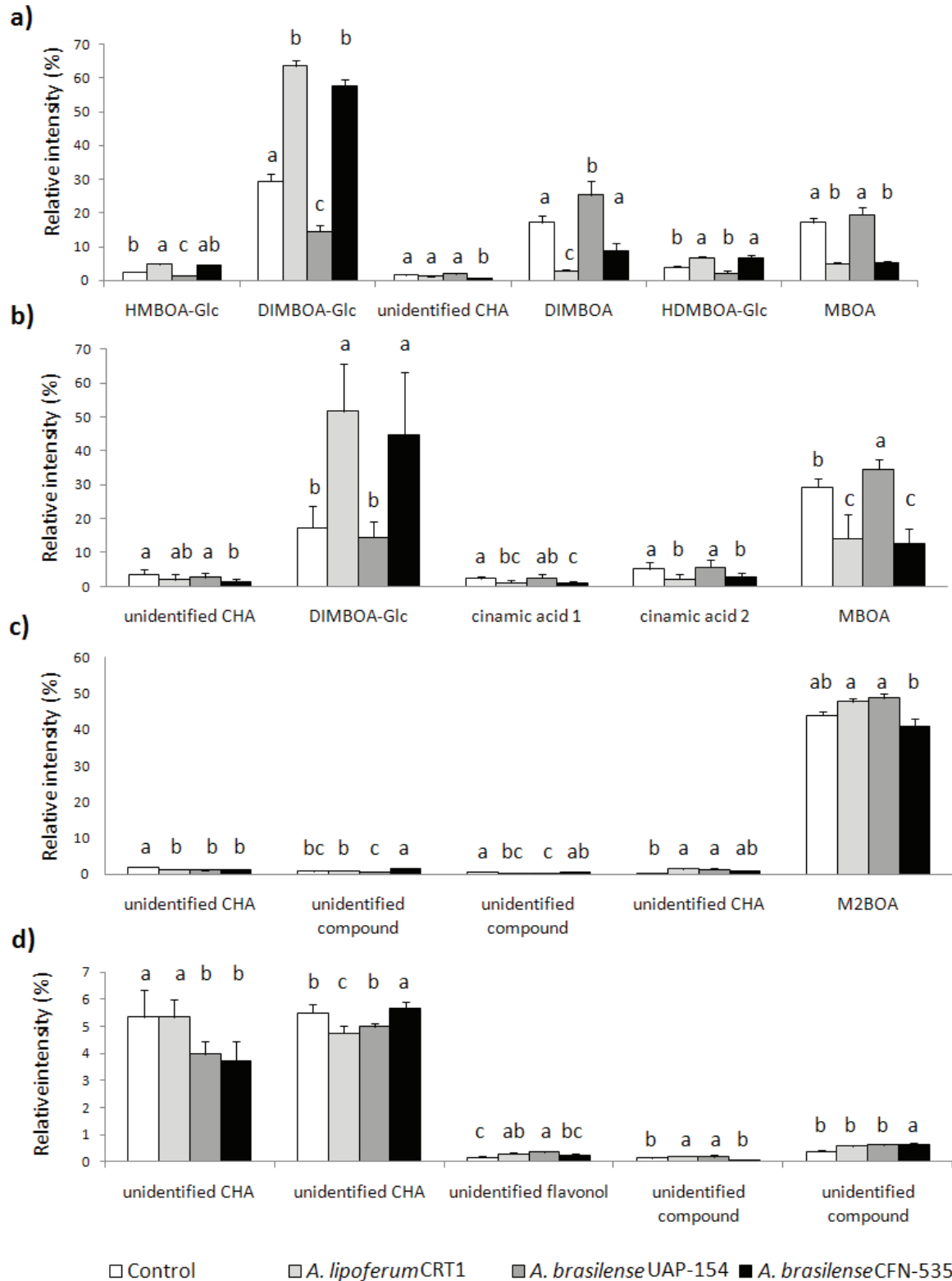


Figure 30: Effect of maize seed inoculation on plant content in individual secondary metabolites that distinguished treatments in discriminant PCA. A) PR37Y15 roots, B) PR37Y15 shoots, C) DK315 roots, D) DK315 shoots. CHA : cyclic hydroxamic acids. For each metabolite, different letters indicate significant differences between treatments according to ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$).

2.6. Inoculation effects on maize secondary metabolites in contrasted experiments

In the absence of inoculation, root secondary metabolites of maize cv PR37Y15 found in the glasshouse at 10 d (Fig. 31) were also recovered (although not in same amounts) under field conditions at 16 d, that is, for a similar crop phenology (three to four leaves and four leaves respectively). The same compounds (with cinnamic acids in larger amounts) as well as three additional secondary metabolites were recovered with older maize (seven to eight leaves) in a distinct glasshouse experiment.

In presence of seed inoculant *A. lipoferum* CRT1, modifications in the root secondary metabolic profile of glasshouse maize at 10 d were also found with field maize of similar phenology (Fig. 31). By contrast, there was no significant difference between control and inoculated maize plants at 35 d under glasshouse conditions. Therefore, inoculation effects of *A. lipoferum* CRT1 were also found under different experimental conditions, but were not observed with older maize.

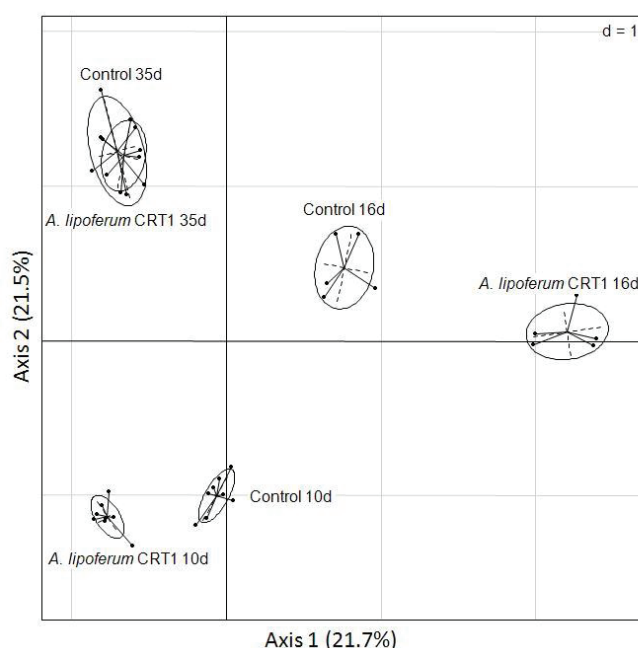


Figure 31: Discriminant PCA performed on chromatographic data obtained for each methanolic root extract of maize inoculated or not with *Azospirillum lipoferum* CRT1 in separate experiments. Analyses were based on peaks areas and retention times. Each point represents four pooled extracts of the same treatment (4 plants). 10d, 16d and 35d correspond to 10, 16 and 35 days after inoculation respectively.

2.7. Relations between secondary metabolites

When relative area data were assessed by Pearson correlation analysis, significant positive or negative linear correlations were found between several secondary metabolites taken two by two (Fig 32). Indeed, negative correlations were obtained between DIMBOA and DIMBOA-Glc, DIMBOA and HDMBOA-Glc, MBOA and M₂BOA, MBOA and HDMBOA-Glc, and DIMBOA-Glc and DIBOA-Glc. In addition, a positive correlation was found between DIMBOA and MBOA, and between DIMBOA-Glc and HDMBOA-Glc.

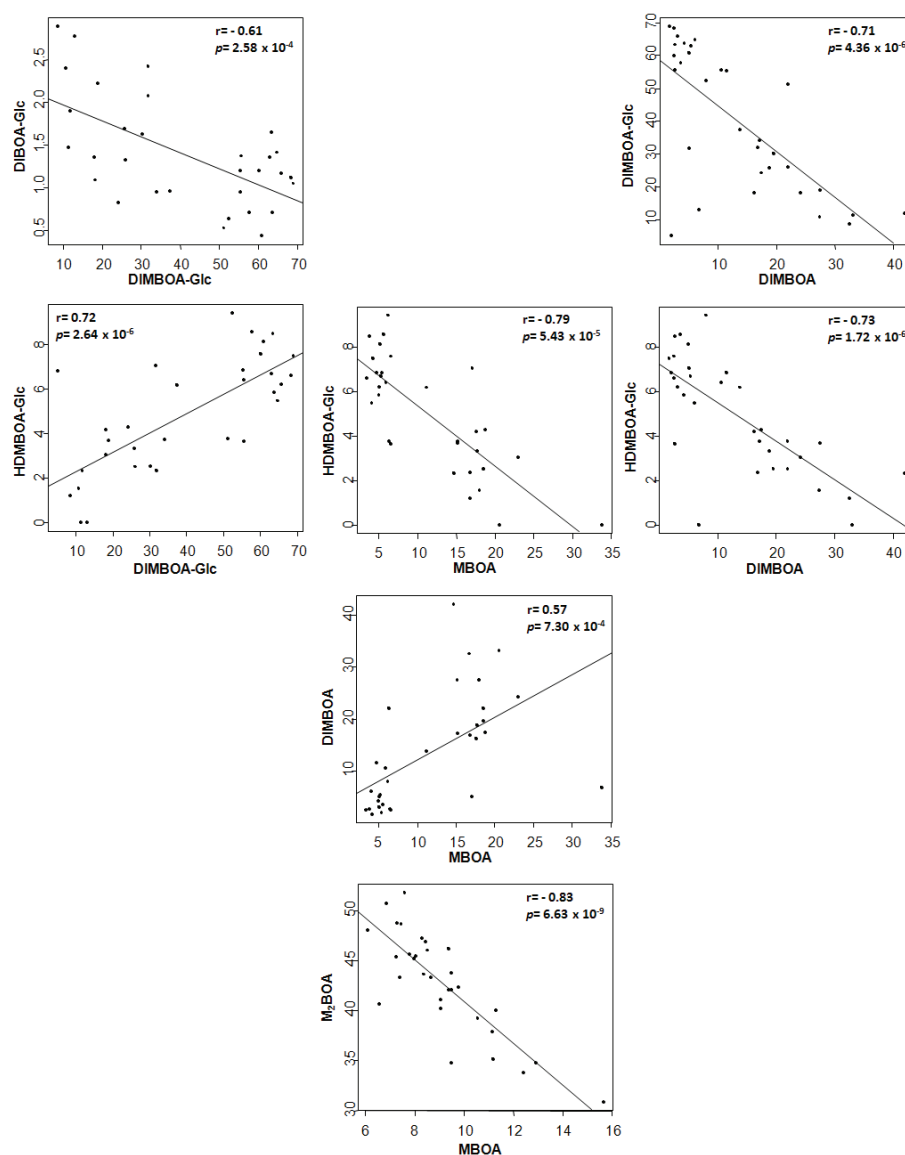


Figure 32: Pair-wise comparisons of intensity (%) in the main secondary metabolites identified in maize cultivars, based on all root and shoot samples from both cultivars and all treatments (n=32). Pearson correlation coefficient r was highly significant in each comparison ($P < 0.05$) and is indicated

3) Discussion

Although the effects of *Azospirillum* inoculation on plant growth often take several weeks to materialize (Arsac *et al.*, 1990; Jacoud *et al.*, 1998; Ribaud *et al.*, 2001), changes in enzymatic activities related to primary metabolism (Fallik *et al.*, 1988) and also sometimes in root growth, root hair growth and density, coleoptyle and/or hypocotyl length (Fulchieri *et al.*, 1993; Cassán *et al.*, 2009) may start earlier. On this basis, and considering our preliminary data (unpublished), we hypothesized that changes in plant metabolism that follow *Azospirillum* inoculation may be evidenced at a rather early stage, and we chose to sample maize 10 d after inoculation in the current work. Differences were observed between certain *Azospirillum* inoculants in terms of phytostimulation level, as found previously (Fages & Mulard, 1988).

We detected a wide range of secondary metabolites by profiling of maize tissues, the main compounds corresponding to benzoxazinoid derivatives, that is, benzoxazinones (Wahlroos & Virtanen, 1956; Gahagan & Mumma, 1967; Tipton *et al.*, 1967; Klun, 1970; Nagao *et al.*, 1985; Villagrasa *et al.*, 2006) and benzoxazolinones (Klun, 1970). On the one hand, this study provides confirmatory evidence that these compounds occur in maize (Klun et Robinson, 1969), as they do in other Poaceae (Tang *et al.*, 1975) and other plant families (Pratt *et al.*, 1995). Several biosynthetic steps are documented (Leighton *et al.*, 1994; Cambier *et al.*, 2000; Oikawa *et al.*, 2004; Jonczyk *et al.*, 2008; Morant *et al.*, 2008; Frey *et al.*, 2009), and our results are in accordance with these steps. For instance, strong negative correlations confirmed DIMBOA as a direct precursor of DIMBOA-Glc. Weaker correlations pointed to DIMBOA as distant precursor of both MBOA (as proposed by Oikawa *et al.*, 2004) and HDMBOA-Glc. On the other hand, the current results also identified additional possible biosynthetic transformations (Fig. 33). Indeed, a significant correlation (with $r = 0.72$) was

found between HDMBOA-Glc and DIMBOA-Glc, suggesting that DIMBOA-Glc is a precursor of HDMBOA-Glc. In addition, the significant correlation ($r = -0.83$) between MBOA and M₂BOA points to MBOA as a direct precursor of M₂BOA. These putative steps in benzoxazinoid biosynthesis were never identified before, and they lead to the proposition of a new model for benzoxazinoid metabolism (Fig. 33).

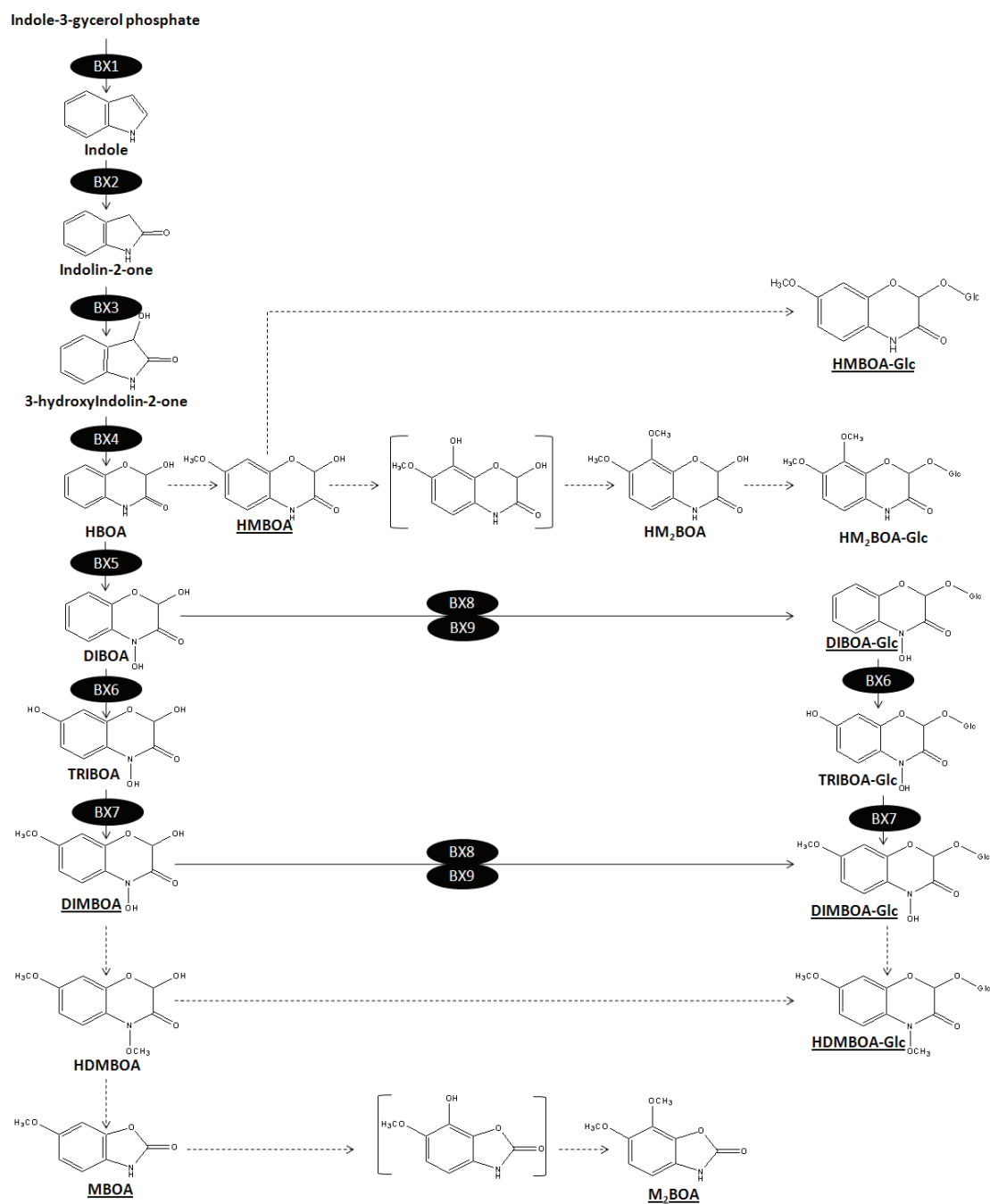


Figure 33: Hypothetical model proposed for benzoxazinone derivative pathway in maize. The model was adapted from Morant *et al.*, (2008), Jonczyk *et al.*, (2008), Eljarrat and Barcelo (2001), Leighton *et al.*, (1994), and Oikawa *et al.*, (2004), and completed with finding

Cambier *et al.*, (2000) showed that detection of certain benzoxazinoid-related compounds depended on maize variety and tissue. In this study, most benzoxazinoids were found both in roots and shoots. Nevertheless, in PR37Y15 cultivar, we detected HDMBOA-Glc only in roots and DIMBOA only in shoots. A difference was also observed for DK315 cultivar as we found DIM₂BOA and HMBOA only in roots (Table 8). This type of results is compatible with literature data. However, it must be kept in mind that biosynthesis sites of benzoxazinoids in plants and their translocation mechanisms between roots and shoots are essentially unknown, which limits possibilities of data interpretation.

Roots displayed mainly glycosylated derivatives for PR37Y15 cultivar, but only aglycone forms for DK315 cultivar. Since monocots elaborate secondary metabolites mainly under glycosidic forms, the sugar moiety being then removed by β -glucosidases in the vacuole membrane (Gruhnert *et al.*, 1994), this difference between both cultivars was probably due to a low β -glucosidase activity in PR37Y15 cultivar. Nevertheless, this difference could also be the consequence of an enhanced activity of BX8 and/or BX9 enzymes (leading to the transformation of DIMBOA to DIMBOA-Glc) in PR37Y15 (Morant *et al.*, 2008).

This work showed that the associative symbiosis between *Azospirillum* PGPR and maize had a significant impact on plant secondary metabolism. Indeed the secondary metabolite profiling proved effective to evidence inoculation effects on plant physiology by day 10, even though the experiment was carried out in nonsterile soil, in which roots were also exposed to a large, diversified microbial community (Sanguin *et al.*, 2006). These effects were not restricted to the particularity of the glasshouse experiment, as comparable effects were also recorded in the field at similar plant phenology for PR37Y15 exposed to inoculant *A. lipoferum* CRT1 (Fig. 31). The addition of phytohormones such as IAA or indole-3-butyric acid (IBA) (Rout, 2006; Jeong *et al.*, 2007) or changes in nitrogen availability (Baricevic *et*

al., 1999; Cañas *et al.*, 2009) may modify total plant contents in certain categories of secondary metabolites (e.g. total phenolics, alkaloids), but whether they would also lead to different profiles in individual secondary metabolites remains to be determined. Here, inoculation of maize seedlings changed the contents of several individual benzoxazinoids important for plant interactions. For instance, the cyclic hydroxamic acids DIMBOA and MBOA inhibit germination of wild oat (*Avena fatua*) (Pérez & Ormeño-Nuñez, 1991), and MBOA that of cress (*Lepidium sativum*) (Kato-Noguchi & Macías, 2006). In wheat (*Triticum aestivum*), DIMBOA and DIMBOA-Glc act as repellents towards aphids such as *Sitobion avenae* (Leszczynski *et al.*, 1990; Nicol *et al.*, 1992), and they inhibit the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* (Wilkes *et al.*, 1999). Antibacterial properties were reported for aglycone forms of hydroxamic acids such as DIMBOA and MBOA, which can inhibit *Agrobacterium tumefaciens* (Sahi *et al.*, 1990) and *Erwinia/Pectobacterium* spp. (Corcuera *et al.*, 1978). This can be ecologically relevant, because secondary metabolites may be exuded by roots and may be exuded in larger amounts in inoculated plants (Volpin *et al.*, 1996; Raja *et al.*, 2006). In addition to their role in plant defense, some benzoxazinoids can also interfere with plant hormone functioning. MBOA can impair binding of auxin to membrane receptors (Venis & Watson, 1978) and inhibit root growth up to 0.1 mM (Hasegawa *et al.*, 1992), while DIMBOA and auxin may have a synergistic effect on coleoptyle elongation (Park *et al.*, 2001). Therefore, the complex impact of *Azospirillum* on maize benzoxazinoids might have, in turn, multiple effects on plant development, plant health, and/or rhizobacterial community composition.

The impact of *Azospirillum* inoculants on maize secondary metabolism was strain-dependent, which suggests that the *Azospirillum* inoculants were recognized by the plant host and recognition might be strain specific. In cv PR37Y15, for instance, PCA discriminated among the three strains, but results suggested that *A. lipoferum* CRT1 and *A. brasilense* CFN-

535 favored the transformations of (i) DIMBOA to DIMBOA-Glc and (ii) DIMBOA or HDMBOA to HDMBOA-Glc, at the expense of the formation of MBOA from DIMBOA. By contrast, *A. brasilense* UAP-154 inoculation seemed to enhance the transformation of glycoside derivatives into aglycone forms (increasing DIMBOA content) and to inhibit BX8/BX9 enzymes (decreasing contents in HDMBOA-Glc and DIMBOA-Glc). Interestingly, this coincided with growth promotion pattern at 10 d, as *A. brasilense* UAP-154 inoculation was the only strain that also increased root biomass in that cultivar. The fact that some of the effects on maize PR37Y15 were similar for *A. lipoferum* CRT1 and *A. brasilense* CFN-535 but different for *A. brasilense* UAP-154 was unexpected, and suggests that strain differences were more important than the ones between species (*A. lipoferum* versus *A. brasilense*) and geographic origins (France for CRT1 versus Mexico for CFN-535 and UAP-154).

Interestingly, the strain-dependent impact of *Azospirillum* inoculants on maize secondary metabolism was not the same on both cultivars. *Azospirillum* inoculants had no phytostimulation effect on cultivar DK315, although the latter displayed inoculant-dependent variation of secondary metabolite profiles. This suggest that these bacteria can have strain-dependent effects on secondary metabolism of maize without influencing the physiological functions related to primary metabolism and involved directly in plant development and growth.

In conclusion, we have developed a novel approach to characterize the impact of PGPR bacteria on the physiology of maize grown in nonsterile soil, based on profiling of plant secondary metabolites. The findings indicated that inoculation resulted in strain-dependent effects on maize secondary metabolism, pointing to fine-tuned interaction mechanisms and interaction complexity. Secondary metabolite profiling resulted in the identification of benzoxazinoid compounds that may serve as early markers of effective

PGPR-maize interactions. Furthermore, this approach will also be relevant to explore the functioning of other types of plant-microbe interactions.

4) Materials and Methods

4.1 Organisms

The PGPR studied were the maize isolates *A. lipoferum* CRT1 from France (Fages & Mulard, 1988) and *A. brasilense* CFN-535 and UAP-154 from Mexico (Dobbelaere *et al.*, 2001). All three fix nitrogen and harbor the auxin biosynthesis gene *ipdC* (coding for the indole-3-pyruvate decarboxylase), but not the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene *acdS* (C Prigent-Combaret, unpublished). PR37Y15 is a semi-late maize hybrid (Pioneer Semences SAS, Aussonne, France) and DK315 a semi-early hybrid (Monsanto SAS/Dekalb, St Louis, MI, USA).

4.2. Bacterial inoculation

Zea mays L. seeds were surface-sterilized with a Bayrochlor mini solution (Bayrol 3 g l⁻¹; Bayrol, Planegg, Germany) for 15 min, under magnetic stirring, and rinsed 4-6 times with sterile water (one hour in total). They were pre-germinated 48 h at room temperature on 1% v/v water agar, which gave radicles about 1 cm (DK315) and 1-2 mm (PR37Y15) in length.

Azospirillum was grown in Luria-Bertani medium (Sambrook *et al.*, 1989) containing only 5 g l⁻¹ of NaCl (i.e. LBm; Pothier *et al.*, 2007), or Nfb medium (Nelson & Knowles, 1978) supplemented with 1/40 of LBm medium. Liquid pre-cultures were prepared from log-phase colonies by incubation (200 rpm, 28°C) for 16 to 18 h until an OD of 0.7 (at 600 nm), and cultures for seed inoculation were obtained the same way after transferring aliquots (CRT1 and CFN-535, 1% v/v; UAP-154, 2% v/v) into fresh broth. After centrifugation (8320

g, 10 min), the cells were washed twice in 10 mM magnesium sulfate buffer and the suspensions adjusted to $3\text{--}5 \times 10^8$ CFU ml⁻¹ based on OD measurements. Pre-germinated seeds were soaked 30 min in a cell suspension (giving $1\text{--}4 \times 10^7$ CFU seed⁻¹ in inoculation treatments) or in sterile water (noninoculated control).

4.3. Glasshouse experiment and plant extracts

Seedlings were transferred to 2-dm³ jars containing non-sterile, sieved (Ø 4 mm, sieve mesh size) loamy soil (16.2% clay, 43.9% silt, 39.9% sand, pH 7.0 in water, 2.1% of organic matter; El Zemrany *et al.*, 2006) from the surface horizon of a luvisol at the experimental farm of La Côte St André near Lyon (France). Each jars contained 4 seeds, and each treatment was studied using 8 jars. The jars were placed following a completely randomized design in a greenhouse at 20°C with 16 h of day (45% relative humidity) and 8 hours of night (65% relative humidity). Soil was watered to 20% w/w water content.

At 10 days after inoculation, plants were dug up and soil adhering to roots was discarded by washing with water. For each plant, roots and shoots were dipped each into liquid nitrogen to avoid enzymatic reactions, freeze-dried during 72 h (-54°C), and dry weight was determined.

For chromatographic analysis, freeze-dried roots and shoots were introduced each in an Eppendorf tube, to which liquid nitrogen was added. Roots and shoots were crushed using a ball mill (TissueLyser II, Quiagen® S.A., Courtaboeuf, France). Each plant part was extracted using 2 mL methanol for 10 mg of dry sample. Extraction was done twice and extracts were pooled and dried using Speedvac-assisted evaporation (Labconco, Kansas City, MO, USA). Each sample was then resuspended in methanol to reach 4 mg dry extract ml⁻¹.

4.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis

Chromatographic analysis of the extracts was achieved with an Agilent 1200 series HPLC equipped with a degasser (G132A), a quaternary pump module (G1311A), an automatic sampler (G1329A) and a Diode Array Detector (DAD G1315B). The separation was carried out at room temperature using a NUCLEODUR sphinx C18 column (250 × 4.6 mm; 5 µm-Macherey-Nagel®, Düren, Germany). For each sample, 20 µL of extracts was injected and the column was eluted at 1 mL min⁻¹, with an optimized gradient established using solvents A (acetic acid 4 ‰ (v/v) in water) and B (acetic acid 4 ‰ (v/v) in acetonitrile) (Carloerba ® reagents, Val de Reuil, France). For root extracts, a step by step gradient was used with an increase of proportion of solvent B until 15% during 5 min, then an isocratic level from 30 min, with a flux of 1 mL min⁻¹. For shoot extracts, separation was carried out with the same column, with a linear gradient of acetonitrile in water from 0% to 100% in 55 min (for PR37Y15) or 10% to 100% in 50 min (for DK315). Chromatograms were recorded and processed at 280 nm, which enabled recovery of all metabolites recorded at other wavelengths (even though flavonoids were more intense at 254 or 366 nm, and cinnamic acids at 310 nm). The Chemstation Agilent software was used for integration and comparison of chromatograms. Each chromatogram was integrated after standardization of integration parameters. Background peaks present on chromatograms were not integrated.

4.5 Liquid chromatography/ mass spectrometry analysis

Separation of compounds for mass spectrometry analysis of extracts was achieved using an Agilent 1100 series HPLC equipped with a degasser (G1322A), a binary pump module (G1312A), an automatic sampler (G1313A) and a Diode Array Detector (DAD G1314A). The separation was carried out at room temperature using a NUCLEODUR sphinx

C18 column (250 × 4.6 mm; 5 µm; Macherey-Nagel). HPLC was interfaced with a HP MSD 1100 series (Agilent Technologies, Santa Carla, CA, USA). Each chromatogram was automatically integrated using CHEMSTATION software and then reprocessed manually for better standard integration of minor peaks.

Mass spectrometry operating conditions were gas temperature 350°C at a flow rate of 10 l N₂/min, nebulizer pressure 30 p.s.i., quadripole temperature 30°C, capillary voltage 4000 V and fragmentor 100. Full scan spectra from m/z 100 to 800 in both positive and negative ion modes were recorded. These parameters allowed the use of analytical conditions similar to those used for HPLC-DAD analysis.

4.7. Purification and identification of selected secondary metabolite

For purification of secondary metabolite 8, roots of 200 10-day-old PR37Y15 plantlets grown in perlite medium (Durantin SA, Charly, France) were harvested and pooled. The methanolic extract of the pooled sample was dried and 337 mg dry extract was collected. The extract was adsorbed on Lichoprep RP18 silica (Lichoprep RP18, 25-40 µm, 460 × 25 mm; Merck®, Darmstadt, Germany) in order to perform a MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography). Phytoconstituents were eluted with 2.5 ml min⁻¹ of an optimized gradient prepared with water and acetonitrile (Carloerba reagents). Step by step gradient was carried from 0% to 50% of acetonitrile during 14 h by levels of 10%.

The fractions were analyzed by RP-TLC (RP18 F254, Merck) in the following solvent system: water 62.5, acetonitrile 37.5 + 0.4% acetic acid (Carloerba reagents). Six homologous fractions, eluted with 30% of acetonitrile and identified based on UV absorbance, were dried using Speedvac-assisted evaporation and pooled, giving 1.1 mg of dried extract. The latter

was then submitted to a semi-preparative HPLC (C18 NUCLEODUR 260 × 10 mm, 5 µm, Macherey-Nagel), affording 0.8 mg of pure compound 8.

Pure compound 8 was dissolved in methanol-d₄-D₂O (1:1) and submitted to ¹H and ¹³C monodimensional and bidimensional homonuclear NMR ¹H-¹H COSY (Correlation Spectroscopy), heteronuclear ¹H-¹³C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) and ¹H-¹³C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) (Bruker DRX 500, Bruker biospin, Madison, NI, USA) analysis with solvent used as reference. NMR spectra were reprocessed thanks to MESTRENOVA 5.3.0 software (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

4.6. Analysis of maize secondary metabolites in different experiments

To assess whether the same inoculation effects were found under different experimental conditions, root secondary metabolites of maize cv PR37Y15 inoculated or not with *A. lipoferum* CRT1 and grown in two maize soils comparable to the Côte St André soil were assessed, as already described. One inoculation experiment was a field trial (clay loam soil; sampling at 16 d) and the other a greenhouse trial (clay loam soil; sampling at 35 d).

4.7. Statistical analysis

In the main experiment, the effects of treatments were studied by ANOVA followed with Tukey tests ($P < 0.05$). The retention time of each peak of chromatograms (at 280 nm) was aligned and its relative intensity recorded in a matrix to perform a discriminant principal component analysis (PCA). Relationships between compounds (on the basis of relative peak areas) were compared using Pearson correlation coefficient ($P < 0.05$). Discriminant PCA was

also used to compare secondary metabolic profiles with those obtained under different experimental conditions.

All analyses were performed using R software (v2.4 Open Source, <http://www.r-project.org/>)

5) Conclusion

This study was an original approach to characterize effects of a PGPR interaction on plant functioning. We have shown that at ten days after inoculation *Zea mays* L. PR37Y15 cultivar interacts with various phytostimulatory bacteria with an increase of shoot biomass, but only one (*Azospirillum brasilense* UAP-154) can induced a root promotion at this developmental step. These effects were accompanied by modifications in terms of metabolic balance by the compounds identified like benzoxazine derivatives. Concerning DK315 cultivar, no stimulatory effect was observed and biosynthesis modifications induced by inoculation concerned mainly minor compounds.

This study showed that secondary metabolite profiling was a useful approach to evidence changes in the physiology of soil-grown maize induced by inoculation with *Azospirillum* PGPR. It resulted in the identification of benzoxazine compounds that may serve as early markers of effective PGPR-maize interactions. It is expected that this approach will also be relevant to explore the functioning of other types of plant-microbe interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the European Union (FW6 STREP project MicroMaize 036314). We are grateful to J. Caballero-Mellado (UNAM, Cuernavaca, México) for providing strains, J. Jansa and colleagues (ETH Zürich, Switzerland) for help with

greenhouse trials, and P. Castillon (Arvalis, Baziège, France) for supplying seeds. We thank D. Desbouchages (IFR41, Université Lyon 1) for help with greenhouse experiments. This work made use of the platforms CESN (UMR CNRS 5557 Ecologie microbienne) and Serre (IFR 41) in Université Lyon 1.

References

- Ait Barka E, Nowak J, Clément C. 2006.** Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:7246-7252.
- Arsac JF, Lamothe C, Mulard D, Fages J. 1990.** Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: Effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* **10**:649-654.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. 2004.** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* **50**:521-577.
- Bashan Y, Bustillos JJ, Leyva LA, Hernandez JP, Bacilio M. 2006.** Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* **42**:279-285.
- Baricevic D, Umek A, Kreft S, Maticic B, Zupancic A. 1999.** Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in the roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Environmental and Experimental Botany* **42**:17-24.
- Baudoin E, Lerner A, Mirza MS, El Zemrany H, Prigent-Combaret C, Jurkevich E, Spaepen S, Vanderleyden J, Nazaret S, Okon Y, Moënne-Loccoz Y. 2010.** Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. *Research in Microbiology* **161**:219-226.
- Çakmakç R, Erat M, Erdoğan Ü, Figen Dönmez M. 2007.** The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **170**:288-295.
- Cambier V, Hance T, de Hoffmann E. 2000.** Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochemistry* **53**:223-229.
- Cañas RA, Quilleré I, Christ A, Hirel C. 2009.** Nitrogen metabolism in the developing ear of maize (*Zea mays*): analysis of two lines contrasting in their mode of nitrogen management. *New Phytologist* **184**:340-352.
- Cartieaux F, Thibaud MC, Zimmerli L, Lessard P, Sarrobert C, David P, Gerbaud A, Robaglia C, Somerville S, Nussaume L. 2003.** Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal* **36**:177-188.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V. 2009.** *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* **45**:28-35.
- Cheng Z, McConkey BJ, Glick BR. 2010.** Proteomic studies of plant–bacterial interactions. *Soil Biology and Biochemistry* (doi:10.1016/j.soilbio.2010.05.033).

- Corcuera LJ, Woodward MD, Helgeson JP, Kelman A, Upper CD. 1978.** 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species. *Plant Physiology* **61**:791-795.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y et al. 2001.** Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**:871-879.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. 2003.** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Review of Plant Science* **22**:107-149.
- Eljarrat E, Barcelo D. 2001.** Sample handling and analysis of allelochemical compounds in plants. *Trends in Analytical Chemistry* **20**:584-590.
- El Zemrany H, Cortet J, Peter Lutz M, Chabert A, Baudouin E, Haurat J, Maughan N, Felix D, Défago G, Bally R, Moënné-Loccoz Y. 2006.** Field survival of the phytostimulatory *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:1712-1727.
- Fages J, Mulard D. 1988.** Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pot chez *Zea mays*. *Agronomie* **8**:309-314.
- Fallik E, Okon Y, Fisher M. 1988.** Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biology & Biochemistry* **20**:45-49.
- Fallik E, Sarig S, Okon Y. 1994.** Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: Y Okon, eds, *Azospirillum/Plant Associations*, Boca Raton, Florida. CRC Press, 77-85.
- Frey M, Schullehner K, Dick R, Fiesselmann A, Gierl A. 2009.** Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* **70**:1645-1651.
- Fulchieri M, Lucangeli C, Bottini R. 1993.** Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant and Cell Physiology* **34**:1305-1309.
- Gahagan HE, Mumma RO. 1967.** The isolation of 2-(2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one) β -D-glucopyranoside from *Zea mays*. *Phytochemistry* **6**:1441-1448.
- Gruhnert C, Biehl B, Selmar D. 1994.** Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. *Planta* **195**:36-42.
- Hartman T. 2007.** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**:2831-2846.
- Hasegawa K, Togo S, Urashima M, Mizutani J, Kosemura S, Yamamura S. 1992.** An auxin-inhibiting substance from light-grown maize shoots. *Phytochemistry* **31**:3673-3676.
- Jacoud C, Faure D, Wadoux P, Bally R. 1998.** Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. *FEMS Microbiology Ecology* **27**:43-51.
- Jacoud C, Job D, Wadoux P, Bally R. 1999.** Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Canadian Journal of Microbiology* **45**:339-342.
- Jain DK, Patriquin DG. 1984.** Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Applied and Environmental Microbiology* **48**:1208-1213.
- Jeong GT, Woo JC, Park DH. 2007.** Effect of plant growth regulators on growth and biosynthesis of phenolic compounds in genetically transformed hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **12**:86-91.
- Jonczyk R, Schmidt H, Osterrieder A, Fiesselmann A, Schullehner K, Haselbeck M, Sicker D, Hofmann D, Yalpani N, Simmons C et al. 2008.** Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: Characterisation of Bx6 and Bx7. *Plant Physiology* **146**:1053-1063.
- Kato-Noguchi H, Macías FA. 2006.** Possible mechanism of inhibition of 6-methoxy-benzoxazolin-2(3H)-one on germination of cress (*Lepidium sativum* L.). *Journal of Chemical Ecology* **32**:1101-1109.

- Klun JA, Robinson JF. 1969.** Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer. *Journal of Economical Entomology* **62**:214-220.
- Klun JA, Tipton CL, Robinson JF, Osterm DL, Beroza M. 1970.** Isolation and identification of 6,7-dimethoxy-2-benzoxazolinone from dried tissues of *Zea mays* (L.) and evidence of its cyclic hydroxamic acid precursor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **18**:663-665.
- Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P. 2009.** Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* **321**:83-115.
- Leighton V, Niemeyer HM, Jonson LMV. 1994.** Substrate specificity of a glucosyltransferase and an N-hydroxylase involved in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in *Gramineae*. *Phytochemistry* **36**:887-892.
- Leszczynski B, Dixon AFG. 1990.** Resistance of cereals to aphids: Interaction between hydroxamic acids and the aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). *Annals of Applied Biology* **119**:21-30.
- Manuwoto S, Scriber JM. 1985.** Consumption and utilization of experimentally altered corn by southern armyworm: Iron, nitrogen, and cyclic hydroxamates. *Journal of Chemical Ecology* **11**:1469-1483.
- Miché L, Battistoni F, Gemmer S, Belghazi M, Reinhold-Hurek B. 2006.** Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**:502-511.
- Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen J, Paquette SM, Sánchez-Pérez R, Møller BL, Bak S. 2008.** β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **69**:1795-1813.
- Nagao T, Otsuka H, Kohda H, Sato T, Yamasaki K. 1985.** Benzoxazinones from *Coix lachrymal-jobi* var. *Ma-yuen*. *Phytochemistry* **12**:2959-2962.
- Nelson LM, Knowles R. 1978.** Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. *Canadian Journal of Microbiology* **24**:1395-1403.
- Nicol D, Copaja SV, Wratten SD, Niemeyer HM. 1992.** A screen of worldwide wheat cultivars for hydroxamic acid levels and aphid antixenosis. *Annals of Applied Biology* **121**:11-18.
- Oikawa A, Ishihara A, Tanaka C, Mori N, Tsuda M, Iwamura H. 2004.** Accumulation of HDMBOA-Glc is induced by biotic stresses prior to the release of MBOA in maize leaves. *Phytochemistry* **65**:2995-3001.
- Park WJ, Schäfer A, Prinsen E, van Onckelen H, Kang BG, Hertel R. 2001.** Auxin-induced elongation by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Planta* **213**:92-100.
- Pérez FJ. 1990.** Allelopathic effect of hydroxamic acids from cereals on *Avena sativa* and *Avena fatua*. *Phytochemistry* **29**:773-776.
- Pothier JF, Wisniewski-Dyé F, Weiss-Gayet M, Moënné-Loccoz Y, Prigent-Combaret C. 2007.** Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* **153**:3608-3622.
- Pratt K, Kumar P, Chilton WS. 1995.** Cyclic hydroxamic acids in dicotyledonous plants. *Biochemical Systematics and Ecology* **23**:781-785.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y. 2009.** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* **321**:341-361.
- Raja P, Uma S, Gopal G, Govindarajan K. 2006.** Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. *Journal of Biological Sciences* **6**:815-823.
- Remans R, Beebe S, Blair M, Manrique G, Tovar E, Rao I, Croonenborghs A, Torres-Gutierrez R, El-Howeity M, Michiels J, Vanderleyden J. 2008.** Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* **302**:149-161.

- Ribauda CM, Rondanini DP, Curá JA, Fraschina AA. 2001.** Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biologia Plantarum* **44**:631-634.
- Richardson A, Barea JM, McNeill A, Prigent-Combaret C. 2009.** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* **321**:305-339.
- Rout G. 2006.** Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Plant Growth Regulation* **48**:111-117.
- Sahi SV, Chilton MD, Chilton WS. 1990.** Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**:3879-3883.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Laboratory Press.
- Sanguin H, Remenant B, Dechesne A, Thioulouse J, Vogel TM, Nesme X, Moënné-Loccoz Y, Grundmann GL. 2006.** Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:4302-4312.
- Singh UP, Sarma BK, Singh DP. 2003.** Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*). *Current Microbiology* **46**:131-140.
- Tang CS, Chang SH, Hoo D, Yanagihara KH. 1975.** Gas chromatographic determination of 2(3)-benzoxazolinones from cereals plants. *Phytochemistry* **14**:2077-2079.
- Tipton CL, Klun JA, Husted RR, Pierson MD. 1960.** Cyclic hydroxamic acids and related compounds from maize. Isolation and characterization. *Biochemistry* **6**:2866-2868.
- Venis MA, Watson PJ. 1978.** Naturally occurring modifiers of auxin-receptor interaction in corn: Identification as benzoxazolinones. *Planta* **142**:103-107.
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004.** The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**:895-908.
- Villagrasa M, Guillaumon M, Eljarrat E, Barceló D. 2006.** Determination of benzoxazinone derivatives in plant by combining pressurized liquid extraction-solid-phase extraction following by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:1001-1008.
- Volpin H, Burdman S, Castro-Sowinski S, Kapulnik T, Okon Y. 1996.** Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**:388-394.
- Wahlroos O, Virtanen AI. 1959.** The precursors of 6-methoxybenzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties. *Acta Chemica Scandinavica* **13**:1906-1908.
- Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. 2005.** Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**:385-396.
- Wilkes MA, Marshall DR, Copeland L. 1999.** Hydroxamic acids in cereal roots inhibit the growth of take-all. *Soil Biology & Biochemistry* **31**:1831-1836.

CHAPITRE 4 :

RÉPONSE MÉTABOLIQUE DU MAÏS À L'INOCULATION D'UN CONSORTIUM MICROBIEN AU CHAMP

INTRODUCTION

Au cours des chapitres précédents, nous avons pu observer une réponse de la plante hôte au niveau de son métabolisme, dépendante de la souche bactérienne PGPR phytostimulatrice utilisée. Parmi les bactéries PGPR nous distinguons également les bactéries dites biocontrôles qui peuvent protéger la plante par la synthèse d'antibiotiques comme le DAPG ou encore par la synthèse de sidérophores pour la compétition des ressources en fer. Dans le premier chapitre, nous avons vu que le DAPG induisait la résistance systémique induite (Iavicoli *et al.*, 2003) mais également des changements au niveau du contenu phytochimique de la plante hôte (Singh *et al.*, 2003). De plus, certains champignons mycorhiziens présents dans la rhizosphère peuvent améliorer la biodisponibilité du phosphate inorganique et confèrent à la plante hôte une biodisponibilité des nutriments améliorée (Tobar *et al.*, 1994) par une plus grande exploration du sol par les hyphes fongiques. Par ailleurs, il a été montré que les bactéries du genre *Pseudomonas* étaient des bactéries auxiliaires de la mycorhization (MHB mycorrhiza helper bacteria) des plantes par les Champignons mycorhyziens à Arbuscules (CMA) (Duponnois & Planchette, 2003; Alexandre *et al.*, 2004). Ces bactéries peuvent améliorer la colonisation fongique dans la racine. Une inoculation fongique induit également des modifications du contenu chimique de la plante hôte (Jones, 1924; Jaiti *et al.*, 2008) comme une accumulation de caroténoïdes.

Si les effets d'inoculations simples de ces micro-organismes sur le contenu phytochimique de la plante hôte sont toutefois peu documentés, des inoculations mixtes ne sont pas étudiées sur le point de vue de la physiologie de la plante. Par ailleurs, au sein de la rhizosphère de la plante hôte, une multitude d'espèces microbiennes coexistent et peuvent avoir des effets en termes de réponse de la plante qui se traduirait par une adaptation de sa synthèse en métabolites secondaires.

Les autres chapitres démontrent que le métabolisme végétal s'adapte à la souche bactérienne nous nous demandons donc qu'en est-il en cas d'interactions entre la plante et un consortium mixte, situation beaucoup plus proche de la réalité environnementale. Ainsi nous pourrions évaluer l'effet d'un consortium mixte sur la physiologie de la plante hôte et évaluer si ces effets sont synergiques, additifs ou neutres. Nous nous intéresserons donc, dans ce chapitre, à l'impact sur la physiologie de la plante hôte de ces trois types de micro-organismes en inoculation simple, double, ou combinée. Cette partie fait l'objet d'une publication en préparation qui sera soumise à Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Maize metabolic variations induced by microbial consortia in field experiment

Vincent Walker^{1,2,3}, Olivier Couillerot^{1,2,3}, Floriant Bellvert^{1,2,3}, Yvan Moënnelocoz^{1,2,3}, René Bally^{1,2,3}, Gilles Comte^{1,2,3}

Pierre Castillon⁴

Carolin Schwer⁵, Andreas Von Feltel⁵,

Jan Jansa⁶

¹Université de Lyon, F-69622, Lyon, France

²Université Lyon 1, Villeurbanne, France

³CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France

⁴Arvalis Institut du Végétal

⁵Institute of Integrative Biology, ETH, CH-8092 Zürich, Switzerland

⁶Institute of Plant Sciences, ETH, Eschikon, CH-8315 Lindau, Switzerland

Corresponding author: Gilles Comte:

Tel: +33 4 72 44 82 05

Fax: +33 4 72 43 14 26

E-mail: gilles.comte@univ-lyon1.fr

Journal: Journal of Agricultural and Food Chemistry

ABSTRACT

Most microbes benefit plant growth was studied in terms of plant morphology with single inoculation. But in environment, plants were submitted to various beneficial microbes including fungus inducing probably some modifications on plant secondary metabolism.

This hypothesis was assessed by comparing the early impacts of mixed inoculants and mineral fertilization on secondary metabolite profiles on maize.

After 16 days of growth in field, maize methanolic extracts were analyzed by RP-HPLC and secondary metabolites identified by LC/MS.

Seed inoculation resulted in no significant effect on plant biomass. In contrast, each single microbe inoculation led to major qualitative and quantitative modifications of maize contents in secondary metabolites, especially benzoxazinoids and diethylphthalate. These modifications depended on the strain but not to microbe combination. In addition, mineral fertilization and consortia inoculation induced an increase of metabolic content with same variation than low fertilization.

Thus, single inoculation resulted in early, strain-dependent modifications in the biosynthetic pathways of benzoxazine derivatives and diethylphtalate of maize. This is the first study documenting a PGPR effect on plant secondary metabolite profiles in field experiment, and it points to the establishment of complex interactions between inoculants and maize.

Additionnal keywords: Mixed consortia, metabolite profiling, fertilization, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Glomus*, *Zea mays* L.

Introduction

Conventional agriculture is highly dependent on chemical inputs, including pesticides and fertilizers in order to maintain high yields. However, this has a deep impact on the natural environment through soils and groundwater pollution. These agricultural practices were unsustainable in the long term. To maintain productivity, while reducing chemicals inputs, plant varietal selection has been developed as a strategy. However other solutions remain in particular using beneficial microbes as inoculants. Indeed some rhizobacteria named plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are involved in plant promotion in various ways. First, free living bacteria belong to the *Azospirillum* genus can exert a beneficial effect on host plant and plant nutrition by free atmospheric nitrogen fixation, nutrients bioavailability improvement and phytohormones excretion (Bashan *et al.*, 1990; Dobbelaere *et al.*, 2003). Moreover, some fluorescent Pseudomonads are involved in soil suppression of various soil borne pathogens including nematodes, bacteria, fungi or viruses (Haas & Defago, 2005). Their biocontrol potential depends on (i) antibiotic metabolites production (such as diacetylphloroglucinol) and (ii) siderophores production involved in iron competition (Weller *et al.*, 2007; Cornelis, 2010). In addition, among the symbiotic microorganisms, mycorrhizal fungi establish mutualistic associations with more than 80 % of plant species, including crop plants. Mycorrhizal fungi are well known to improve mineral uptake, tolerance to water stress, soil aggregation ... (Raju *et al.*, 1990; Subramanian *et al.*, 1995; Rillig & Mummey, 2006). Furthermore, microbial interactions occurring in inoculums, could notably improve these beneficial effects. Indeed, some PGPR such as fluorescent pseudomonads or *Azospirillum* genres can enhance the mycorrhizal colonisation of AMF when co-inoculated on plant (Volpin & Kapulnik, 1994; Frey-Klett *et al.*, 2007). Moreover, despite the inhibitory effect of antimicrobial compound synthesized by fluorescent

Pseudomonads, (DAPG), *Azospirillum* is not affected for growth *in vitro* and in soil conditions (Couillerot *et al.*, 2010).

We recently have described the modification of plant metabolites in inoculated conditions with *Azospirillum* strains (Walker *et al.*, accepted). In this study we have shown a modulation of benzoxazinoïdes content (especially MBOA, DIMBOA-Glc) in roots and shoots, and also a modification of phenolic compounds according to the inoculated *Azospirillum* strain. In addition, some authors have investigated metabolic variation induced by a *Pseudomonas fluorescens* PGPR strain inoculation or AMF inoculations (Singh *et al.*, 2003; Schliemann *et al.*, 2008). However, all these experiments on metabolic variation correlated to microbial inoculations were performed with a single microbial inoculation. Few studies have focused on morphological/physiological effect of dual inoculums concerning *Azospirillum* with (i) *Bacillus* (El-komy, 2005), (ii) *Bradyrhizobium* (Steinberg *et al.*, 1989; Cassán *et al.*, 2009), (iii) phosphate-solubilizing bacteria (*Arthobacter* or *Agrobacterium*) (Belimov *et al.*, 1995), (iv) *Rhizobium* (Remans *et al.*, 2008), and (v) *Glomus* (Mar Vázquez *et al.*, 2000). Two studies have focused on interactions established in complex *Azospirillum* mixed-inocula involving more than two microorganisms, such as (i) *Rhizobium* and AMF, and (ii) *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, and *Herbaspirillum* (Oliveira *et al.*, 2009; Biró *et al.*, 2000). Among these papers, none of them have considerate impact on plant secondary metabolites, but only morphological parameters and bacterial compatibility. Concerning the impact of microbial inoculation on secondary metabolism, the literature shows only one study dealing with co-inoculations involving *G. intrardices*, *P. fluorescens* or *R. leguminosarum* (Fester *et al.*, 1999). In conclusion, the literature shows that data beggin to be available about the individual effects of these microorganisms on plant metabolic synthesis. However, very little is known about effect of mixed inoculants on this metabolim in field conditions.

In this work, we study the effect of combination of microorganisms with different metabolic capacities (N₂-fixation, P-mobilization, production of phytohormones and antibiotics, etc.). We wonder if there are (i) additive effects resulting from the combination of all phytobeneficial capacities on plant metabolites, or (ii) synergistic effects, which would be enhanced compare to single inoculation effects or (iii) negative effects which would decrease compare to individual effects. In order to answer to this question, we analyzed maize secondary metabolites variation induced by various inoculation conditions in field experiment with a single, double or mix consortia composed with *Azospirillum lipoferum* CRT1, *Pseudomonas fluorescens* F113 and a *Glomus intraradices* JJ291. In addition we assessed plant metabolites at high level of mineral fertilizer in non-inoculated and mix consortia inoculation conditions.

Material and methods

Biological material

Zea mays L. cultivar PR317Y15, a semi late maize hybrid (Pioneer Semences SAS, Aussonne, France), was sown in a field (44°49'11.60" N, 4°53'22.44" E) located at Pouzol Etoile near Valence (France), in the Arvalis experimental station. The soil contains 30.7% of sand, 48.2% of silt, 19.1% of clay, and has a pH of 7.67. The soil had 1.77% of organic matter. The P, K, Mg and Ca content was respectively 62, 186, 140 and 4954 mg.kg⁻¹.

PGPR bacteria used for this experiment were *Azospirillum lipoferum* CRT1, recovered from maize in France (Fages & Mulard, 1988), *Pseudomonas fluorescens* F113 isolated from sugar beet in Ireland (Fenton *et al.*, 1992). The mycorrhizal inoculum consisted of a mixture of the Swiss isolates *Glomus intraradices* JJ291 (Jansa *et al.*, 2005). Inoculation was done with one, two or three microbial partners.

The experimental design was in randomized blocks (four blocks) each including 10 treatments. Each treatment contains 8 rows of at least 10 m long (80 cm spacing). Seeds were sown on the May 12th 2009.

Fertilization implemented was N1P0 (i.e. N at the local optimal dose minus 80 kg N ha⁻¹ and no P fertiliser) or N2P1 (i.e. N and P fertilisers at the local optimal doses). Treatments were low fertilization with control plants, simple inoculation with *A. lipoferum* CRT1 or *P. fluorescens* F113 or *G. intraradices* JJ291, double inoculation with CRT1/F113 or CRT1/JJ291 or F113/JJ291 and consortium with the three microbes. Another kind of inoculation was performed with a high level of fertilization with only control plant and the three component consortia. Among all plants for each treatment 4 plants were used for metabolomic analysis.

Microorganism inoculation

Azospirillum lipoferum CRT1 was inoculated by coating seeds with an inoculated peat (10⁹ CFU/g) and *Pseudomonas fluorescens* F113 was inoculated with a clay bead contained 5.10⁷ CFU/g under the seed thanks to Agrauxine protocol. Each was prepared in plant cultures following commercial procedures by Symbio-M (Lanskroun, Czech Republic). Mycorrhized roots were chopped, mixed together with zeolite carrier. Inoculum product contained 5.3 × 10⁴ (*G. intraradices* JJ291), gene copies of the nuclear Large Ribosomal Sub-Unit (nLSU) per g. For coinoculations, *G. intraradices* on zeolite carrier and clay bead containing *Pseudomonas fluorescens* were inoculated together under the seed.

Measurement of maize biomass

Plants were harvested on the May 28th, 2009 (16 days of growth). Maize plants were dug up and root adhering soil was discarded by washing with water. For each plant, individual samples were dipped into liquid nitrogen, freeze-dried during 72 h (-54°C), and dry weight was determined.

Metabolic analysis

Metabolic analysis was performed on 16 days of growth plantlets. A total of 4 repetitions of 10 treatments were used and each sample was performed as follow. Four plants were taken per plot for the 10 treatments studied. Root systems dipped into dry ice for transport (to avoid degradations) were then stored at -20°C until extraction steps.

Freeze-dried roots were introduced in an Eppendorf tube, together with liquid nitrogen. Roots were then crushed using a ball mill (TissueLyser II, Quiagen® S.A., Courtaboeuf, France). Each root system was extracted using 3 ml of methanol for 200 mg of dried material. Extraction was done twice and extracts were pooled (4 plant extracts per plot) and dried using Speedvac®-assisted evaporation. Each sample was then resuspended in methanol to adjust to 10 mg.ml⁻¹ of extract.

Chromatographic analysis was achieved with an Agilent 1200 series HPLC equipped with a degasser (G132A), a quaternary pump module (G1311A), an automatic sampler (G1329A) and a Diode Array Detector (DAD G1315B). The separation was carried out at room temperature using a NUCLEODUR sphinx C18 column (250 × 4.6 mm; 5 µm-Macherey-Nagel®, Düren, Germany). For each sample, 20 µl of extract was injected and the column was eluted at 1 ml.min⁻¹, with an optimized gradient established using solvents A (acetic acid 4 ‰ (v/v) in water) and B (acetic acid 4 ‰ (v/v) in acetonitrile) (Carloerba ®

reagents, Val de Reuil, France). The used gradient was an increase of solvent B (15% to 40 % in 20 min.), then isocratic conditions during 15 min, then increase of solvent B (40% to 70% in 25 min.) and finally an increase of solvent B (70% to 100% in 5 min.). 3D data were recorded and specific wavelengths at 254, 280, 310, and 366 nm were chosen for processing. The Chemstation Agilent software was used for integration and comparison of chromatograms. Each chromatogram was integrated after standardization of integration parameters. Background peaks (areas less than 1% of total peakery areas) present on chromatograms were not integrated.

Molecules identification and purification

Molecule **12** was purified in semi preparative HPLC and identified via GC/MS analysis. All extracts of *P. fluorescens* F113 treatment were pooled and concentrated before semi preparative HPLC. Purification of this compound was done thanks to Varioprep Sphinx NUCLEODUR column (250 × 10 mm, 5 µm). The column was eluted at 2 ml/min, with optimized gradient established using solvents A (in water) and B (in acetonitrile) (Carloerba® reagents, Val de Reuil, France). Compounds (50 µl per injection) were eluted with a step by step gradient: increased of solvent B (70% to 86 %) in 10.5 min., then increase of solvent B (86% to 100%) in 2.5 min. Molecule **12** was collected and concentrated in order to perform a GC/MS analysis. 1 µl of purified molecule was injected and eluted in GS/MS using a HP5 GC column (0.25µm × 30 m), with a nitrogen flow of 15 ml/min, a step by step temperature gradient with an increase from 60 to 320°C with 10°C/min. Determination of chemical structure of molecule **12** was performed by comparison with mass spectra library (NIST and Wiley libraries).

All other compounds were identified in HPLC/MS. Separation of compounds for mass spectrometry analysis of extracts was achieved using an Agilent 1100 series HPLC equipped

with a degasser (G1322A), a binary pump module (G1312A), an automatic sampler (G1313A) and a Diode Array Detector (DAD G1314A). The separation was carried out at room temperature using a NUCLEODUR sphinx C18 column (250 × 4.6 mm; 5 µm-Macherey-Nagel®). HPLC was interfaced with a HP MSD 1100 series. Each chromatogram was automatically integrated using Chemstation software (Agilent®) and then reprocessed manually for better standard integration of minor peaks.

Mass spectrometry operating conditions were gas temperature 350°C at a flow rate of 10 l N₂ min⁻¹, nebulizer pressure 30 p.s.i., quadripole temperature 30°C, capillary voltage 4000 V and fragmentor 100. Full scan spectra from m/z 100 to 800 in both positive and negative ion modes were recorded. These parameters allowed the use of analytical conditions similar to those used for HPLC-DAD analysis. Identification of each compound was performed by interpretation of each mass spectra and comparaison with literature data.

Statistics

Treatments were studied by ANOVA followed with Tukey's tests ($P < 0.05$). Retention time of each chromatographic peak (at 280 nm) was aligned and its relative intensity recorded in a matrix to perform discriminant principal component analysis (PCA). All analyses were performed using R software (v2.4 Open Source, <http://www.r-project.org/>).

Results

Early plant growth parameters

Root biomass was assessed at 16 days for 10 treatments. Inoculations with *Glomus intraradices* JJ291 alone at low fertilization level or consortium at high fertilization level

gave a lower root biomass in comparison with negative control at normal level or high level of fertilization. There was no significant difference when other treatments were compared with the two non-inoculated controls (Figure 34). Moreover, we observe that phytostimulatory effects of consortium at a normal level of fertilization give similar result that negative control with a high level of fertilization. In addition, presence of *Azospirillum lipoferum* CRT1 in consortium seems to affect positively the root biomass even if it is not significant.

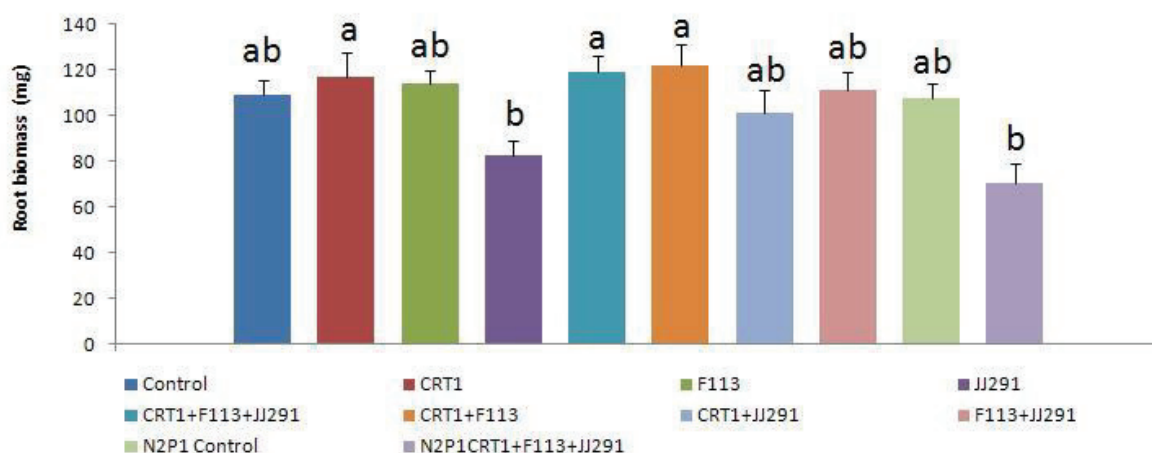


Figure 34: Measurement of maize root biomass of each inoculation treatment. Different letters represent statistical differences following ANOVA test. CRT1 correspond to *A. lipoferum* CRT1, F113 to *P. fluorescens* F113, JJ291 to *Glomus intraradices* JJ291. N2P2 correspond to a high level of fertilization.

Identification of unknown compound

Mass spectra recorded both in negative and positive modes allowed us to perform identification of each major secondary metabolite found in maize tissues and fragmentation were in accordance to previous study (Walker *et al.*, 2010). A striking observation was the strong accumulation of an apolar compound in maize inoculated with *P. fluorescens* F113 alone. This compound was identified according GC/MS library as 1,2-benzenedicarboxylic acid or diethyl phthalate (Figure 35).

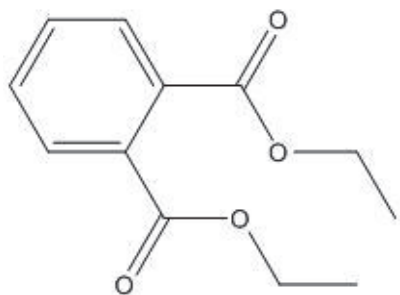


Figure 35: Chemical structure of a phytochemical compound corresponding to 1,2-benzenedicarboxylic acid or Diethylphthalate

In non-inoculated plants we were not able to detect diethylphthalate by HPLC. However, in the same non-inoculated plants the specific ion monitoring by GC/MS allowed us to identify small signals undoubtedly corresponding to this compound (retention time, molecular mass and fragmentation patterns). The latter was not produced by *Pseudomonas fluorescens* F113 as GC and HPLC analysis did not show any corresponding signals even with mass spectrometry detection.

Effect of inoculations on secondary metabolite profile of maize

Chromatograms obtained from root methanolic extracts (for all treatments at normal and high fertilization level) of maize cv. PR37Y15 showed a total of 26 integrated peaks. Based on retention times and peak areas at 280 nm, a data matrix was built to allow us to carry out a discriminant PCA. The factorial plan defined by axes 1 and 2 explained 26.8 % of data variability (Figure 36). Discriminant analysis separated the three single inoculation treatments from one another and from the non-inoculated control. Unexpectedly, there is a very slight effect of consortium at a normal level of fertilization on plant secondary metabolites comparing to the two component consortia because they clustered together. As, the high level of fertilization had an important effect on metabolite synthesis, we observed an

important clustering between these treatments. Fertilization level induces also more variability when plant was inoculated with consortium compared to control plants.

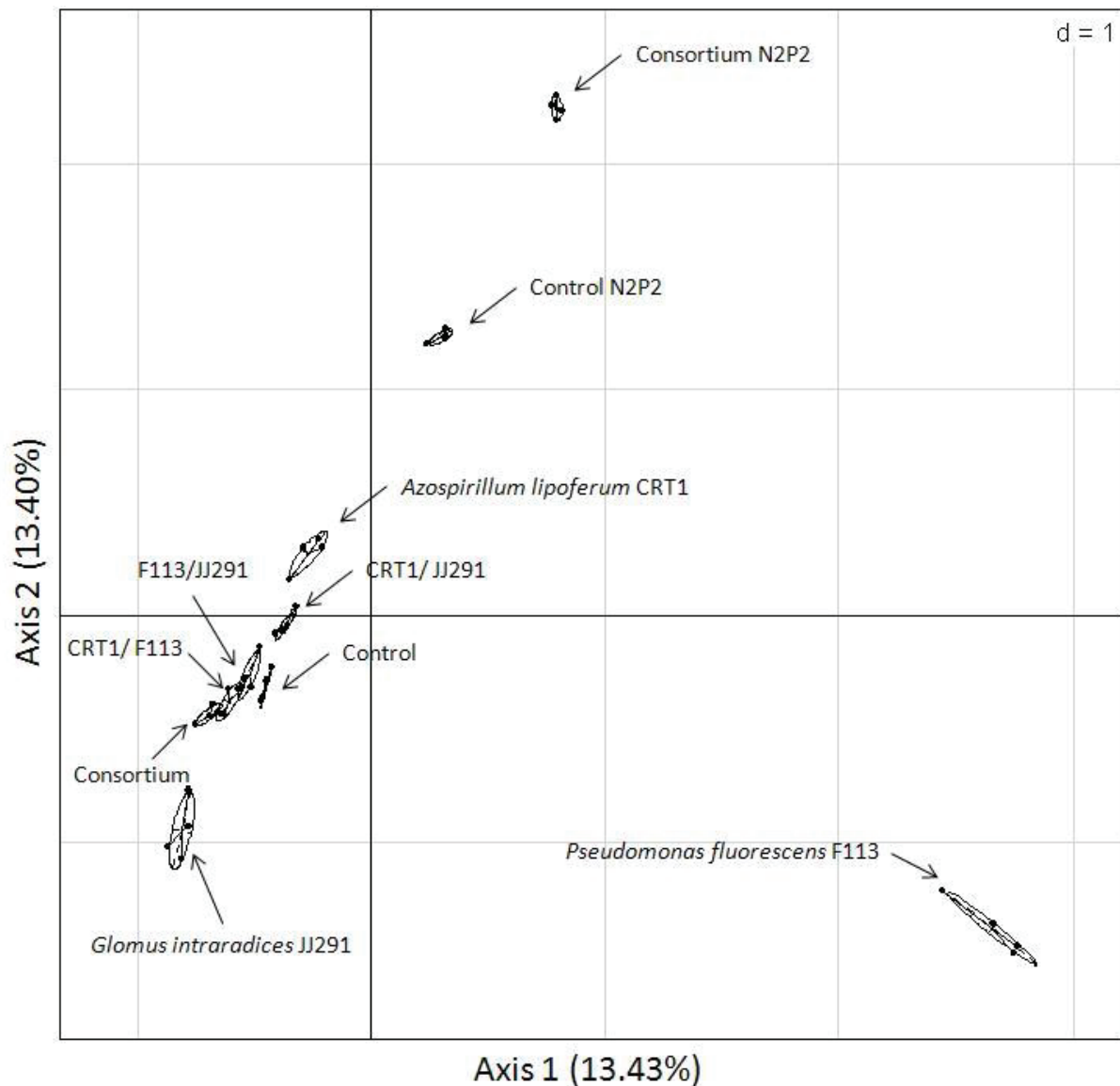


Figure 36: Discriminant PCA obtained from root extract chromatograms recorded at 280 nm. N2P2 represent treatment at a high level of fertilization. Consortium contained *A. lipoferum* CRT1, *P. fluorescens* F113 and *Glomus intraradices* JJ291.

Effect of single inoculations on individual secondary metabolites of maize

7 prevalent secondary metabolites were found, whose amount differed significantly between treatments based on discriminant PCA correlation circle (Figure 37). According to

UV spectra they represented 5 classes of metabolites, *i.e.* benzoxazinoids, simple phenol, phthalate, cinnamic acids and xanthone type compound. Benzoxazinoids derivatives were already identified as discriminant compounds of single *Azospirillum* inoculation in a previous study (Walker *et al.*, 2010). Among benzoxazinoïdes, DIMBOA-Glc, HDMBOA-Glc and MBOA were affected by inoculation. The PGPR strains (*A. lipoferum* CRT1, *P. fluorescens* F113) resulted in lower DIMBOA-Glc and HDMBOA-Glc content and higher MBOA content only for *A. lipoferum* CRT1 compared to non inoculated lower fertilization treatment. Concerning the xanthone type compound, only *A. lipoferum* CRT1 increased its synthesis. Moreover, *P. fluorescens* F113 induced the synthesis of diethyl phthalate. *Glomus* mix inoculation resulted in a decrease in benzoxazinoids content but stimulates the xanthone and hydroxycinnamic acid synthesis.

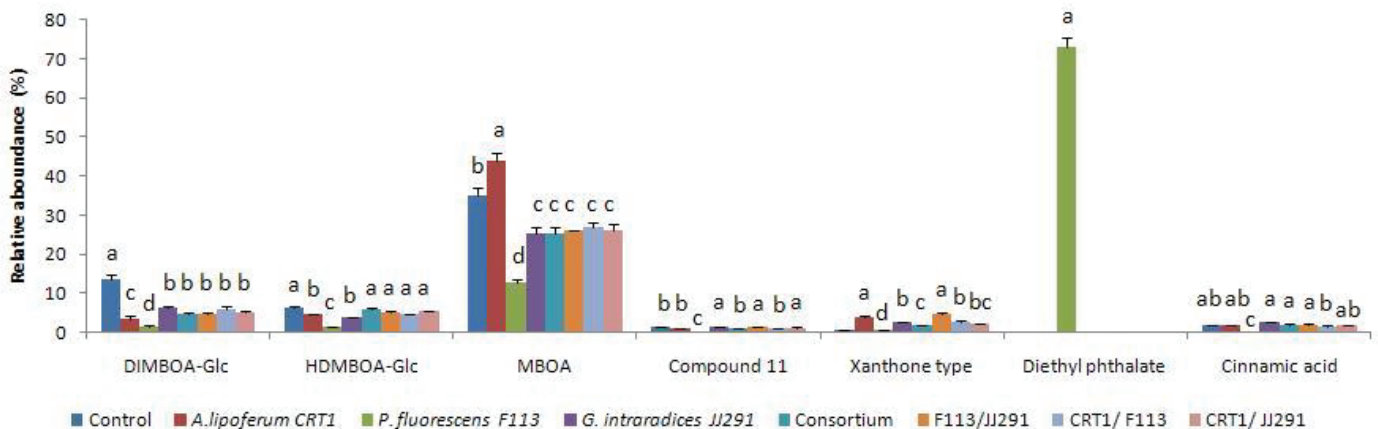


Figure 37: Discriminant compounds responsible of segregation observed on PCA between treatments with a normal level of fertilization. Different letters represent statistical differences following ANOVA test.

Effect of mixed inoculations on individual secondary metabolites of maize

All mixed treatments induced a decrease of benzoxazinoids content, with no specific variation following microorganism inocula composition. Concerning xanthone type

compound, mixed inoculations induced a higher synthesis in all cases with specifically a biggest content for maize inoculated with *P. fluorescens* F133/ *G. intraradices* JJ291. Cinnamic acid was not affected by mixed inoculation.

Effect of nitrogen and phosphorous amendment on individual secondary metabolites of maize

Results obtained on variation induced by nitrogen and phosphorous amendment on secondary metabolites in maize, demonstrated also several modifications. Indeed, according to discriminant PCA (Figure 36) we observed an important segregation following fertilization. This position on PCA was the consequence of metabolites variations occurred in plant. According to fertilization, content of MBOA and unknown compound (**11**) was increase compared to control plant at a low level of fertilization (Figure 38). However, we observed for these compounds that consortia inoculation at high level of fertilization induced the same variation that plant inoculated with the consortia at low level of fertilization, indicating that both compounds are not affected by the fertilization level. In addition DIMBOA-Glc was affected by high level of fertilization because its amount was drastically decreased in all treatments. For HDMBOA-Glc a specific higher content was observed for maize inoculated with three component consortia. For xanthone type compound, we observed the same variation between control and inoculated plant, but fertilization level induced an increase of content of this compounds. The high level of fertilization and the only *P. fluorescens* F113 inoculation induced the decrease of cinnamic acid content in maize roots.

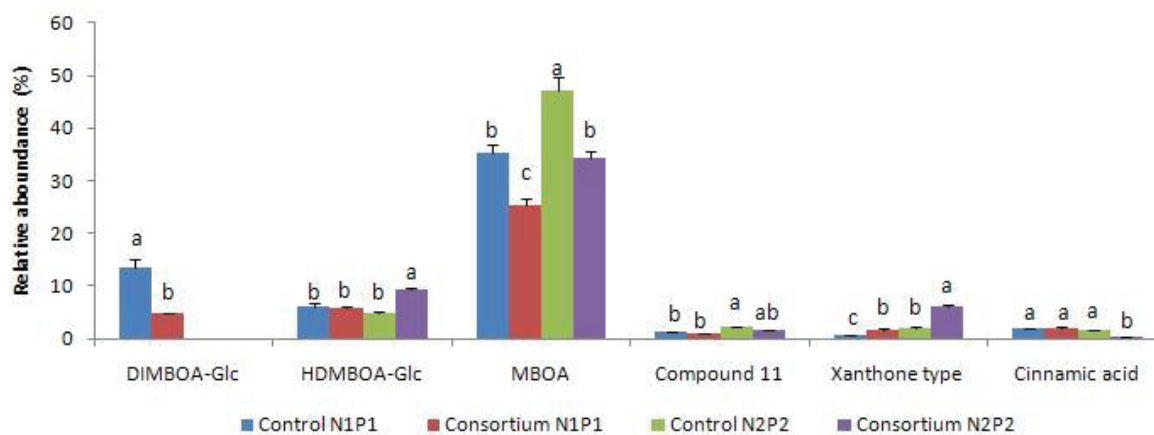


Figure 38: Compounds responsible of segregation observed on PCA between fertilization treatments. N1P1 correspond to a normal level of fertilization, N2P2 correspond to a high level of fertilization. Different letters represent statistical differences following ANOVA test.

Discussion

We already shown that a single inoculation of *Azospirillum* species induced a metabolic variation in host plant (Walker *et al.*, 2010), especially for benzoxazinoids compounds with strain dependent patterns. Considering mix inoculants, no study deals with metabolic impact of inoculation on host plant. Some authors assessed the individual effect of single inoculation of *Pseudomonas* or *Glomus* species on plant secondary metabolism and shown some variations in plant content (Peipp *et al.*, 1997; Ait Barka *et al.*, 2006). In this work we assessed the effect of microbial consortia on *Zea mays* L. plants and chemical fertilization at an early step in field experiment by phytochemical means. At 16 days post inoculation we have measured root biomass of all treatments. Even if we couldn't detect any statistical growth promotion we observed that microbial consortia inoculation at a low level of phosphorous and nitrogen fertilization gives similar results concerning the root biomass that non inoculated treatment at a high level of fertilization. This result indicates that efficacy of microbial consortia was similar than a high level of chemical amendment. The use of these phytochemical organisms could be a good compromise for the sustainable development in decrease the amount of chemicals during the maize cultivation.

Based on root extracts we detected secondary metabolites already identified in previous study (Walker *et al.*, 2010) corresponding to benzoxazinoids (ie HMBOA-Glc, DIMBOA-Glc, DIMBOA, HDMBOA-Glc and MBOA). All compounds detected are secondary metabolites synthesized by *Zea mays*. Based on chemical analysis we detected different patterns dependent of microbial treatment indicating that a large scale of plant secondary metabolites was affected by biological inoculation.

PCA analysis showed that all single treatments were segregated to non inoculated plant (Figure 35). For plant inoculated with mixed consortia at a low level of fertilization, we couldn't observe an important variation in plant metabolite synthesis. Indeed all these treatments were placed close together on the factorial design but were segregated from control plant. These data showed that consortia had a different effect than individual inoculation. For treatments with a high level of mineral fertilization, we observe a good separation between consortia inoculated plant and control. The mineral fertilization had an important effect on plant metabolite synthesis but this variation was not correlated to an improvement of root biomass probably due to a too early stage.

We have already shown a metabolic variation of benzoxazinoids content in maize induced by PGPR bacteria (Walker *et al.*, 2010). Unexpectedly, consortium inoculation induced variations but not significantly correlated with consortia composition. This result indicated that plant was affected in benzoxazinoids synthesis but was not able to answer specifically to different mixed consortia as we demonstrated with a single inoculation. Only specificity following consortia content was observed concerning a metabolite variation of xanthone type content and only with *Pseudomonas fluorescens* F113/ *G. intraradices* JJ291. Some authors have already reported changes in root metabolite patterns induced by *Glomus intraradices* in barley, but these modifications occurs from 6 weeks old plants (Peipp *et al.*, 1997). In this study we observed an early metabolite modification from 16 days after sowing.

Unexpectedly, *Pseudomonas fluorescens* F113 induced the synthesis of a specific compound in large amount identified as diethylphthalate. First we thought that this result corresponds to a contamination during sample preparation as this compound was usually described as polymer degradation product. After verifying all analytical conditions, sample preparation steps, and performing investigation in non inoculated plants we demonstrated that this compound was synthesized only by *Zea mays*. Some authors have already identified this compound in *Poaceae* exudates (Xuan *et al.*, 2006). All this proofs indicates that diethylphthalate was a plant secondary metabolite whose increased synthesis was correlated to *Pseudomonas* inoculation. Kapanen *et al.*, (2007) showed that *Pseudomonas* sp. bacteria were able to use diethyl phthalate as substrate suggesting that *P. fluorescens* F113 could hijacked the plant metabolism as carbon source.

Conclusion

In conclusion we have developed an approach to characterize the impact of phytobenifical microorganisms on the physiology of maize in field, based on metabolite profiling. Even if there is no variation on plant growth parameters, analysis of secondary metabolites seems to be more sensitive than morphological measurement to observe a biological effect. Results indicated that mixed inoculation resulted in metabolite profile variation independently to consortium composition. Individual microorganisms have an important impact on benzoxazinoids content with specifically the increase of diethylphthalate content in presence of *P. fluorescens* F113 bacteria. Fertilization levels have also an important impact on benzoxazinoids synthesis and secondary metabolites content with globally an increase of metabolite content but without new compound synthesis. As it is easily transposable to other models this approach could be relevant to investigate new plant/microorganisms interactions.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by the European Union (FW6 STREP project MicroMaize 036314).

References

- Ait Barka E, Nowak J, Clement C** (2006) Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7246-7252
- Bashan Y, Kent Harrison S, Whitmoyer RE** (1990) Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 769-775
- Belimov AA, Kojemiakov AP, Chuvarliyeva CV** (1995) Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil* **173**: 29-37
- Biró B, Köves-Péchy K, Vörös I, Takács T, Eggenberger P, Strasser RJ** (2000) Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Appl. Soil Ecol.* **15**: 159-168
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V** (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* **45**: 28-35
- Cornelis P** (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biot.* **86**: 1637-1645
- Couillerot O, Poirier MA, Prigent-Combaret C, Mavingui P, Caballero-Mellado J, Moëgne-Loccoz Y** (2010) Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. *J. Appl. Microbiol.* In press.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y** (2003) Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit.Rev. Plant Sci.* **22**: 107-149
- El-komy HMA** (2005) Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technol. Biotech.* **43**: 19-27
- Fages J, Mulard D** (1988) Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pot chez *Zea mays*. *Agronomie* **8**: 308-314
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F** (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878
- Fester T, Maier W, Strack D** (1999) Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* **8**: 241-246
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M** (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* **176**: 22-36
- Haas D, Defago G** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 307-319
- Jansa J, Mozafar A, Frossard E** (2005) Phosphorus acquisition strategies within arbuscular mycorrhizal fungal community of a single field site. *Plant Soil* **276**: 163-176
- Kapanen A, Stephen JR, Brüggemann J, Kiviranta A, White DC, Itävaara M** (2007) Diethyl phthalate in compost: Ecotoxicological effects and response of the microbial community. *Chemosphere* **67**: 2201-2209
- Mar Vázquez M, César S, Azcón R, Barea JM** (2000) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* **15**: 261-272
- Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI, Hartmann A** Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.* **45**: 106-113

- Peipp H, Maier W, Schmidt J, Wray V, Strack D** (1997) Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry* **44**: 581-587
- Raju PS, Clark RB, Ellis JR, Maranville JW** (1990) Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. *Plant Soil* **121**: 165-170
- Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes J, Mendez N, Toscano V, Mulling M, Galvez L, Vanderleyden J** (2008) Effect of *Rhizobium* – *Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* **312**: 25-37
- Rillig MC, Mummey DL** (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* **171**: 41-53
- Schliemann W, Kolbe B, Schmidt J, Nimtz M, Wray V** (2008) Accumulation of apocarotenoids in mycorrhizal roots of leek (*Allium porrum*). *Phytochemistry* **69**: 1680-1688
- Singh UP, Sarma BK, Singh DP** (2003) Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*). *Curr. Microbiol.* **46**: 131-140
- Steinberg C, Gamard P, Faurie G, Lensi R** (1989) Survival and potential denitrifying activity of *Azospirillum lipoferum* and *Bradyrhizobium japonicum* inoculated into sterilized soil. *Biol. Fert. Soils* **7**: 101-107
- Subramanian KS, Charest C, Dwyer LM, Hamilton RI** (1995) Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytol.* **192**: 643-650
- Volpin H, Kapulnik Y** (1994) Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In Y Okon, ed, *Azospirillum/Plant associations*. CRC Press, Boca Raton, pp 111-118
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moënné-Loccoz Y, Bally R, Comte G** (2010) Host plant secondary metabolite profiling shows complex, strain-dependent response of maize to the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum*. *New Phytol.* (In press)
- Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder LK, De la Fuente L, Blouin Bankhead S, Allende Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DV, Thomashow LS** (2007) Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant biology* **9**: 4-20
- Xuan T, Chung, III, Khanh T, Tawata S** (2006) Identification of phytotoxic substances from early growth of Barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) root exudates. *J. Chem. Ecol.* **32**: 895-906

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux interactions pouvant s'établir, au sein de la rhizosphère, entre des micro-organismes phytobénéfiques (PGPR et/ou CMA) et *Zea mays* L., avec pour objectif de déterminer quel était l'impact de ces organismes sur le métabolisme de la plante hôte. Si les mécanismes d'interactions des PGPR et champignons mycorhiziens avec les plantes hôtes ont largement été étudiés dans la littérature (Richardson *et al.* 2009, Raaijmakers *et al.* 2009, Parniske 2008, Requena *et al.* 2007, Creus *et al.* 2005, Haas & Défago 2005, Lucy *et al.* 2004; Dobbelaere *et al.* 2003, Harrison 1999, Glick *et al.* 1998), le partenaire végétal a quant à lui fait l'objet de peu d'études tout du moins pour les interactions plante/PGPR. Le mécanisme sur lequel s'appuie ce travail de thèse est la réactivité de la plante aux contraintes environnementales par l'intermédiaire des métabolites secondaires en modulant leur synthèse. Ce point n'est plus à démontrer et il est clair que la plante est fortement influencée, au niveau de sa synthèse métabolique, en réponse à des contraintes environnementales (Harrigan *et al.* 2007, Macheix *et al.*, 2005, Rivero *et al.*, 2001, Daniel *et al.*, 1999). En effet, de nombreuses études font état de variations du contenu métabolique de la plante en fonction de paramètres abiotiques comme la température, l'hydrométrie...(Yamaguchi & Sharp 2010, Rizhsky *et al.* 2004, Dixon & Paiva, 1995). De plus la présence de micro-organismes avoisinant la plante conduit, dans la majorité des cas, à une variation de la synthèse en métabolites secondaires végétaux (Dixon *et al.*, 2002). Cet aspect est largement étudié dans le cas d'interactions de pathogénie avec notamment des augmentations de la synthèse de métabolites secondaires présentant des propriétés antimicrobiennes en relation avec la mise en place des défenses végétales (Bennett & Wallsgrove, 1994; Sudha & Ravishankar, 2002).

Sur la base de l'ensemble des travaux antérieurs, il est donc raisonnable de penser que la présence de micro-organismes de type PGPR ou CMA au niveau des racines des plantes

peut influencer la synthèse de la plante hôte et cela dès les premiers stades de l'interaction et de se demander quelle est la nature et l'amplitude de cette influence.

Ainsi, nous avons démontré au cours de ce travail de thèse que l'inoculation du maïs par des micro-organismes phytobénéfiques conduit à une modulation des composés secondaires végétaux avec un profil souche spécifique et une forte implication des composés de type benzoxazinoïdes. L'ensemble des données obtenues nous permet de suggérer un modèle de fonctionnement de l'interaction entre le maïs et des micro-organismes phytobénéfiques (Figure 39).

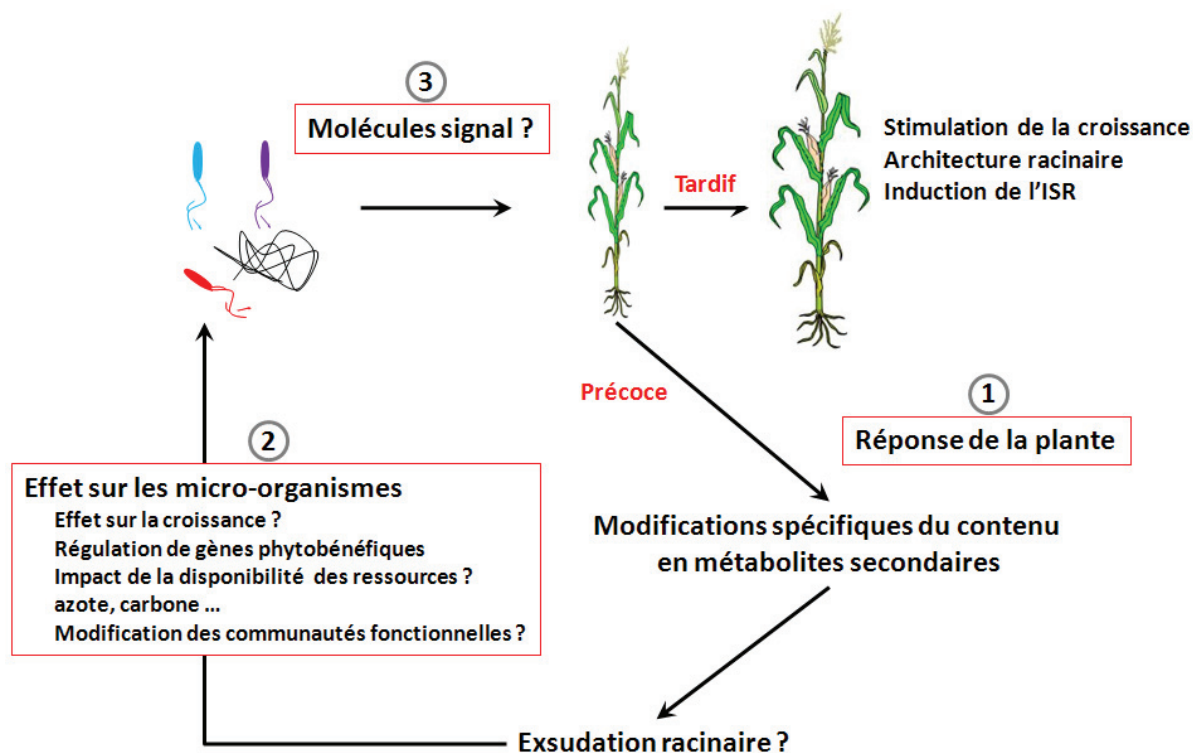


Figure 39: Proposition de modèle de fonctionnement de l'interaction maïs/ micro-organismes phytobénéfiques.

Impact sur le métabolisme de la plante (1)

Nous avons vu que des micro-organismes inoculés de façon individuelle influençaient le contenu métabolique de la plante. Nous avons observé une modulation de ce contenu dans

la plupart des cas, et dans certains cas une synthèse *de novo* de diéthylphtalate. L'ensemble de la classe chimique des phtalates est souvent considérée comme une pollution liée à l'utilisation de contenant en matière plastique lors des expérimentations. Cependant, nous avons démontré qu'il était bien présent chez la plante. De plus, la présence de diéthylphtalate au niveau des extraits racinaires a déjà été mise en évidence par Xuan *et al.* (2006) qui démontrent la présence de ce composé dans les exsudats de l'herbacée *Echinochloa creusgalli* appartenant elle aussi à la famille des Poacées. Kapanen *et al.* (2006) montrent que certaines souches de *Pseudomonas* sont capables de métaboliser ce composé et de l'utiliser comme substrat. Par ailleurs, ce métabolite est également biodégradé par de nombreux micro-organismes (Nozawa & Maruyama, 1988), ainsi la synthèse de ce composé pourrait être le résultat d'un détournement métabolique au profit des souches de *Pseudomonas*. Outre le diéthylphtalate, dans le cadre de notre étude, les composés les plus affectés sont les composés de type benzoxazinoïdes dont la voie de biosynthèse a été quasiment élucidée complètement, et fait intervenir des enzymes nommées BX (Jonczyk *et al.*, 2008). Parmi ces enzymes, deux d'entre elles sont des glycosyltransférases et seraient responsables de l'élaboration des formes glycosylées des benzoxazinones afin de détoxifier ces composés (von Rad *et al.* 2001).

L'ensemble de ces composés (benzoxazinoïdes) et de leur voie enzymatique d'élaboration apparaît donc comme étant la clé de reconnaissance de l'interaction maïs/micro-organismes phytobénéfiques. Ainsi, l'évaluation du niveau de régulation de ces enzymes en conditions inoculées, permettrait de déterminer si en plus de modifier leur contenu dans la plante, les micro-organismes sont capables d'exercer une régulation de cette voie de biosynthèse. Il pourrait également être intéressant de lever les dernières interrogations sur cette voie de biosynthèse concernant la caractérisation des enzymes impliquées dans la biosynthèse du HDMBOA-Glc, du M₂BOA, ou encore du HM₂BOA-Glc (Figure 40).

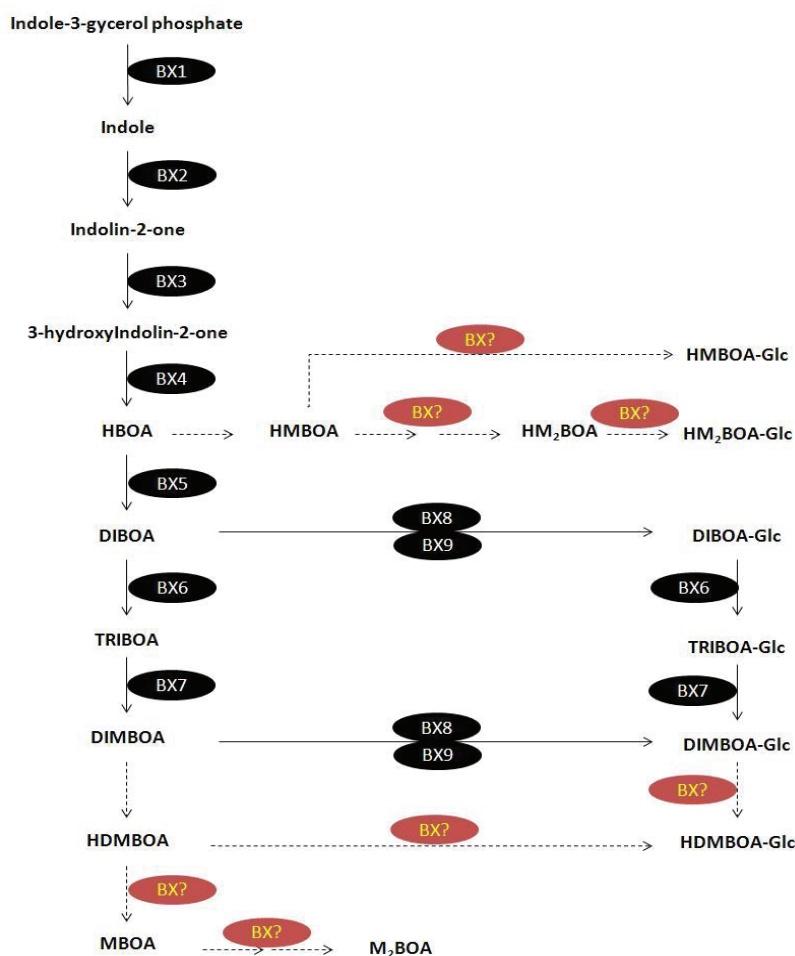


Figure 40: Voie de biosynthèse des benzoxazinoides proposé avec les différentes enzymes de ce métabolisme. Les flèches en pointillés sont des étapes hypothétiques. Les enzymes portant un numéro ont été identifiées (Morant et al., 2008). Les enzymes sur fond rouges restent à confirmer.

Quand nous avons considéré des inoculations mixtes de micro-organismes, nous n'avons pas observé de profils métaboliques spécifiques de l'inoculation. Ce résultat reste très surprenant car même si un effet sur la morphologie de la plante ne se traduit pas forcément en termes de physiologie (Walker *et al.* 2010), nous pouvions nous attendre à des modifications nettes en termes métaboliques par rapport à l'inoculation de *Glomus* seul car des doubles inoculations de CMA/PGPR se traduisent le plus souvent par un effet amélioré sur la mycorhization racinaire (Biro *et al.* 2000, Fester *et al.* 1999). Par ailleurs, nous avons démontré dans le cadre d'une autre étude (Couillerot *et al.* en préparation (en annexe)) qu'en présence d'inoculum mixtes (souches d'*Azospirillum*, *Pseudomonas fluorescens* F113 et mix

de *Glomus*) des profils métaboliques pouvaient être dégagés lors de l'interaction. Toutefois, lors de cette étude un autre cultivar avait été utilisé et la variation observée au niveau métabolique pourrait être propre au cultivar étudié.

Des profils métaboliques végétaux spécifiques lors des inoculations simples ont été observés indiquant une certaine « spécificité » d'interaction. Le contenu phytochimique du maïs s'est révélé relativement complexe avec la présence de plusieurs classes de composés telles que des acides cinnamiques, des acides hydroxamiques cycliques, ou encore des flavonoïdes par exemple. Toutefois, il est à noter que la majorité des composés synthétisés en termes quantitatifs par de jeunes plantules de maïs se révèle être des composés du type benzoxazinoïdes. Cette forte présence n'est pas aberrante car ces métabolites ont été largement décrits comme étant des composés de défense des plantes, avec des propriétés antifongiques, antibactériennes et pesticides importantes, permettant aux jeunes plants de mieux résister aux agressions biotiques (Niemeyer 2009, Søltoft *et al.* 2008, Sicker *et al.* 2000, Wu *et al.* 2001, Pérez 1991) et leur contenu *in planta* diminue fortement une fois la plante plus âgée (Reberg-Horton *et al.* 2005).

Nous sommes complètement conscients que les analyses effectuées ne représentent pas complètement le métabolome végétal dans la mesure où nous avons décidé de travailler sur les métabolites solubles. Les composés volatils peu ou moins solubilisés ne sont donc pas analysés et pourraient éventuellement témoigner de la réponse de la plante à l'inoculation. Il est important de s'attacher à vérifier et à caractériser l'éventuel impact de ce type d'interaction sur les composés volatils du maïs. Cette problématique est intéressante car un chimiotactisme négatif *via* des médiateurs volatils pour des insectes ravageurs de maïs comme la Pyrale ou la Sésamie auraient sans doute tendance à limiter la destruction de nombreux plants lors de la monoculture de cette céréale en France et en Europe. D'autre part, cela présenterait un intérêt pour l'étude d'autres modèles comme des interactions entre PGPR et

des angiospermes à mode de pollinisation entomogame, dans la mesure où de nombreux métabolites volatils sont impliqués dans la reproduction des plantes (Dudareva *et al.*, 2006) par chimiotactisme positif des insectes pollinisateurs pour ces composés, mais également comme élément de défense contre les pathogènes (Pichersky & Gershenzon, 2002).

Cette problématique nécessiterait de développer une méthodologie spécifique afin de piéger les composés volatils. Ceci pourrait être envisagé par l'utilisation de techniques de micro-extraction sur phase solide (SPME) afin d'adsorber les métabolites volatils pour les concentrer et les analyser par la suite en chromatographie gazeuse.

Par ailleurs, dans ce travail de thèse un autre compartiment (exsudats) a fait l'objet d'investigation mais n'a pas pu être mené à bien. La difficulté résultait dans la grande instabilité des composés exsudés en milieu aqueux (Prinz *et al.* 2010, Macías *et al.* 2004), rendant l'analyse sur des grandes expérimentations telles que celles entreprises dans ce travail de thèse très difficile. Cette instabilité pourrait provenir (i) de la présence d'enzymes bactériennes dans l'extrait dénaturant ces molécules, (ii) du clivage de la partie glycosidique par des glycosidases rendant moins stable les composés car les groupements nucléophiles ne sont plus protégés (Gachon *et al.* 2005), (iii) des mécanismes d'oxydation et des conditions physico chimiques dans lesquelles se trouvent ces molécules à l'extérieur de l'organisme.

Toutefois dans un contexte écologique, les exsudats prennent une part prépondérante car ils sont à la base de la structuration des communautés microbiennes dans le sol (Bais *et al.* 2006, Baudoin *et al.* 2003). En effet, le rhizodépôt est défini comme étant l'ensemble des métabolites exsudés par la plante au niveau des racines (Somers *et al.* 2004, Nguyen 2003) fait de la rhizosphère un environnement propice pour le développement d'un certain nombre de micro-organismes (Hartmann *et al.* 2009). Par conséquent, une modulation du contenu métabolique racinaire végétal induit par des micro-organismes aurait pour conséquence de provoquer des modifications en termes d'exsudats. Nous avons retrouvé dans les exsudats de

mais non inoculés une majorité de composés de type benzoxazinoïdes sous forme d'aglycones. Ces composés de type aglycone se retrouve dans la rhizosphère suite à l'action de glycosidases (Morant *et al.* 2008). Ce clivage lors de l'exsudation permettrait d'activer des composés à forte activité biologique (Siker *et al.* 2000) dont la partie glycosidique atténue ou supprime l'activité (Jones & Vogt 2001). Ces composés ayant été identifiés comme des composés antimicrobiens (Corcuera *et al.* 1978) et malgré leur relative instabilité peuvent avoir un impact important sur la structure de la communauté microbienne avoisinant les racines du maïs.

Impact des exsudats sur les micro-organismes inoculés (2)

Un des composés le plus affecté par l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques est le MBOA. Ce composé est également le composé majoritaire retrouvé dans les exsudats. Or la structuration des exsudats végétaux a une importance considérable sur la régulation de certains gènes d'*Azospirillum* comme des gènes impliqués dans la motilité et l'adhésion, des gènes codants pour des sérine/thréonine kinases impliquées dans la régulation de voies de biosynthèses chez les procaryotes, des gènes codants pour des protéines hypothétiques impliquées dans la réduction de l'oxyde nitrique en diazote, ou encore des gènes impliqués dans la dénitrification (Pothier *et al.* 2007, Rediers *et al.* 2005). Ainsi une modification dans la composition des exsudats de maïs pourrait avoir un impact sur la régulation de fonction de certains gènes bactériens et ainsi améliorer ou diminuer le pouvoir phytostimulateur des PGPR.

D'autre part, le MBOA et le DIMBOA, les composés majeurs du maïs, ont été décrit comme ayant des activités inhibant les protéases et les enzymes oxydatives chez les champignons, les bactéries et les insectes (Niemeyer, 1988). De plus, le MBOA est capable

d'inhiber *Fusarium graminearum in vitro* (Glenn *et al.*, 2001). Les propriétés biotiques de ce type de composé ainsi que leur modulation induite par l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques en font des candidats évidents pour évaluer leur effet individuel. En effet, certains de ces composés sont exsudés par la plante dans la rhizosphère et pourraient jouer un rôle dans le fonctionnement de l'écosystème par induction de la fonction de certains gènes phytobénéfiques ou par des régulations de croissance microbiennes. Ces hypothèses sont à vérifier, par des expérimentations de quantification de transcrits de gènes connus pour leur relation avec les effets phytobénéfiques. Ainsi parmi eux, l'attention pourrait être tout particulièrement portée sur le gène *acdS* codant pour l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase qui en abaissant les niveaux d'éthylène dans la plante, entraînerait une elongation des racines (Glick *et al.* 1998), ou encore sur le gène *ipdC* codant l'indole3-pyruvate décarboxylase impliquée dans la synthèse de l'AIA (Spaepen *et al.* 2007).

Dans ce but, nous évaluons actuellement l'impact du MBOA commercial sur les cinétiques de croissance des souches utilisées dans ce travail, mais également des souches isolées de plantes ne synthétisant pas le MBOA afin de tester la résistance ou la sensibilité de ces souches aux composés de type benzoxazinoïde. Des résultats préliminaires concernant l'impact du MBOA sur des souches d'*Azospirillum* montrent que certaines souches sont effectivement affectées dans leur croissance. Ainsi la souche d'*Azospirillum lipoferum* CRT1 qui induit une diminution de MBOA dans les racines est la souche la plus sensible testée avec une inhibition de croissance observée dès 100µM de MBOA. La souche d'*Azospirillum brasilense* UAP-154 qui quant à elle ne modifie pas le contenu racinaire en MBOA semble être la plus résistante à ce composé, mais il induit une phase de latence plus importante dès 500µM de MBOA. Toutefois la résistance des bactéries à ce composé ne semble pas liée à l'origine de la plante et sa capacité ou non à synthétiser du MBOA.

Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle, de standards commerciaux, pour les acides hydroxamiques cycliques (benzoxazinones), permettant d'évaluer ces paramètres et donc la vérification de ces hypothèses nécessiterait la disponibilité de quantités suffisantes soit par extraction ou par synthèse de ces composés végétaux, ce qui constitue une limitation importante. Nos tentatives de purification n'ont malheureusement pas permis la purification de quantités suffisantes d'autres métabolites pour répondre à ces interrogations.

La modulation de contenu en métabolites secondaires suite à une inoculation de micro-organismes phytobénéfiques peut avoir des répercussions sur la qualité des exsudats, puisque nous avons vu que certains des composés contenus dans les extraits racinaires étaient exsudés. Ainsi les teneurs en carbone, azote et phosphate pourraient être modifiées et donc avoir un impact sur la communauté des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes par exemple. Une expérience préliminaire montre que le MBOA (composé majoritaire des exsudats de maïs) a un impact sur la croissance d'*Azospirillum lipoferum* CRT1. D'autre part, le MBOA a un impact sur des pathogènes tels que *Erwinia carotovora* et *Agrobacterium tumefaciens* provoquant chez cette dernière une inhibition d'expression des gènes *vir* (Zhang *et al.*, 2000). Cette forte activité des composés de type benzoxazinoïde pourrait induire des modifications sur la structure des communautés microbiennes avoisinant les racines de la plante hôte, mais également avoir un impact sur le fonctionnement de l'écosystème. Par ailleurs, pour évaluer l'impact de la modification du contenu racinaire et également de l'exsudation, sur la communauté microbienne naturelle du sol, des expériences en microcosme avec des exsudats synthétiques pourraient être menée, afin de suivre dans le temps d'éventuelles successions. Dans ce cadre, des analyses taxonomiques sur l'ARNr 16S à partir d'échantillons rhizosphériques en microcosmes nous permettraient d'obtenir des renseignements clés sur l'impact des exsudats végétaux sur ces communautés bactériennes et leur structuration

(Kyselková *et al.* 2009ab, Sanguin *et al.* 2009). Enfin, ces expérimentations pourraient également être menées dans le cadre de l'évaluation non pas des exsudats totaux mais de composés que nous avons montrés comme clés de l'interaction comme le MBOA par ailleurs facilement disponible. Il serait alors possible d'évaluer l'impact de ces composés sur la régulation de certains gènes phytobénéfiques ou bien sur la communauté fonctionnelle des nitrifiantes et dénitrifiantes du maïs.

Perception des micro-organismes (3)

Par la suite une modification des communautés pourrait également avoir un impact en termes de perception des micro-organismes au niveau du métabolisme de la plante et induire une réponse autre de l'hôte. Nous voyons qu'il reste de nombreuses interrogations concernant la réponse de la plante aux micro-organismes : les composés synthétisés par les différents micro-organismes ont-ils un impact sur le métabolisme végétal ?, régulent-ils l'expression de certains gènes végétaux ?, les déterminants microbiens tels que les LPS sont-ils impliqués dans la modulation du contenu végétal ? En effet, la synthèse spécifique de diethylphtalate par la plante en réponse à *Pseudomonas fluorescens* F113 pourrait favoriser l'établissement de cette souche au niveau des racines de la plante. Or les souches de *Pseudomonas* sont capable de produire des antimicrobiens comme le DAPG (Haas & Keel 2003) et celui-ci peut chez les plantes induire l'ISR (Iavicoli *et al.* 2003) et modifier encore une fois le métabolisme de la plante hôte. D'autre part, certaines fonctions phytobénéfiques d'*Azospirillum* et de *Pseudomonas* sont régulées par « quorum sensing » faisant intervenir les N-Acyl Homosérine Lactones (AHL) (Venturi 2006; Vial *et al.* 2006) et les plantes sont capable de produire des molécules interférant avec le quorum sensing (Gao *et al.* 2003, Bauer & Mathesius 2004). Une modification des exsudats racinaires de la plante peut donc affecter les populations de

PGPR et par la même modifier le pool d'AHL, perturbant les mécanismes phytobénéfiques. Les réponses à ces questions nécessiteront la purification de métabolites microbiens. Ceux-ci pourraient être évalués sur les plantes à différentes concentrations quant à leur impact au niveau du métabolisme, de la transcription ou de la régulation de l'expression des gènes.

Le premier effet de l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques est une adaptation du métabolisme de la plante hôte. Celle-ci entraînerait alors une modification des exsudats racinaires à la fois en quantité et en qualité, modifiant par la même l'expression de certains gènes phytobénéfiques des micro-organismes. Par ailleurs cette modification pourrait également avoir un impact sur les communautés fonctionnelles de la rhizosphère. Ces nouvelles communautés seraient alors perçues à nouveau par la plante provoquant ainsi une nouvelle adaptation de celle-ci à son environnement. L'ensemble de ce cycle serait toutefois soumis à une atténuation progressive au fur et à mesure du développement de l'organisme végétal (Walker *et al.* 2010) ainsi que nous l'avons montré sur la modification du métabolisme végétal.

CONCLUSION GENERALE

L'utilisation de micro-organismes phytobénéfiques comme les bactéries PGPR en tant qu'inoculant pour les grandes cultures est de plus en plus importante. Cette pratique est justifiée par le caractère ubiquiste de ces micro-organismes à large spectre d'hôte et le fait qu'elle est un bon compromis à la sélection variétale pour lutter contre les maladies, mais également permet de diminuer l'utilisation de produits phytosanitaires et fertilisants.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc développé une méthodologie efficace d'analyse de l'impact d'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques sur le métabolisme du maïs. Grâce aux analyses chromatographiques, spectrométriques et statistiques nous avons pu évaluer le contenu et les variations en métabolites secondaires de deux cultivars. Il résulte de cette étude qu'au sein d'une même espèce de plante, les profils chromatographiques témoignant du contenu chimique de la plante sont relativement variable avec ici l'exemple de deux cultivars de maïs produisant majoritairement des composés de type benzoxazinoïdes, uniquement sous la forme d'aglycones dans un cas et majoritairement sous forme de glycoside dans l'autre cas. Par ailleurs, nous avons également montré que le contenu chimique du maïs variait en fonction du temps de culture, et que la plante était réactive à son environnement biotique. Ainsi une inoculation de micro-organismes PGPR et champignons mycorhizien à arbuscules induisait dans tous les cas une modulation de la réponse physiologique de la plante hôte et plus particulièrement une modulation du contenu chimique de la plante. De plus, cette modulation de synthèse se manifeste bien plus précocement que les effets morphologiques observables au niveau de l'architecture racinaire ou de l'augmentation de biomasse de la plante. Les composés de type benzoxazinoïdes sont particulièrement impliqués dans ces interactions à travers une modulation de leur synthèse en termes de balance métabolique. Par ailleurs dans le cas de l'inoculation de la bactérie PGPR phytoprotectrice *Pseudomonas fluorescens* F113 nous avons observé une augmentation

drastique du contenu de la plante en diethylphtalate, composé n'ayant jamais été décrit dans le maïs.

Un des résultats majeurs de ce travail de thèse est que nous avons démontré que la modulation de la réponse de la plante à l'inoculation était dépendante du micro-organisme inoculé, mais également au niveau de la souche car nous avons observé des patterns différents en réponse à deux souches d'*Azospirillum* différentes *in vitro* et en serre (CFN535 et UAP154).

A la suite de ce travail de thèse, nous nous demandons quels sont les déterminants bactériens ou fongiques responsables de cette modulation. Dans l'avenir il serait particulièrement important de déterminer plus précisément quels sont les composés ou protéines responsables de ces variations observées chez la plante. Un des éléments de réponse pourrait être des déterminants de surface des bactéries ou bien des métabolites microbiens qui pourrait agir comme des molécules signal et interférer dans la synthèse métabolique de la plante hôte. Par ailleurs et de manière complémentaire, on peut se demander, si la présence des micro-organismes phytobénéfiques peut avoir un impact sur l'activation ou la répression de certains gènes du maïs comme ceux codant pour les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des acides hydroxamiques cycliques.

Cette étude reste une des premières à s'être intéressée au partenaire végétal des interactions associatives et plus précisément au niveau de sa perception de l'interaction au travers de l'expression de son métabolisme secondaire. Bien qu'il reste encore beaucoup de questions en suspens, ce travail de thèse ouvre la voie de la métabolomique intégrée (avec la génomique, transcriptomique et protéomique). En effet il me semble à l'heure actuelle que ces méthodologies sont de moins en moins dissociables et sont complémentaires pour obtenir des données plus fines afin de caractériser et mieux comprendre les interactions plantes/micro-organismes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait Barka E, Nowak J, Clement C** (2006) Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7246-7252
- Akiyama K** (2007) Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1405-1414
- Akiyama K, Matsuzaki KI, Hayashi H** (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827
- Araim G, Saleem A, Arnason JT, Charest C** (2009) Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *J. Agri. Food Chem.* **57**: 2255-2258
- Arsac JF, Lamothe C, Mulard D, Fages J** (1990) Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: Effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* **19**: 649-654
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plant and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233-266
- Bakker PAHM, Pieterse CMJ, van Loon LC** (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239-243
- Bally R, Elmerich C** (2007) Biocontrol of Plant Diseases by Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria. In: Elmerich C, Newton WE (eds) Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Springer Netherlands, pp 171-190
- Bally R, Thomas-Bauzon D, Heulin T, Balandreau J, Richard C, Ley J** (1983) Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria in the rice rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* **29**: 881-887
- Barbieri P, Zanelli T, Galli E, Zanetti G** (1986) Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 87-90
- Baricevic D, Umek A, Kreft S, Maticic B, Zupancic A** (1999) Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in the roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Environ. Exp. Bot.* **42**: 17-24
- Bashan Y, Bustillos JJ, Leyva LA, Hernandez JP, Bacilio M** (2006) Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol. Fert. Soils* **42**: 279-285
- Bashan Y, Harrison SK, Whitmoyer RE** (1990) Enhanced Growth of Wheat and Soybean Plants Inoculated with *Azospirillum brasilense* Is Not Necessarily Due to General Enhancement of Mineral Uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 769-775
- Bashan Y, Holguin G** (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* **43**: 103-121
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE** (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* **50**: 521-577
- Bashan Y, Kent Harrison S, Whitmoyer RE** (1990) Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 769-775
- Baudoin E, Lerner A, Mirza MS, El Zemrany H, Prigent-Combaret C, Jurkevich E, Spaepen S, Vanderleyden J, Nazaret S, Okon Y, Moënne-Loccoz Y** (2010) Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. *Res. Microbiol.* **161**: 219-226
- Baudoin E, Nazaret S, Mougél C, Ranjard L, Moënne-Loccoz Y** (2009) Impact of inoculation with the phyto stimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biol. Biochem.* **41**: 409-413
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C** (2004) Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can. J. Bot.* **82**: 1186-1197

- Bednarek P, Franski R, Kerhoas L, Einhorn J, Wojtaszek P, Stobiecki M** (2001) Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor. *Phytochemistry* **56**: 77-85
- Bednarek P, Schneider B, Svatos A, Oldham NJ, Hahlbrock K** (2005) Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **138**: 1058-1070
- Belimov AA, Kojemiakov AP, Chuvarliyeva CV** (1995) Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil* **173**: 29-37
- Bennett RN, Wallsgrove RM** (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **127**: 617-633
- Bertin C, Yang X, Weston A** (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* **256**: 67-83
- Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Normand P** (2009) Ecologie microbienne -microbiologie des milieux naturels et anthropisés. Publications de l'Université de Pau, Pau, France
- Biondi EG, Reisinger SJ, Skerker JM, Arif M, Perchuk BS, Ryan KR, Laub MT** (2006) Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* **444**: 899-904
- Biró B, Köves-Péchy K, Vörös I, Takács T, Eggenberger P, Strasser RJ** (2000) Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Appl. Soil Ecol.* **15**: 159-168
- Bouillant M, Miché L, Ouedraogo O, Alexandre G, Jacoud C, Sallé G, Bally R** (1997) Inhibition de la germination des graines de *Striga* associée à une augmentation de la croissance du sorgho par des bactéries du sol Comptes rendus de l'Académie des Sciences-Série III- Sciences de la vie **320**: 159-162
- Çakmakç R, Erat M, Erdoğan Ü, Dönmez MF** (2007) The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **170**: 288-295
- Cambier V, Hance T, de Hoffmann E** (2000) Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochemistry* **53**: 223-229
- Cañas RA, Quilleré I, Christ A, Hirel B** (2009) Nitrogen metabolism in the developing ear of maize (*Zea mays*): analysis of two lines contrasting in their mode of nitrogen management. *New Phytol.* **184**: 340-352
- Cartieaux F, Thibaud MC, Zimmerli L, Lessard L, Sarrobert C, David P, Gerbaud A, Robaglia C, Somerville S, Nussaume L** (2003) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal* **36**: 177-188
- Cassán F, Perrig D, Sgroi V, Masciarelli O, Penna C, Luna V** (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* **45**: 28-35
- Cérémonie H, Debellé F, Fernandez MP** (1999) Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factors and *Rhizobia* Nod factors. *Can. J. Bot.* **77**: 1293-1301
- Chakraborty D, Mandal S** (2008) Fractional changes in phenolic acids composition in root nodules of *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regul.* **55**: 159-163
- Charitha Devi M, Reddy MN** (2002) Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and *Rhizobium*. *Plant Growth Regul.* **37**: 151-156
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B** (2009) Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* **4**: 493-496
- Cheng Z, McConkey BJ, Glick BR** (2010) Proteomic studies of plant-bacterial interactions. *Soil Biol. Biochem.* In Press, Corrected Proof
- Clark RB, Zeto SK** (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutr.* **23**: 867 - 902

- Copetta A, Lingua G, Berta G** (2006) Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza* **16**: 485-494
- Corcuera LJ, Woodward MD, Helgeson JP, Kelman A, Upper CD** (1978) 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species. *Plant Physiol.* **61**: 791-795
- Cornelis P** (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biot.* **86**: 1637-1645
- Cornelis P, Matthijs S** (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ. Microbiol.* **4**: 787-798
- Couillerot O, Poirier MA, Prigent-Combaret C, Mavingui P, Caballero-Mellado J, Moënné-Loccoz Y** (2010) Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. *J. Appl. Microbiol.* In press.
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L** (2005) Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* **221**: 297-303
- Croteau R, Hutchan TM, Lewis NG** (2000) Natural products (Secondary metabolites). In B Buchanan, W Greuiss, R Jones, eds, *Biochemistry and molecular biology of plants*. ASPP, Rockville, pp 1250-1318
- Dakora FD, Joseph CM, Phillips DA** (1993) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **101**: 819-824
- Dakora FD, Phillips DA** (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* **245**: 35-47
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **441**: 826-833.
- Daniel O, Meier MS, Schlatter J, Frischknecht P** (1999) Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ. Health Persp.* **107**: 109-114
- Dardanelli MS, Fernández de Córdoba FJ, Espuny MR, Rodríguez Carvajal MA, Soria Díaz ME, Gil Serrano AM, Okon Y, Megías M** (2008) Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 2713-2721
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR** (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**: 313-327
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang L** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence- a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* **3**: 371-390
- Dixon RA, Paiva E** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism *The Plant Cell* **7**: 1085-1097
- Djordjevic MA, Redmond JW, Batley M, Rolfe BG** (1987) Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. *EMBO J.* **6**: 1173-1179
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Okon Y, Vanderleyden J** (2002) Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fert. Soils* **36**: 284-297
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre J, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y** (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian J. Plant Physiol.* **28**: 871-879
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Vande Broek A, Vanderleyden J** (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* **212**: 155-164

- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y** (2003) Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit.Rev. Plant Sci.* **22**: 107-149
- Döbereiner J, Day JM** (1976) Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In EW Newton, CJ Nyman, eds, International symposium on nitrogen fixation interdisciplinary discussion. Washington State University Press, Pullman, pp 518-538
- Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I** (2006) Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Crit.Rev. Plant Sci.* **25**: 417 - 440
- El-komy HMA** (2005) Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technol. Biotech.* **43**: 19-27
- El Zembrany H, Cortet J, Lutz MP, Chabert A, Baudoin E, Haurat J, Maughan N, Félix D, Défago G, Bally R, Moënné-Loccoz Y** (2006) Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biol. Biochem.* **38**: 1712-1726
- El Zembrany H, Czarnes S, Hallett PD, Alamercury S, Bally R, Jockey Monrozier L** (2007) Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Plant Soil* **291**: 109-118
- Estabrook EM, Sengupta-Gopalan C** (1991) Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *Plant Cell* **3**: 299-308
- Facchini PJ** (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 29-66
- Fages J** (1994) *Azospirillum* inoculants and field experiment. In Y Okon, ed, *Azospirillum/Plant associations*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 87-109
- Fages J, Mulard D** (1988) Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pot chez *Zea mays*. *Agronomie* **8**: 308-314
- Fallik E, Okon Y, Fischer M** (1988) Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **20**: 45-49
- Fallik E, Sarig S, Okon Y** (1994) Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In Y Okon, ed, *Azospirillum/Plant associations*. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp 77-85
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F** (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878
- Fester T, Maier W, Strack D** (1999) Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* **8**: 241-246
- Fokialakis N, Magiatis P, Chinou I, Mitaku S, Tillequin F** (2002) Megistoquinones I and II, two quinoline alkaloids with antibacterial activity from the bark of *Sarcomelicope megistophylla*. *Chem. Pharm. Bull.* **50**: 413-414
- Foster RC** (1986) The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 211-234
- Franche C, Lindström K, Elmerich C** (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* **321**: 35-59
- Frank B** (2005) On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* **15**: 267-275
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M** (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* **176**: 22-36
- Frey M, Schullehner K, Dick R, Fiesselmann A, Gierl A** (2009) Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* **70**: 1645-1651
- Friebe A** (2001) Role of benzoxazinones in cereals. *J. Crop Prod.* **4**: 379 - 400

- Fulchieri M, Lucangeli C, Bottini R** (1993) Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant Cell Physiol.* **34**: 1305-1309
- Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P** (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* **10**: 542-549
- Gahagan HE, Mumma RO** (1967) The isolation of 2-(2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one) β -glucopyranoside from *Zea mays*. *Phytochemistry* **6**: 1441-1448
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J** (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC** (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 413-441
- Glenn AE, Hinton DM, Yates IE, Bacon CW** (2001) Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2973-2981
- Glick BR** (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117
- Glick BR, Laskin AI, Bennett JW, Gadd GM** (2004) Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. In *Advances in Applied Microbiology*, Vol Volume 56. Academic Press, pp 291-312
- Glick BR, Penrose DM, Li J** (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68
- Gómez-Gómez L, Boller T** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**: 251-256
- Gomez-Roldan V, Roux C, Girard D, Bécard G, Puech-Pagés V** (2007) Strigolactones promising plant signals. *Plant Signal Behav.* **2**: 163-164
- Gruhnert C, Biehl B, Selmar D** (1994) Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. *Planta* **195**: 36-42
- Guerreiro N, Redmond JW, Rolfe BG, Djordjevic MA** (1997) New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. *Mol. Plant Microbe In.* **10**: 506-516
- Haas D, Defago G** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 307-319
- Harborne JB** (1988) Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Progr. Clinical Biol. Res.* **280**: 17-27
- Harrigan GG, Stork LG, Riordan SG, Reynolds TL, Ridley WP, Mascucci JD, MacIsaac S, Halls SC, Orth R, Smith RG, Wen L, Brown WE, Welsch M, Riley R, McFarland D, Pandravada A, Glenn KC** (2007) Impact of genetics and environment on nutritional and metabolite components of maize grain. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 6177-6185
- Harrison MJ** (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 19-42
- Hartmann T** (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**: 2831-2846
- Hartmann A, Schmid M, Tuinen D, Berg G** (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* **321**: 235-257
- Hartwig UA, Maxwell CA, Joseph CM, Phillips DA** (1990) Chrysoeriol and luteolin released from Alfalfa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **92**: 116-122
- Heulin T, Guckert A, Balandreau J** (1987) Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. *Biol. Fert. Soils* **4**: 9-14

- Hiltner L** (1904) Über neue Erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbackteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundungung und brache. *Arb. Deut. Landwirsch Ges.* **98**: 59-78
- Huckelhoven R** (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**: 101-127
- Huguet V, Gouy M, Normand P, Zimpfer JF, Fernandez MP** (2005) Molecular phylogeny of Myricaceae: a reexamination of host-symbiont specificity. *Mol. Phylogenet. Evol.* **34**: 557-568
- Huhman DV, Sumner LW** (2002) Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry* **59**: 347-360
- Hungria M, Joseph CM, Phillips DA** (1991) Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**: 751-758
- Hye Kyong K, Rob V** (2010) Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem. Analysis* **21**: 4-13
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Metraux JP** (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe In.* **16**: 851-858
- Jacoud C, Faure D, Wadoux P, Bally R** (1998) Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 43-51
- Jacoud C, Job D, Wadoux P, Bally R** (1999) Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* **45**: 339-342
- Jain DK, Patriquin DG** (1984) Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-Azospirillum associations. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1208-1213
- Jaiti F, Kassami M, Meddich A, El Hadrami I** (2008) Effect of arbuscular mycorrhization on the accumulation of hydroxycinnamic acid derivatives in date palm seedlings challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytochem. Anal.* **156**: 641-646
- James EK** (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res.* **65**: 197-209
- Jansa J, Mozafar A, Frossard E** (2005) Phosphorus acquisition strategies within arbuscular mycorrhizal fungal community of a single field site. *Plant Soil* **276**: 163-176
- Jeong GT, Woo JC, Park DH** (2007) Effect of plant growth regulators on growth and biosynthesis of phenolic compounds in genetically transformed hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Biotechnol. Bioproc. E.* **12**: 86-91
- Jonczyk R, Schmidt H, Osterrieder A, Fiesselmann A, Schullehner K, Haslbeck M, Sicker D, Hofmann D, Yalpani N, Simmons C, Frey M, Gierl A** (2008) Elucidation of the final reactions of DIMBOA-Glucoside biosynthesis in maize: characterization of Bx6 and Bx7. *Plant Physiol.* **146**: 1053-1063
- Jones FR** (1924) A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. *J. Agric. Res.* **29**: 459-470
- Jones P, Vogt T** (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**: 164-174
- Jourdan E, Ongena M, Thonart P** (2008) Carctéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**: 437-449
- Kapanen A, Stephen JR, Brüggemann J, Kiviranta A, White DC, Itävaara M** (2007) Diethyl phthalate in compost: Ecotoxicological effects and response of the microbial community. *Chemosphere* **67**: 2201-2209
- Kato-Noguchi H, Macías F** (2006) Possible mechanism of inhibition of 6-methoxy-benzoxazolin-2(3H)-one on germination of cress (*Lepidium sativum* L.). *J. Chem. Ecol.* **32**: 1101-1109
- Kliebenstein DJ** (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ.* **27**: 675-684.

- Kloepper J, Leong J, Teintze M, Schroth M** (1980) *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiol.* **4** : 317-320
- Klun JA** (1970) Isolation and identification of 6, 7-dimethoxy-2-benzoxazolinone from dried tissues of *Zea mays* (L.) and evidence of its cyclic hydroxamic acid precursor. *J. Agri. Food Chem.* **18**: 663-665
- Klun JA, Robinson JF** (1969) Concentration of two 1, 4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer. *J. Econ. Entomol.* **62**: 214-220
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R** (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**: 923-933
- Kosslak R, Bookland R, Appelbaum ER** (1993) *Bradyrhizobium japonicum* nodulation inducing factor. In, Vol 5, 229, 113. Lubrizol Genetics, Inc., Wickliffe, Ohio, USA
- Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER** (1987) Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *P. Natl Acad. Sci. USA* **84**: 7428-7432
- Kutchan TM** (2001) Ecological arsenal and developmental dispatcher: the paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol* **125**: 58–60
- Kyselková M, Kopecky J, Frapolli M, Defago G, Ságová-Marečková M, Grundmann GL, Moënnel-Loccoz Y** (2009) Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME J* **3**: 1127-1138
- Kyselková M, Kopecky J, Ságová-Marečková M, Grundmann GL, Moënnel-Loccoz Y** (2009) Oligonucleotide microarray methodology for taxonomic and functional monitoring of microbial community. *Plant Soil Environ.* **55**: 379-388
- Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P** (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* **321**: 83-115
- Lavania M, Chauhan P, Chauhan SVS, Singh H, Nautiyal C** (2006) Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Curr. Microbiol.* **52**: 363-368
- Leeman M, Den Ouden FM, Van Pelt JA, Dirkx FPM, Steijl H, Bakker PAHM, Schippers B** (1996) Iron availability affects induction systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **86**: 149-155
- Leeman M, van Pelt JA, den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B** (1995) Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 655-664
- Leighton V, Niemeyer HM, Jonsson LMV** (1994) Substrate specificity of a glucosyltransferase and an *N*-hydroxylase involved in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in gramineae. *Phytochemistry* **36**: 887-892
- Leitner M, Kaiser R, Rasmussen MO, Driguez H, Boland W, Mithöfer A** (2008) Microbial oligosaccharides differentially induce volatiles and signalling components in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **69**: 2029-2040
- Leszczynski B, Dixon AFG** (1990) Resistance of cereals to aphids: Interaction between hydroxamic acids and the aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). *Ann. Appl. Biol.* **117**: 21-30
- Long SR** (1996) Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**: 1885-1898
- Lopez SN, Castelli MV, Zacchino SA, Dominguez JN, Lobo G, Charris-Charris J, Cortes JC, Ribas JC, Devia C, Rodriguez AM, Enriz RD** (2001) In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorgan. Med. Chem.* **9**: 1999-2013
- Lucy M, Reed E, Glick BR** (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 1–25
- Lugtenberg B, Kamilova F** (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-556

- Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV** (2002) Microbial-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 373-383
- Macheix JJ, Fleuriot A, Jay-Allemand C** (2005) Les composés phénoliques des végétaux. Presse Polytechniques et Universitaires Romandes, Lauzanne, Suisse
- Macías FA, Oliveros-Bastidas A, Marin D, Castellano D, Simonet AM, Molinillo JMG** (2004) Degradation studies on benzoxazinoids. soil degradation dynamics of 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) and its degradation products, phytotoxic allelochemicals from *Gramineae*. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 6402-6413
- Maier W, Hammer K, Dammann U, Schulz B, Strack D** (1997) Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. *Planta* **202**: 36-42
- Maier W, Schmidt J, Wray V, Walter MH, Strack D** (1999) The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, induces the accumulation of cyclohexenone derivatives in tobacco roots. *Planta* **207**: 620-623
- Mandal S, Mandal M, Das A, Pati B, Ghosh A** (2009) Stimulation of indoleacetic acid production in a Rhizobium isolate of Vigna mungo by root nodule phenolic acids. *Arch. Microbiol.* **191**: 389-393
- Manuwoto S, Scriber JM** (1985) Consumption and utilization of experimentally altered corn by southern armyworm: Iron, nitrogen, and cyclic hydroxamates. *J. Chem. Ecol.* **11**: 1469-1483
- Mar Vázquez M, César S, Azcón R, Barea JM** (2000) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* **15**: 261-272
- Maresh J, Zhang J, Lynn DG** (2006) The innate immunity of maize and the dynamic chemical strategies regulating two-component signal transduction in *Agrobacterium tumefaciens*. *ACS Chem. Biol.* **1**: 165-175
- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier J-P, Melayah D, Fraissinet-Tachet L, Debaud JC** (2004) *Hebeloma cylindrosporum*: A model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytol.* **163**: 481-498
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anollés G, Rolfe BG, Bauer WD** (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *P. Natl Acad. Sci. USA* **100**: 1444-1449
- Maurhofer M, Hase C, Meuwly P, Métraux JP, Défago G** (1994) Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84**: 139-146
- Maurhofer M, Reimmann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D, Défago G** (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* **88**: 678-684
- Maxwell CA, Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA** (1989) A chalcone and two related flavonoids released from Alfalfa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **91**: 842-847
- Miché L, Battistoni F, Gemmer S, Belghazi M, Reinhold-Hurek B** (2006) Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol. Plant Microbe In.* **19**: 502-511
- Miché L, Bouillant M, Rhor R, Sallé G, Bally R** (2000) Physiological and cytological studies on the inhibition of *Striga* seed germination by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**: 347-351
- Michiels KW, Croes CL, Vanderleyden J** (1991) Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2241-2246
- Mole S, Waterman PG** (1987) A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia* **72**: 148-156

- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2008) Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Mol. Plant Microbe In.* **21**: 1001-1009
- Mora P, Rosconi F, Franco Fraguas L, Castro-Sowinski S** (2008) *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium. *Arch. Microbiol.* **189**: 519-524
- Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen C, Paquette SM, Sánchez-Pérez R, Møller BL, Bak S** (2008) β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **69**: 1795-1813
- Murphy Cowan M** (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Crit. Microbiol. Rev.* **12**:564-582
- Nagao T, Otsuka H, Kohda H, Sato T, Yamasaki K** (1985) Benzoxazinones from *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *Phytochemistry* **24**: 2959-2962
- Nguyen C** (2009) Rhizodeposition of organic C by plant:Mechanisms and controls. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Véronique S, Alberola C (eds) *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, pp 97-123
- Nicholson RL, Hammerschmidt R** (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 369-389
- Nicol D, Copaja SV, Wratten SD, Niemeyer HM** (1992) A screen of worldwide wheat cultivars for hydroxamic acid levels and aphid antixenosis. *Ann. Appl. Biol.* **121**: 11-18
- Niemeyer HM** (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* **27**: 3349-3358
- Niemeyer HM** (2009) Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one: Key defense chemicals of cereals. *J. Agri. Food Chem.* **57**: 1677-1696
- Normand P, Orso S, Cournoyer B, Jeannin P, Chapelon C, Dawson J, Evtushenko L, Misra AK** (1996) Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family Frankiaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 1-9
- Normand P, Queiroux C, Tisa LS, Benson DR, Rouy Z, Cruveiller S, Médigue C** (2007) Exploring the genomes of *Frankia*. *Physiol. Plantarum* **130**: 331-343
- Normand P, Simonet P, Bardin R** (1988) Conservation of nif sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 238-246
- Novak K, Chovanec P, Skrdleta V, Kropacova M, Lisa L, Nemcova M** (2002) Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Exp. Bot.* **53**: 1735-1745
- Nozawa T, Maruyama Y** (1988) Denitrification by a soil bacterium with phthalate and other aromatic compounds as substrates. *J. Bacteriol.* **170**: 2501-2505
- Oikawa A, Ishihara A, Hasegawa M, Kodama O, Iwamura H** (2001) Induced accumulation of 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside (HDMBOA-Glc) in maize leaves. *Phytochemistry* **56**: 669-675
- Oikawa A, Ishihara A, Tanaka C, Mori N, Tsuda M, Iwamura H** (2004) Accumulation of HDMBOA-Glc is induced by biotic stresses prior to the release of MBOA in maize leaves. *Phytochemistry* **65**: 2995-3001
- Okon Y, Cakmakci L, Nur I, Chet I** (1980) Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*: A note. *Microb. Ecol.* **6**: 277-280
- Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI, Hartmann A** Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.* **45**: 106-113
- Pare JRJ, Belanger JMR, Stafford SS** (1994) Microwave-Assisted Process (MAPTM) a new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **13**: 176-184
- Park WJ, Schäfer A, Prinsen E, van Onckelen H, Kang BG, Hertel R** (2001) Auxin-induced elongation of short maize coleoptile segments is supported by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Planta* **213**: 92-100
- Parniske M** (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 763-775

- Peipp H, Maier W, Schmidt J, Wray V, Strack D** (1997) Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry* **44**: 581-587
- Pérez FJ, Ormeño-Nuñez J** (1991) Root exudates of wild oats: Allelopathic effect on spring wheat. *Phytochemistry* **30**: 2199-2202
- Peters NK, Frost JW, Long SR** (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**: 977-980
- Peters NK, Long SR** (1988) Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* **88**: 396-400
- Pichersky E, Gershenzon J** (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 237-243
- Popovici J, Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Fernandez MP, Comte G** Inoculation of *Myricaceae* species with *Frankia* strains leads to host specificity-dependant modifications of the root phenolic profiles of host plants. *Plant Physiol.* **In preparation**
- Pothier JF, Wisniewski-Dye F, Weiss-Gayet M, Moenne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C** (2007) Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* **153**: 3608-3622
- Pratt K, Kumar P, Chilton WS** (1995) Cyclic hydroxamic acids in dicotyledonous plants. *Biochem. Syst. Ecol.* **23**: 781-785
- Preston GM** (2004) Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Phil. Trans. R.I Soc. B* **359**: 907-918
- Prigent-Combaret C, Blaha D, Pothier JF, Vial L, Poirier MA, Wisniewski-Dyé F, Moëgne-Loccoz Y** (2008) Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**: 202-219
- Prinsen E, Chauvaux N, Schmidt J, John M, Wieneke U, De Greef J, Schell J, Van Onckelen H** (1991) Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS Lett.* **282**: 53-55
- Prinz S, Schauburger D, Bauer IM, Knasmueller S, Kopp B** (2010) Aneugenic 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA) in sprouts of *Triticum aestivum* cultivars - A 'safety health food'? *Food Chemistry* **121**: 973-979
- Raaijmakers J, Paulitz T, Steinberg C, Alabouvette C, Moëgne-Loccoz Y** (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **321**: 341-361
- Raaijmakers JM, Bonsall RF, Weller DM** (1999) Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-Diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* **89**: 470-475
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT** (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 537-547
- Raja P, Uma S, Gopal G, Govindarajan K** (2006) Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. *J. Biol. Sci.* **6**: 815-823
- Raju PS, Clark RB, Ellis JR, Maranville JW** (1990) Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. *Plant Soil* **121**: 165-170
- Rao VR, Ramakrishnan B, Adhya TK, Kanungo PK, Nayak DN** (1998) Review: Current status and future prospects of associative nitrogen fixation in rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 621-633
- Raskin I** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 439-463
- Reberg-Horton SC, Burton JD, Daneshmandi DA, Ma G, Monks DW, Murphy JP, Ranells NN, Williamson JD, Creamer NG** (2005) Changes over time in the allelochemical content of ten cultivar of rye (*Secale cereale* L.). *J. Chem. Ecol.* **31**: 179-193

- Recourt K, Tunen AJ, Mur LA, Brussel AAN, Lugtenberg BJJ, Kijne JW** (1992) Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Mol. Biol.* **19**: 411-420
- Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes J, Mendez N, Toscano V, Mulling M, Galvez L, Vanderleyden J** (2008) Effect of *Rhizobium* – *Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* **312**: 25-37
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M** (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* **68**: 33-40
- Ribaudo CM, Rondanini DP, Curá JA, Fraschina AA** (2001) Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biol. Plantarum* **44**: 631-634
- Richardson A, Barea J-M, McNeill A, Prigent-Combaret C** (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* **321**: 305-339
- Rillig MC, Mummey DL** (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* **171**: 41-53
- Rivero RM, Ruiz JM, García PC, López-Lefebvre LR, Sánchez E, Romero L** (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* **160**: 315-321
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R** (2004) When defense pathways collide: The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* **134**: 1683-1696
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L** (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant Journal* **23**: 131-142
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L** (2000) Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant Journal* **23**: 131-142
- Rolfe BG** (1988) Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors* **1**: 3-10
- Rout G** (2006) Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) kuntze and associated biochemical changes. *Plant Growth Regul.* **48**: 111-117
- Rovira A** (1969) Plant root exudates. *The Botanical Review* **35**: 35-57
- Sahi SV, Chilton MD, Chilton WS** (1990) Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *P. Natl Acad. Sci. USA* **87**: 3879-3883
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanguin H, Remenant B, Dechesne A, Thioulouse J, Vogel TM, Nesme X, Moëgne-Loccoz Y, Grundmann GL** (2006). Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:4302-4312.
- Sanguin H, Sarniguet A, Gazengel K, Moëgne-Loccoz Y, Grundmann GL** (2009) Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytologist* **184**: 694-707
- Sarma BK, Singh UP** (2003) Ferulic acid may prevent infection of *Cicer arietinum* by *Sclerotium rolfsii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 123-127
- Sasakawa H, Hiyoshi T, Sugiyama T** (1988) Immuno-gold localization of nitrogenase in root nodules of *Elaeagnus pungens* thunb. *Plant Cell Physiol.* **29**: 1147-1152

- Savouré A, Magyar Z, Pierre M, Brown S, Schultze M, Dudits D, Kondorosi A, Kondorosi E** (1994) Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago* microcallus suspensions. *EMBO J.* **13**: 1093-1102
- Scalbert A** (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**: 3875-3883
- Schliemann W, Kolbe B, Schmidt J, Nimtz M, Wray V** (2008) Accumulation of apocarotenoids in mycorrhizal roots of leek (*Allium porrum*). *Phytochemistry* **69**: 1680-1688
- Schmelzer E, Jahnen W, Hahlbrock K** (1988) In situ localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *P. Natl Acad. Sci. USA* **85**: 2989-2993
- Selvaraj T, Rajeshkumar S, Nisha MC, Wondimu L, Tesso M** (2008) Effect of *Glomus mosseae* and plant growth promoting rhizomicroorganisms (PGPR's) on growth, nutriment and content of secondary metabolites in *Begonia malabarica* Lam. *Maejo Int. J. Sci. Tech.* **2**: 516-525
- Sharma SB, Signer ER** (1990) Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta revealed by transposon Tn5-gusA. *Gene Dev.* **4**: 344-356
- Shirley BW** (1996) Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends Plant Sci.* **1**: 377-382
- Sicker D, Frey M, Schulz M, Gierl A** (2000) Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. In: Kwang WJ (ed) *International Review of Cytology*. Academic Press, pp 319-346
- Siddiqui IA, Shahid Shaukat S** (2003) Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biol. Biochem.* **35**: 1615-1623
- Singh UP, Sarma BK, Singh DP** (2003) Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*). *Curr. Microbiol.* **46**: 131-140
- Søltoft M, Jørgensen LN, Svensmark B, Fomsgaard IS** (2008) Benzoxazinoid concentrations show correlation with *Fusarium* head blight resistance in Danish wheat varieties. *Biochem. System. Ecol.* **36**: 245-259
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M** (2004) Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**: 205-240
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R** (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 425-448
- Sprent JI** (2008) 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J. Exp. Bot.* **59**: 1081-1084
- Steenhoudt O, Vanderleyden J** (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 487-506
- Steinberg C, Gamard P, Faurie G, Lensi R** (1989) Survival and potential denitrifying activity of *Azospirillum lipoferum* and *Bradyrhizobium japonicum* inoculated into sterilized soil. *Biol. Fert. Soils* **7**: 101-107
- Subramanian KS, Charest C, Dwyer LM, Hamilton RI** (1995) Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytol.* **192**: 643-650
- Sudha G, Ravishankar GA** (2002) Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **71**: 181-212
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA** (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* **62**: 817-836
- Tang C-S, Chang SH, Hoo D, Yanagihara KH** (1975) Gas chromatographic determination of 2(3)-benzoxazolinones from cereal plants. *Phytochemistry* **14**: 2077-2079
- Tipton CL, Klun JA, Husted RR, Pierson MD** (1967) Cyclic hydroxamic acids and related compounds from maize. Isolation and characterization. *Biochemistry* **6**: 2866-2870

- Tobar RM, Azcón R, Barea JM** (1994) The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza* **4**: 105-108
- Van der Meer IM, Stam ME, van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitje AR** (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in Petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* **4**: 253-262
- Van Peer R, Schippers B** (1992) Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Eur. J. Plant Pathol.* **98**: 129-139
- van Rhijn P, Vanderleyden J** (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**: 124-142
- Van Rossum D, Schuurmans FP, Gillis M, Muyotcha A, Van Verseveld HW, Stouthamer AH, Booger FC** (1995) Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1599-1609
- Van Wees SCM, Pieterse CMJ, Trijsenaar A, Van 't Westende YAM, Hartog F, Van Loon LC** (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant Microbe In.* **10**: 716-724
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang H-S, van Loon LC, Pieterse CMJ** (2004) The Transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe In.* **17**: 895-908
- Verpoorte R** (2000) Metabolic engineering of plant secondary metabolism, Ed Verpoorte, R., Alfermann, A.W. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Vierheilig H** (2005) Regulatory mechanisms during the plant - arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Can. J. Bot.* **82**:1166-1176
- Villagrasa M, Guillaumon M, Eljarrat E, Barceló D** (2006) Determination of benzoxazinone derivatives in plants by combining pressurized liquid extraction-solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Agri. Food Chem.* **54**: 1001-1008
- Voisard C, Keel C, Haas D, Dèfago G** (1989) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* **8**: 351-358
- Volpin H, Burdman S, Castro-Sowinski S, Kapulnik Y, Okon Y** (1996) Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial nod-gene inducers by alfalfa roots. *Mol. Plant Microbe In.* **9**: 388-394
- Volpin H, Kapulnik Y** (1994) Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In Y Okon, ed, *Azospirillum/Plant associations*. CRC Press, Boca Raton, pp 111-118
- Von Felten A, Dèfago G, Maurhofer M** Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. *J. Microbiol. Meth.* **81**: 108-115
- Wahlroos O, Virtanen AI** (1956) The precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties. *Acta Chem. Scand.* **13**: 1906-1908
- Walker T, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM** (2003) Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol.* **132**: 44-51
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moënné-Loccoz Y, Bally R, Comte G** (2010) Host plant secondary metabolite profiling shows complex, strain-dependent response of maize to the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum*. *New Phytol.* (In press)
- Walter MH, Floß DS, Hans J, Fester T, Strack D** (2007) Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: Contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* **68**: 130-138
- Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S** (2005) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe In.* **18**: 385
- Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder LK, De la Fuente L, Blouin Bankhead S, Allende Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DV, Thomashow LS** (2007) Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant biology* **9**: 4-20

- Weller DM, van Pelt JA, Mavrodi DV, Pieterse CMJ, Bakker PAHM, van Loon LC** (2004) Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **94** (suppl.): S108
- Wilkes MA, Marshall DR, Copeland L** (1999) Hydroxamic acids in cereal roots inhibit the growth of take-all. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 1831-1836
- Wink M** (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 225-233
- Wong E** (1973) Plant phenolics. Chemistry and Biochemistry of Herbage, vol 1 **London: Academic Press**: 265-322
- Woodward MD, Corcuera LJ, Helgeson JP, Upper CD** (1978) Decomposition of 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in aqueous solutions. *Plant Physiol.* **61**: 796-802
- Wu H, Haig T, Partley J, Lemerle D, An M** (2001) Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): production and exudation of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *J. Chem. Ecol.* **27**: 1691-1700
- Xuan T, Chung, III, Khanh T, Tawata S** (2006) Identification of phytotoxic substances from early growth of Barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) root exudates. *J. Chem. Ecol.* **32**: 895-906
- Yamaguchi M, Sharp RE** (2010) Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant, Cell & Environment* **33**: 590-603
- Yegorenkova IV, Konnova SA, Sachuk VN, Ignatov VV** (2001) *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. *Plant Soil* **231**: 275-282
- Zelenev VV, van Bruggen AHC, Semenov AM** (2005) Modeling wave-like dynamics of oligotrophic and copiotrophic bacteria along wheat roots in response to nutrient input from a growing root tip. *Ecol. Model.* **188**: 404-417
- Zhang J, Boone L, Kocz R, Zhang C, Binns AN, Lynn DG** (2000) At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation. *Chemistry and Biology* **7**: 611-621
- Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O** (2009) Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J.* **57**: 171-183

ANNEXES

Composition des milieux de culture

Milieu LBm

Bacto-tryptone (Difco)	10 g
Extrait de levure (Difco)	5 g
NaCl	5 g
Eau déminéralisée qsp	1 L
Pour milieu solide Agar granulé (Difco)	15 g

Milieu NFB

- Solution majeure (à autoclaver) :

$C_4H_4O_5Na$	2 25 g
Eau déminéralisée qsp	933 ml
Ajuster à pH 7	

Pour milieu solide Agar granulé (Difco)	15g
---	-----

- Solution de sels (à autoclaver) :

$MgSO_4 : 7H_2O$	0,8 g
$CaCl_2 : 2H_2O$	0,104 g
NaCl	0,4g
$Na_2MoO_4 : 2H_2O$	0,008 g
$MnCl_2 : 4H_2O$	0,028 g

Eau déminéralisée qsp	400ml
-----------------------	-------

- Solution de phosphates (à autoclaver) :

KH_2PO_4	4 44g
K_2HPO_4	4 46g
Eau déminéralisée qsp	100ml

- Solution de fer-EDTA (à autoclaver)

$FeSO_4 : 7H_2O$	0,631 g
EDTA	0,592 g
Eau déminéralisée qsp	50ml

- Solution de biotine (à filtrer sur 0,22 µm, Millipore)

Biotine	0,05 g
Ethanol absolu qsp	50 ml

Pour l'utilisation, ajouter à 933 ml de solution majeure :

- 50 ml de solution de sels
- 15 ml de solution de phosphates
- 1 ml de solution de fer-EDTA
- 1 ml de solution de biotine

Article en préparation

Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth

O. Couillerot^{1,2,3}, J.A. Ramírez-Trujillo⁴, V. Walker^{1,2,3}, A. von Felten⁵, J. Jansa⁶, M. Maurhofer⁵, G. Défago⁵, G. Comte^{1,2,3}, J. Caballero-Mellado⁴, Y. Moënné-Loccoz^{1,2,3}

¹ Université de Lyon, F-69622, Lyon, France

² Université Lyon 1, Villeurbanne, France

³ CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France

⁴ Centro de Ciencias Genómicas (CCG), Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México

⁵ Institute of Integrative Biology, ETH, CH-8092 Zürich, Switzerland

⁶ Institute of Plant Sci.s, ETH, Eschikon, CH-8315 Lindau, Switzerland

Journal:

* Corresponding author.

Abstract

Azospirillum are prominent PGPR extensively used as phytostimulatory crop inoculants, but only few studies are dealing with *Azospirillum*-containing mixed inocula involving more than two microorganisms. We compared here three prominent *Azospirillum* strains as part of three-component consortia including also the PGPR *Pseudomonas fluorescens* F113 and a mycorrhizal inoculant mix composed of three *Glomus* strains. The experiment was performed with maize and showed that phytostimulation was comparable with all three-component consortia. This same phytostimulation occurred despite contrasted survival of the *Azospirillum* strains and different plant responses to inoculation, as indicated by profiles of maize secondary metabolites. Unexpectedly, the presence of *Azospirillum* in the inoculum resulted in lower phytostimulation in comparison with the *Pseudomonas-Glomus* two-component consortium, but this effect was transient. A PCR method was designed to assess transcription of auxin synthesis gene *ipdC* in *Azospirillum* spp.. It showed that the gene was transcribed in all treatments, especially with three-component consortia, but not with all plants and samplings. Inoculation had no major impact on the prevalence of mycorrhizal taxa in roots. In conclusion, this study brought new insights in the functioning of microbial consortia and showed that *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* three-component consortia may be useful for maize growth promotion.

Introduction

Azospirillum are prominent PGPR used as inoculants for phytostimulation of several types of crops (mainly cereals) under different climatic conditions, and they may lead to improved crop yields (Charyulu *et al.*, 1985; Okon *et al.*, 1994; Pedraza *et al.*, 2009; Dobbelaere *et al.*, 2001). Crop inoculation is also receiving attention as a mean to reduce chemical fertilizer doses without affecting crop yield, and can thus be evaluated as a component of integrated management strategies (Adesemoye *et al.*, 2009; Fuentes-Ramirez *et al.*, 2006; El Zemrany *et al.*, 2006). Several modes of action have been documented in *Azospirillum* PGPR, noticeably nitrogen fixation (James, 2000), nitric oxide production (Creus *et al.*, 2005) and 1-aminocyclopropane-1-decarboxylate deaminase activity (Prigent-Combaret *et al.*, 2008), but production of phytohormones such as auxins is often proposed as the main phytobeneficial mechanism (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Interactions of *Azospirillum* PGPR inoculants with other rhizosphere microorganisms have been considered by studying the ecological impact of inoculation on non-target, resident microorganisms and the plant effect of mixed inocula involving *Azospirillum* strains. Studies on the ecological impact of *Azospirillum* inoculation did not evidenced any positive interaction with indigenous microorganisms (Herschkovitz *et al.*, 2005; Herschkovitz *et al.*, 2005b; Basaglia *et al.*, 2003; Lerner *et al.*, 2006; Baudoin *et al.*, 2009b; Naiman *et al.*, 2009; Russo *et al.*, 2005). On the other hand, the potential use of *Azospirillum* PGPR strains in mixed inocula has been considered (Bashan 1998; Cassan *et al.*, 2009), but it remains poorly documented. By combining microorganisms with different metabolic capacities (N₂ fixation, P mobilization, production of phytohormones and antimicrobials, etc.), we could expect additive or synergistic effects resulting from the combination of different phytobeneficial capacities.

Several studies have focused on *Azospirillum* dual-inoculation with (i) other *Azospirillum* strains (Bashan, 2000 ; Han *et al.*, 1998), (ii) *Bacillus* (El-komy, 2005), (iii) *Bradyrhizobium* (Cassan *et al.*, 2009 ; Steinberg *et al.*, 1989), (iv) phosphate-solubilizing bacteria (*Arthobacter* or *Agrobacterium*) (Belimov *et al.*, 1995), (v) *Rhizobium* (Remans *et al.*, 2008; Raverkar *et al.*, 1988), and (vi) *Glomus* (Mar Vázquez *et al.*, 2000; Pulido *et al.*, 2003), but only certain of them have shown enhanced plant growth stimulation compared to single inoculation (Belimov *et al.*, 1995; El-komy, 2005; Remans *et al.*, 2008). To our knowledge, only two studies have focused on interactions established in complex *Azospirillum* mixed-inocula involving more than two microorganisms, i.e. *Rhizobium* and

arbuscular mycorrhizal fungi (AMF; (Biró *et al.*, 2000)), and *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* and *Herbaspirillum* (Oliveira *et al.*, 2009). Co-inoculation of *Azospirillum* with *Glomus* reduced the phytostimulatory activity of the later, whereas synergistic effects were evidenced when the two microorganisms were co-inoculated with *Rhizobium* (Biró *et al.*, 2000). Similarly, the competition occurring between *Burkholderia* and *Azospirillum* disappeared when the two were co-inoculated in a mixed-consortium involving three other rhizobacteria, leading to enhanced colonization rates (Oliveira *et al.*, 2009). Thus, negative interactions observed in dual inoculations were replaced by positive interactions in more complex inocula.

In this study, three prominent *Azospirillum* strains were compared when inoculated as part of a three-component consortium also including another PGPR inoculant (*Pseudomonas fluorescens* F113) and an AMF inoculant mix composed of three *Glomus* species. *P. fluorescens* F113 is another PGPR extensively studied as crop inoculant, and this strain has been shown to be a Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB; Barea *et al.*, 1998; Garbaye *et al.*, 1994). In the case of maize, *A. lipoferum* CRT1 is one of the important PGPR strains used in Europe (Jacoud *et al.*, 1998; Lucy *et al.*, 2004; El Zemrany *et al.*, 2006), whereas *A. brasilense* UAP-154 and CFN-535 inoculants are extensively used under agronomic conditions in Mexico, which is one of the leading countries in field inoculation (Fuentes-Ramirez *et al.*, 2006; Dobbelaere *et al.*, 2001). Phytostimulation by *Azospirillum* strains has been shown to be cell-density dependant (Jacoud *et al.*, 1999), and effective early root colonization is required for effective stimulation (Dobbelaere *et al.*, 2002).

Thus, the objective of this study was to compare *A. lipoferum* CRT1, *A. brasilense* UAP-154 and CFN-535 in *Azospirillum*-*Pseudomonas*-*Glomus* consortia for promotion of maize growth. The experiment was performed under greenhouse conditions. Rhizosphere survival of inoculated PGPR and root mycorrhization were studied, as well as the effects on plant growth and on plant metabolic markers.

Material and Methods

Microorganisms

Bacteria used in this study were *A. brasilense* strains UAP-154 and CFN-535, both isolated from maize in Mexico (Dobbelaere *et al.*, 2001), *A. lipoferum* CRT1 recovered from maize in France (Fages et Mulard, 1988) and *P. fluorescens* F113 isolated from sugarbeet in Ireland (Fenton *et al.*, 1992). To obtain *Azospirillum* inocula, strains were grown in NFb liquid

medium (Döbereiner et Day, 1976) supplemented with NH_4Cl (0.2 g l^{-1}) for 2 days at 30°C with shaking at 200 rpm. The cultures were adjusted to an optical density (OD_{600}) of 0.6, giving 5×10^7 (for *A. lipoferum* CRT1), 2×10^9 (for *A. brasilense* UAP-154) and 7×10^9 (for *A. brasilense* CFN-535) CFU per ml. *P. fluorescens* F113 was grown in Luria Bertani medium supplemented with $0.25 \text{ g l}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (LB-Mg) for 8 h at 30°C and 200 rpm. The culture was adjusted with LB-Mg to an OD_{600} of 0.2, giving 2×10^7 CFU per ml. Colony counts of inocula were obtained on RC agar (Rodriguez Caceres *et al.*, 1982) for *Azospirillum* strains and LB-Mg agar for *P. fluorescens* F113, after a 72-h incubation of plates at 30°C .

The mycorrhizal inoculum consisted of a mixture of the Swiss isolates *Glomus intraradices* JJ291, *G. claroideum* JJ360, and *G. mosseae* JJ964 (Jansa *et al.*, 2005). Each was prepared in plant cultures following commercial procedures by Symbio-M (Lanskroun, Czech Republic). Mycorrhized roots were chopped, mixed together and with zeolite carrier. The inoculum product contained 5.3×10^4 (*G. intraradices* JJ291), 2.9×10^4 (*G. claroideum* JJ360) and 2.5×10^3 (*G. mosseae* JJ964) gene copies of the nuclear Large Ribosomal Sub-Unit (nLSU) per g.

Greenhouse experiment

A greenhouse experiment was performed with sieved (4 mm) non-sterile soil taken from the loamy-sandy surface horizon of a Mexican oxisol from a field at Zacatepec near Cuernavaca, Morelos (clay 4.8%, silt 7.9%, sand 87.3%, organic matter 4.3%, pH 7.5). Seeds of maize (*Zea mays*) var. Costeño Mejorado (PROSASOL, Huitchila Morelos, Mexico) were surface-sterilized by stirring in sodium dichloroisocyanurate-containing Bayrochlor Mini solution (Bayrol, Dardilly, France) for 15 min, and washed several times with sterile distilled water (Couillerot *et al.*, 2010). The seeds were then germinated on water agar (8.5 g l^{-1}) for 24 h in the dark at 30°C .

Treatments included (i) a non-inoculated control, (ii) inoculation with a two-component consortium composed of *P. fluorescens* F113 and *Glomus* mix, and (iii) inoculation with a three-component consortium containing the two-component consortium and either *A. lipoferum* CRT1, *A. brasilense* UAP-154 or CFN-535. For each bacterial strain, inoculation was done by adding 1 ml of cell suspension (described above) to each germinated seed. In addition, 65 g of zeolite-formulated *Glomus* inoculum was placed approximately 3 cm below each germinating seed. Sterile water (2 ml) and non-inoculated zeolite (65 g) were used in the non-inoculated control, and 1 ml sterile water in the *Pseudomonas-Glomus* treatment.

For the 10-d sampling, 4 maize plants were grown in 1-dm³ pots containing 1.5 kg soil previously supplemented with 270 ml sterile nutrient solution (described in Rodriguez-Salazar *et al.*, 2009). For the later samplings (i.e. at 21 and 35 d), 2 maize plants were grown in 2-dm³ pots containing 2.3 kg soil previously supplemented with 340 ml of sterile nutrient solution. Five pots were used per treatment, and the 75 pots were placed in a greenhouse (randomized block design) with controlled temperature (26 °C ± 4 °C) and natural light and located at Cuernavaca (Mexico). Watering was done by adding 270 and 340 ml of nutrient solution each day in 1 and 2-dm³ pots, respectively.

Sampling

Watering of the pots was reduced 48 h before the second and third samplings, and stopped 24 h before each sampling. At each sampling, all shoots were cut off and dried 2-4 d at 70°C for biomass determination, one root system per pot was used for *ipdC* RT PCR analysis, and another root system per pot for real-time PCR quantification of PGPR inoculants (and AMF genotypes at the 35-d sampling, after splitting the root system in two parts). In addition, two other root systems per pot were used for plant metabolomic analysis at the first sampling (10 d).

DNA preparation

For PGPR inoculant monitoring, each root system was shaken vigorously to discard soil loosely adhering to the roots. Roots and tightly-adhering soil were transferred in a 50-ml Falcon and flash-frozen in liquid nitrogen. Samples were then lyophilized for 48 h in Falcon tubes and homogenized by crushing in the tubes using a spatula. 250-300 mg of lyophilized sample (rhizosphere soil + roots) were transferred in Lysing Matrix E tubes from the FastDNA[®] SPIN[®] kit (BIO 101 Inc., Carlsbad, CA), and DNA was extracted and eluted in 50 µl of sterile ultra-pure water, according to the manufacturer's instructions. DNA concentrations were assessed by OD measurements at 260 nm using NanoDrop (Nanodrop technologies, Wilmington, DE).

For AMF monitoring, roots from the third sampling were cut in 5-cm pieces. They were washed in ice-cold tap water, flash-frozen in liquid nitrogen, and lyophilized for 48 h in Eppendorf tubes. Lyophilized roots samples (25-35 mg) were homogenized by dry bead-beating three times 45 s with glass balls (1 mm diameter) in Biospec Beadbeater-8. DNA was then extracted with Plant DNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following manufacturer's recommendations.

Real-time PCR assessments

Root colonization was assessed by real-time PCR, as described in Couillerot *et al.*, (submitted; for *A. brasilense* inoculants), Couillerot *et al.*, (in preparation; for *A. lipoferum* inoculant), von Felten *et al.*, (submitted; for *P. fluorescens* inoculant), Thonar *et al.*, (submitted; for XX) and Jansa *et al.*, (submitted; for XX). Briefly, real-time PCR for *Azospirillum* strains was done using the FastStart DNA Master SYBR Green I kit and a LC-480 LightCycler (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), and that for *P. fluorescens* F113 using the Fast SYBR Green kit and a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The inoculant strain *G. intraradices* JJ291, as well as the species *G. intraradices*, *G. claroideum* and *G. mosseae* (to which the inoculants belonged) and the AMF genera *Gigaspora*, *Scutellospora* and *Diversispora* were assessed by targeting the nuclear or the mitochondrial Large ribosomal Sub-Unit (respectively nLSU or mtLSU). Real-time PCR was done using TapMan Master kit and a LightCycler 2.0 (Roche Applied Science). Melting curve calculation and determination of T_m values were performed using the polynomial algorithm function of LightCycler Software v.1 (Roche Applied Science) or of the Sequence detection Software v.1.4 (Applied Biosystems).

Normalization of the data

Plasmid APA9 (i.e. pUC19 with cassava virus insert; Genbank accession number AJ427910) was used as internal standard to normalize C_T values. Real-time analyzes for *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* AMF were carried out in different laboratories with different LightCyclers, so normalization was done separately. Briefly, known quantities of purified plasmid APA9 were added at the first step of each DNA extraction protocol, and real-time PCR analyzes were then performed on each DNA extract. C_T values thus obtained for the internal standard were used to normalize DNA extraction efficiency (Park *et al.*, 2005) with the following formula:

$$\text{Normalized } C_T \text{ value of each sample} = \frac{C_T \text{ value of each sample}}{C_T \text{ value of each internal standard}} \times \text{Average } C_T \text{ value of internal standard}$$

Generation of standard curves for real-time PCR assessments

Real-time PCR quantification of PGPR inoculants in the rhizosphere required development of standard curves. Briefly, Lysing-Matrix E tubes (BIO 101 Inc.) containing 250-300 mg lyophilized sample (i.e. rhizosphere soil + roots) from the non-inoculated control (obtained as

described above) were inoculated with one of the four PGPR strains. DNA extraction was performed using the FastDNA[®] SPIN[®] kit (BIO 101 Inc.) and real-time PCR was done as described above. A standard curve for each strain was generated by plotting the C_T number against the logarithm of CFU added per g of soil, for the three independent replicates. Amplification efficiency was calculated from the slope of the standard curve using the formula $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ and standard curves were then used to estimate inoculant cell number in the rhizosphere of seed-inoculated maize plants. Real-time PCR quantification data were expressed as log cell equivalents per g of dry root.

Real-time PCR assays of the different AMF phylotypes was calibrated by using serially-diluted cloned fragments (pGEM-T Easy vector, Promega) of the AMF large ribosomal subunit, as described (Jansa *et al.*, submitted). Real-time PCR quantification data were converted to log gene copies per g of dry root.

***ipdC* reverse transcriptase PCR analysis**

Primers *ipdcF3* (5'-CTTGCCCTTCTTCAAGGTGG-3') and *ipdCR3* (5'-GGGGGATTTCAGATAGACC-3') were designed for transcription analysis of auxin synthesis gene *ipdC* in *Azospirillum* spp., after alignment of all published *ipdC* sequences. Primer validation was performed by PCR (as described below) using genomic DNA from XX *Azospirillum* and XX non-*Azospirillum* strains, and showed that primers were genus specific.

Transcription of *ipdC* by *Azospirillum* spp. was measured by reverse-transcriptase (RT) PCR. Each root system studied was placed (with adhering soil) in a 50 ml Falcon tube and flash frozen in liquid nitrogen. Samples were then washed with 35 ml solution of 100 mM CaCl₂ and 50 mM Tris-HCl pH 7.0 (prepared with 0.5% v/v DEPC treated water) supplemented with β-mercaptoethanol 5%. This solution was centrifuged for 5 min at 6 g. Soil particles and root debris were discarded and the supernatant was centrifuged for 5 min at 2,250 g. The resulting cell pellet was resuspended in 1 ml of TRIZOL reagent (Invitrogene, Carlsbad, CA). DNase treatment was then performed and cDNA synthesis was done with RevertAid[™] H minus cDNA synthesis kit (Fermentas, Ontario, CDN). Low amounts of RNA were recovered, so only 600 ng of RNA were used per reaction. Amplification was done with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), using 2 µl of cDNA as template, and primers *ipdcF3* and *ipdCR3*. Because amplification was not observed directly in PCR assays, it was necessary carry out nested PCR. For re-amplification, 4 µl of PCR were diluted in 100 µl of water and 2 µl of this dilution were used for the next reaction.

Metabolomic analysis

At 10 days, the root systems from two plants per pot were washed with ice-cold distilled water and placed in aluminum envelopes before being flash-freezing in liquid nitrogen. Samples were then lyophilized for 72 h and stored at -80°C until analysis. Freeze-dried roots were introduced in Eppendorf tubes, to which liquid nitrogen was added. Roots were crushed using a ball mill (TissueLyser II, Qiagen), and extraction was performed using 2 mL methanol for 10 mg of dry sample. Extraction was done twice and extracts were dried using Speedvac-assisted evaporation. Each sample was then resuspended in methanol to reach 10 mg dry extract/mL.

Chromatographic analysis of the extracts was achieved with an Agilent 1200 series HPLC equipped with a degasser (G132A), a quaternary pump module (G1311A), an automatic sampler (G1329A) and a Diode Array Detector (DAD G1315B). The separation was carried out at room temperature using a NUCLEODUR sphinx C18 column (250 × 4.6 mm; 5 µm-Macherey-Nagel®, Düren, Germany). For each sample, 20 µL of extract was injected and the column was eluted at 1 mL/min, with an optimized gradient established using solvents A (acetic acid 4 ‰ (v/v) in water) and B (acetic acid 4 ‰ (v/v) in acetonitrile) (Carloerba ® reagents, Val de Reuil, France). A step by step gradient was used with an increase of proportion of solvent B until 15% during 5 min, then an isocratic level from 30 min, with a flux of 1 mL/min. Chromatograms were recorded and processed at 254, 280, 310, and 366 nm. The Chemstation Agilent software was used for integration and comparison of chromatograms. Each chromatogram was integrated after standardization of integration parameters. Background peaks present on chromatograms were not integrated. Individual compounds were identified based on the results of Walker *et al.*, (submitted).

Statistics

Statistical analyses of real-time quantification data, *ipdC* expression data, and shoot biomass were performed at $P < 0.05$, using S plus software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA). Chromatographic data obtained from root extracts, i.e. retention time and relative area of each integrated peak, were compiled in a matrix for discriminant principal component analysis (PCA), as described by Walker *et al.*, (submitted). Treatments were studied by ANOVA followed with Fisher's LSD tests ($P < 0.05$).

Results

Effect of microbial consortia on maize growth

By comparison with the non-inoculated control, inoculation of maize with the *Pseudomonas-Glomus* two-component consortium (i.e., *P. fluorescens* F113 and a mix of three *Glomus* isolates) resulted in higher shoot biomass at the first two samplings (Table 1). Shoot biomass was also higher in all three-component consortia than in the non-inoculated control at the first two samplings, but results were not influenced by the identity of the *Azospirillum* strain (Table 1). At the first sampling, however, shoot biomass in the two-component control was higher than those in the three-component consortia. Shoot biomass was not influenced by inoculation at the third sampling, but this result was of limited significance since by then roots had entirely colonized the whole soil volume in the pots and could not expand further.

Inoculant colonization of maize roots

When the *Pseudomonas-Glomus* two-component consortium was used, *P. fluorescens* F113 was enumerated at about 10^8 cell equivalents per g of rhizosphere at the first sampling and at 2 log units lower by the third sampling (Fig 1A). The presence of an *Azospirillum* inoculant resulted in higher F113 population levels at one of the three samplings (with *A. lipoferum* CRT1 or *A. brasilense* UAP-154), or had no effect on the pseudomonad (with *A. brasilense* CFN-535). As expected, strain F113 was not found in the non-inoculated treatment.

The population size of *A. brasilense* CFN-535 dropped from 1.5×10^7 to 2.7×10^5 cell equivalents per g of rhizosphere from the first to the third sampling (Fig 1B). In comparison, *A. brasilense* UAP-154 and especially *A. lipoferum* CRT1 were recovered at lower levels, which fell below detection limit (4×10^3 cell equivalents per g of rhizosphere) by the second (for strain CRT1) or third sampling (for strain UAP-154). None of the *Azospirillum* inoculants (i.e. even the two Mexican isolates) was found in the non-inoculated treatment.

Among AMF inoculants, a quantification method was only available for *G. intraradices* JJ291. At the third sampling, this strain was not found in the non-inoculated treatment, but was detected in two of five replicate samples when the *Pseudomonas-Glomus* two-component consortium was used. With the three-component consortia, *G. intraradices* JJ291 was only found in one sample in the treatment where *A. brasilense* CFN-535 was included.

Effect of inoculation on root-associated AMF populations

In the non-inoculated treatment, at the third sampling, the *G. intraradices* species was enumerated at 1.8×10^5 (nLSU method) and 2.0×10^5 (mtLSU method) gene copies, the *G. claroideum* species at 3.8×10^5 nLSU gene copies, and the *Diversispora* genus at 5.4×10^2 nLSU gene copies per mg of dry root (Table 2). When the two-component consortium was used, *G. intraradices* was recovered at higher level in comparison with the control, regardless of the method. With the three-component consortia, the population size of *G. intraradices* was comparable to that in the non-inoculated control and lower to that in the two-component control was used. Inoculation had no effect on the size of the *G. claroideum* species or the *Diversispora* genus (Table 2). The *G. mosseae* species and the AMF genera *Scutellospora* and *Gigaspora* were not found in any of the treatments.

ipdC transcription in *Azospirillum*

The RT-PCR approach developed in this work targets *ipdC* from the *Azospirillum* genus, but not in the other auxin-producing bacteria tested, including pseudomonads (not shown). Successful RT-PCR amplification of *Azospirillum*'s *ipdC* mRNAs from rhizosphere samples was observed even in the absence of *Azospirillum* inoculation, i.e. in the non-inoculated control (at the first two samplings) and when the two-component consortium was used (at the first sampling) (Table 3). When three-component consortia were applied, transcription of *Azospirillum ipdC* genes (i) was found in 3-4 of 5 replicates at the first two samplings (versus only 2 replicates or less in the other treatments) and (ii) was also detected at the third sampling.

Effect of inoculation on secondary metabolite profiles of maize roots

Chromatograms at 280 nm for root methanolic extract gave 18 major integrated peaks, 11 of them corresponding to benzoxazinoid derivatives based on UV spectra (Walker *et al.*, submitted). Polar compounds (based on water elution) were cyclic hydroxamic acids, whereas two more apolar compounds were benzoxazinone derivatives.

Discriminant PCA indicated that all inoculation treatments resulted in changes in the secondary metabolite profile of maize (Fig 2). The inoculation impact varied according to the consortium, except that presence of *A. brasilense* UAP-154 within the *Pseudomonas-Glomus* two-component consortium had no effect. When assessing individual compounds responsible for treatment discrimination, it appeared that the prevalence of five PCA-discriminant secondary metabolites (including three benzoxazinoid derivatives and one

cinnamic acid) differed significantly between treatments based on ANOVA and Fisher's test (Fig 3).

Discussion

Azospirillum PGPR strains have been extensively studied as phytostimulatory inoculants of cereal crops (Fallik *et al.*, 1994; Dobbelaere *et al.*, 2001), and to a much lesser extent in mixed inocula combining phytobeneficial microorganisms with different metabolic capacities (Bashan *et al.*, 1998). Indeed, most studies on mixed inocula containing diazotrophic bacteria have been performed with bacteria other than *Azospirillum* (Biró *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2009; Cassan *et al.*, 2009; Remans *et al.*, 2008). To our knowledge, there is only one report in which *Azospirillum* was combined with a microorganism such as *Pseudomonas*, which functions also as a biocontrol agent (Corich *et al.*, 1995). Combining *Pseudomonas* antagonistic biocontrol agents and *Azospirillum* requires special attention regarding potential inhibitory effects of *Pseudomonas* antimicrobial metabolites, such as 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), against *Azospirillum*. We verified that the three *Azospirillum* strains used in this study were rather resistant to DAPG, as growth inhibition required as much as 500 μ M of synthetic DAPG.

In all inoculation treatments, *P. fluorescens* F113 colonized maize roots extensively. Unexpectedly, F113 population level was significantly enhanced when the pseudomonad was in presence of certain *Azospirillum* inoculants, but this was only found at one sampling. The three *Azospirillum* strains showed very different root colonization abilities. Only *A. brasilense* CFN-535 managed to colonize roots significantly (i.e. at levels above 10^5 cell equivalents per g of rhizosphere) and durably (i.e. till the last sampling). *A. lipoferum* CRT1 declined faster than in maize trials done in Europe (El Zemrany *et al.*, 2006; Couillerot *et al.*, 2010), perhaps because of the particular soil type or maize variety used in the current Mexican experiment. Auxin synthesis is often considered the main mode of action in *Azospirillum* PGPR (Dobbelaere *et al.*, 2003), but here the *ipdC* gene proved too conserved within the *Azospirillum* genus to enable strain-specific PCR monitoring of *ipdC* expression. In this work, the RT-PCR approach developed for the *Azospirillum* genus proved operational with rhizosphere samples, even though amplification was not successful with all plants studied. The fact that plants not inoculated with *Azospirillum* yielded *ipdC* RT-PCR signals points to the contribution of resident *Azospirillum* strains present in the soil used. Further work will be necessary to understand why, at the third sampling, *Azospirillum ipdC* transcription was found

in one third of *Azospirillum*-inoculated plants (including in treatments where the *Azospirillum* inoculant was below detection limit) versus none of the plants not inoculated with *Azospirillum*.

Little is known about the genetic diversity of root-associated AMF communities. Here, recent PCR methods for analysis of AMF community composition were used to probe AMF taxa colonizing maize roots in Mexican soils, and results showed that several AMF taxa were well established. The prevalence of *G. intraradices* was moderately higher when the two-component consortium was used. It is tempting to speculate that this was due to the inoculation of *G. intraradices* JJ291, but PCR monitoring of the latter fell below expectations. Indeed, *G. intraradices* JJ291 was not present in the non-inoculated control (as expected), but its detection was poorly effective in this and other inoculation treatments, thereby limiting the usefulness of this assessment in the current experiment. Strong competition with indigenous AMF can be expected (Biró *et al.*, 2000). Results indicate also that presence of DAPG-producing *P. fluorescens* F113 had no apparent deleterious impact on root-associated AMF, despite antifungal properties of DAPG (Barea *et al.*, 1998; Gaur *et al.*, 2004; Mar Vázquez *et al.*, 2000).

AMF establishment in the three-component consortia was comparable to that in the non-inoculated control. When compared to the two-component consortium, this suggests that presence of *Azospirillum* prevented enhanced establishment of *G. intraradices*. Previous analyses failed to evidence any effect of *Azospirillum* on mycorrhization (Russo *et al.*, 2005), but methodology differed.

Stimulation of maize shoot growth was significant when seeds were inoculated with any of the three-component consortia, i.e. whatever the *Azospirillum* strain involved. It is interesting to note that this took place despite (i) contrasted survival dynamics for different *Azospirillum* inoculants, and (ii) maize secondary metabolite profiles that varied between most treatments. Maize elaborated specific metabolic patterns according to the *Azospirillum* strain present, whose variation induced by microbial inoculation concerned several types of secondary compounds, including some already identified (Walker *et al.*, 2010). In addition, it was rather unexpected that presence of *Azospirillum* in the inoculum resulted in lower maize stimulation in comparison with the *Pseudomonas-Glomus* two-component consortium, but this effect was transient. Its molecular basis remains unknown. Finally, no maize shoot growth stimulation was observed at the last sampling, but this can be explained by the limitation of root growth due to the size of the pots, and it correlated with lower detection of *Azospirillum ipdC* gene expression at this sampling time.

In conclusion, this study indicated that *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* three-component consortia may be useful for early stimulation of maize growth. Despite evidence for distinct interaction functioning according to the *Azospirillum* strain included, the identity of the *Azospirillum* strain was not a significant factor determining phytostimulation efficiency.

Acknowledgement

OC and JART contributed equally to this work. This work was supported in part by the European Union (FW6 STREP project MicroMaize 036314). We are grateful to F. Bellvert (UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne) and N. Gómez-Hernández (UNAM) for technical help and/or discussion. We thank A. Látr (Symbio-M, Lanskroun, Czech Republic) for supplying AMF inoculum. This work made use of IFR 41's platform DTAMB in Université Lyon 1.

Figure legend

Figure 1. Root colonization of the PGPR strains *P. fluorescens* F113 (A) and *Azospirillum* (B) used as part of two-component (F113 + AMF mix; ◇) or three-component consortia (with *A. lipoferum* CRT1 (●), *A. brasilense* UAP-154 (■) or CFN-535 (▲)). Data represent means $\pm$ SD ($n = 5$) of log cell equivalents per g of rhizosphere. The detection limit (4×10^3 cell equivalents per g of rhizosphere) is shown by dotted lines and symbols appear in white for *Azospirillum* inoculants below detection limit. Statistical differences between treatments at each sampling time are indicated with letters (ANOVA and Fisher's LSD tests; $P < 0.05$).

Figure 2. Discriminant PCA performed on chromatographic data obtained for each methanolic extract of maize. Analyses were based on peak areas and retention times. Each point represents two pooled extracts (i.e. two plants) of the same treatment.

Figure 3. Effect of maize seed inoculation on root content in individual secondary metabolites that distinguished treatments in discriminant PCA. Compound identification was based on UV spectra. For each compound, statistical differences between treatments are indicated with letters (ANOVA and Fisher's tests; $P < 0.05$).

Table 1 Effect^a of consortium^b inoculation on shoot dry weight (g per plant) of maize (mean $\pm$ SD; n = 5)

Sampling	Non-inoculated control	Two-component control	Three-component consortia		
			CRT1	UAP-154	CFN-535
10 days	0.134 $\pm$ 0.002 c	0.174 $\pm$ 0.003 a	0.159 $\pm$ 0.002 b	0.159 $\pm$ 0.002 b	0.160 $\pm$ 0.004 b
21 days	1.421 $\pm$ 0.043 b	1.591 $\pm$ 0.048 a	1.568 $\pm$ 0.050 a	1.588 $\pm$ 0.057 a	1.711 $\pm$ 0.074 a
35 days	1.601 $\pm$ 0.083	1.601 $\pm$ 0.116	1.526 $\pm$ 0.100	1.498 $\pm$ 0.066	1.484 $\pm$ 0.092

^a Statistical differences between treatments are indicated with letters (ANOVA and Fisher's LSD tests; $P < 0.05$)

^b The two-component control entailed inoculation with *P. fluorescens* F113 and an AMF inoculant mix composed of three *Glomus* species, whereas the three-component consortia included also an *Azospirillum* strain.

Table 2 Effect^a of consortium inoculation on AMF root colonization^b (expressed as gene copies per g of dry root) at 35 days after inoculation (mean $\pm$ SD; n = 5).

AMF group	Non-inoculated control	Two-component control	Three-component consortia		
			CRT1	UAP-154	CFN-535
<i>G. intraradices</i> (nLSU)	5.23 $\pm$ 0.09 bc	5.57 $\pm$ 0.03 a	5.22 $\pm$ 0.06 bc	5.27 $\pm$ 0.08 b	5.07 $\pm$ 0.05 c
<i>G. intraradices</i> (mtLSU)	5.51 $\pm$ 0.04 b	5.71 $\pm$ 0.09 a	5.50 $\pm$ 0.05 b	5.35 $\pm$ 0.11 b	5.35 $\pm$ 0.10 b
<i>G. claroideum</i> (mtLSU)	2.70 $\pm$ 0.08	2.63 $\pm$ 0.02	3.03 $\pm$ 0.11	3.03 $\pm$ 0.10	2.91 $\pm$ 0.18
<i>Diversispora</i> (mtLSU)	4.57 $\pm$ 0.06	4.62 $\pm$ 0.05	4.48 $\pm$ 0.05	4.49 $\pm$ 0.08	4.39 $\pm$ 0.07

^a Statistical differences between treatments are indicated with letters (ANOVA and Fisher's LSD tests; $P < 0.05$).

^b The inoculant strain *G. intraradices* JJ291 (mtLSU method) was detected (weak amplification) in 3 of the 25 samples analyzed (i.e. two in the two-component control, and one with the three-component consortium involving *A. brasilense* CFN-535). Similarly, only a few weak amplifications were obtained for species *G. mosseae* and genera *Gigaspora* and *Scutellospora*.

Ces données ont été corrigées?

Table 3 RT-PCR detection of *Azospirillum ipdC* gene, as indicated by the number of plants (out of 5) for which amplification was successful

Treatments	1 st sampling (10 days)	2 nd sampling (21 days)	3 rd sampling (35 days)
Non-inoculated control	1	2	0
Two-component control	2	0	0
Three-component consortium (CRT1)	4	3	1
Three-component consortium (UAP-154)	3	4	2
Three-component consortium (CFN-535)	3	3	2

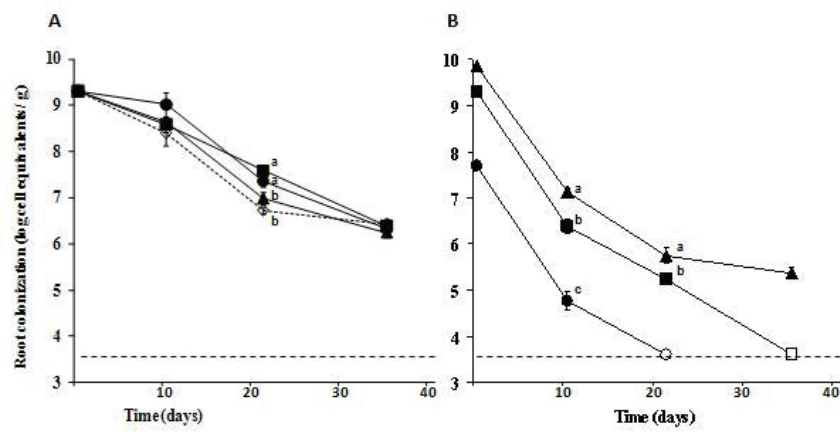


Fig 1

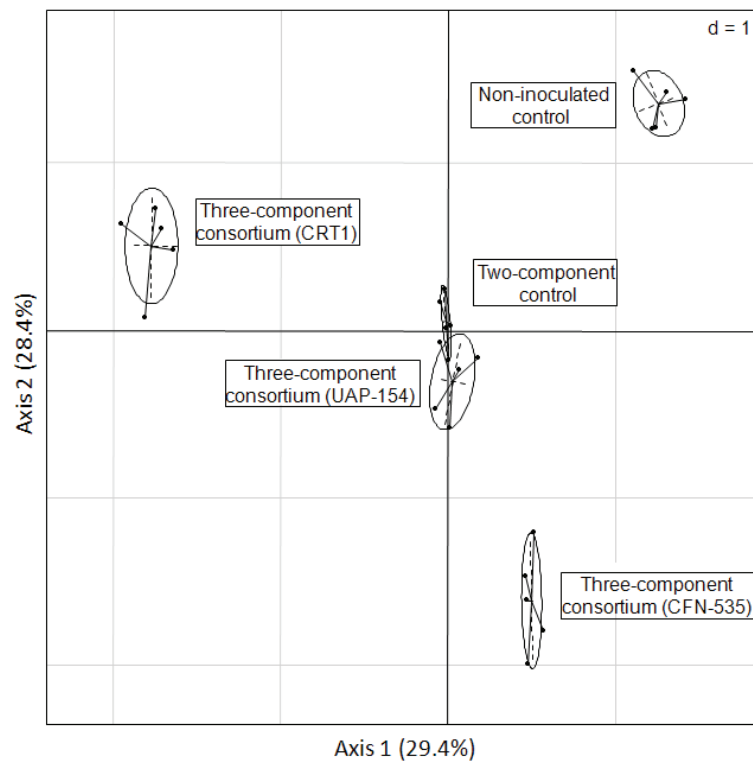


Fig 2

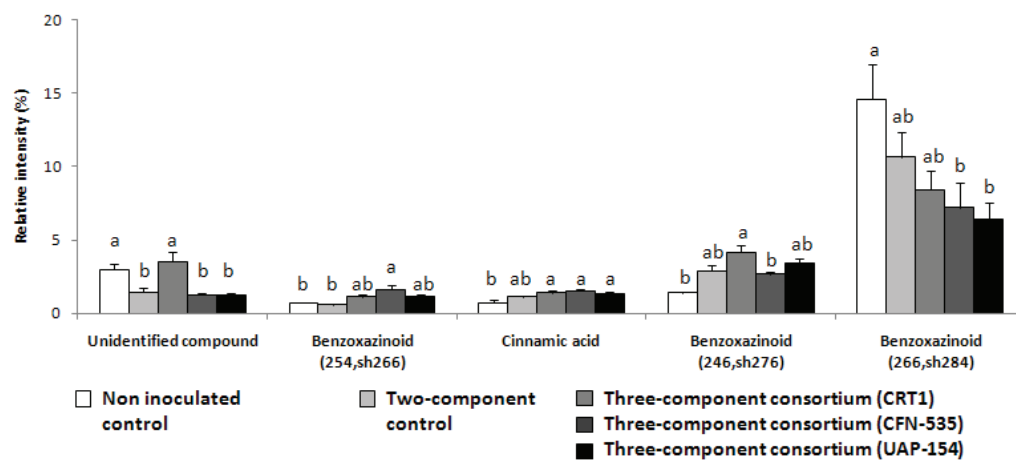


Fig 3

References

- Adesemoye A, Torbert H and Kloepper J** (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecol* (in press).
- Barea JM, Andrade G, Bianciotto VV, Dowling D, Lohrke S, Bonfante P, O'Gara F and Azcon-Aguilar C** (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* 64:2304-7.
- Basaglia M, Casella S, Peruch U, Poggiolini S, Vamerali T, Mosca G, Vanderleyden J, De Troch P and Nuti MP** (2003). Field release of genetically marked *Azospirillum brasilense* in association with *Sorghum bicolor* L. *Plant Soil* 256:281-290.
- Bashan Y** (1998). Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech Adv* 16:729-770.
- Bashan Y, Moreno M and Troyo E** (2000). Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. *Biol Fertil Soils* 32:265-272.
- Baudoin E, Nazaret S, Mougel C, Ranjard L and Moëgne-Loccoz Y** (2009). Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biol Biochem* 41:409-413.
- Belimov AA, Kojemiakov AP and Chuvarliyeva CV** (1995). Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil* 173:29-37.
- Biró B, Köves-Péchy K, Vörös I, Takács T, Eggenberger P and Strasser RJ** (2000). Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Appl Soil Ecol* 15:159-168.
- Cassan F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C and Luna V** (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Plant Pathol* 45:28-35.
- Charyulu PBBN, Foucassie F, Barbouche AK, Rondro Harisoa L, Omar AMN, Marie R and Balandreau J** (1985). Field inoculation of rice using in vitro selected bacterial and plant genotypes, pp:163-179 in *Azospirillum III : Genetics, Physiology, Ecology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Corich V, Giacomini A, Concheri G, Ritzerfeld B, Vendramin P, Struffi P, Basaglia M, Squartini A, Casella S, Nuti MP, Peruch U, Poggiolini S, de Troch P, Vanderleyden J, Fedi S, Fenton A, Moëgne-Loccoz Y, Dowling DN and O'Gara F.** (1995). Environmental impact of genetically modified *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* released as soil/seed inoculants. In *Proceedings 3rd International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically-Modified Plants and Microorganisms*. (D.D. Jones, Ed), pp 371-388, Monterey, CA.
- Couillerot O, Bouffaud ML, Muller D, Caballero-Mellado J and Moëgne-Loccoz Y** (in preparation). Development of a real-time PCR method to quantify the phytostimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize.
- Couillerot O, Poirier MA, Prigent-Combaret C, Mavingui P, Caballero-Mellado J and Moëgne-Loccoz Y** (submitted). Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. *J Appl Microbiol*.
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA and Lamattina L** (2005). Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221:297-303.

- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Amber T, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Shimon B, Burdman S, Kadouri D, Sarig S and Okon Y.** (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Austral J Plant Physiol* 28:1–9.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Okon Y and Vanderleyden J** (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol Fertil Soils* 36:284-297.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J and Okon Y** (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22:107-149.
- Döbereiner J, Marriel IE and Nery M** (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 22:1464-1472.
- El-Komy HMA** (2005). Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technol Biotech* 43:19-27.
- El Zembrany H, Cortet J, Peter Lutz M, Chabert A, Baudoin E, Haurat J, Maughan N, Felix D, Défago G, Bally R and Moëgne-Loccoz Y** (2006). Field survival of the phyto stimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biol Biochem* 38:1712-1726.
- Fages J and Mulard D** (1988). Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez *Zea mays*. *Agronomie* 8:309-314.
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M and O'Gara F** (1992). Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl Environ Microbiol* 58:3873-3878.
- Fuentes-Ramirez L and Caballero-Mellado J.** (2006). Bacterial biofertilizers, pp:143-172 in PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Gaur R, Shani N, Kawaljeet K, Johri BN, Rossi P and Aragno M.** (2004). Diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads do not influence AM fungi in wheat rhizosphere. *Curr Sci* 88:453-457.
- Han SO and New PB** (1998). Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microbial Ecol* 36:193-201.
- Herschkovitz Y, Lerner A, Davidov Y, Okon Y and Jurkevitch E** (2005b). *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*). *Environ Microbiol* 7:1847-52.
- Herschkovitz Y, Lerner A, Davidov Y, Rothballer M, Hartmann A, Okon Y and Jurkevitch E** (2005a). Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecol* 50:277-288.
- Jacoud C, Faure D, Wadoux P and Bally R** (1998). Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. *FEMS Microbiol Ecol* 27:43-51.
- Jacoud C, Job D, Wadoux P and Bally R** (1999). Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can J Microbiol* 45:339-342.
- James EK.** (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res.* 65:197-209.
- Lerner A, Herschkovitz Y, Baudoin E, Nazaret S, Moëgne-Loccoz Y, Okon Y and Jurkevitch E** (2006). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biol Biochem* 38:1212-1218.
- Lucy M, Reed E and Glick BR** (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton Leeuw* 86:1-25.

- Mar Vázquez M, César S, Azcón R and Barea JM** (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl Soil Ecol* 15:261-272.
- Naiman AD, Latronico A and Garcia de Salamone IEG** (2009). Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *Eur J Plant Pathol* 45:44-51.
- Okon Y and Labandera-Gonzalez CA** (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26:1591-1601.
- Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI and Hartmann A** (2009). Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur J Plant Pathol* 45:106-113.
- Park JW and Crowley DE** (2005). Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real-time PCR and DGGE. *Biotechniques* 38:579-586.
- Pedraza RO, Bellone CH, Carrizo de Bellone S, Boa Sorte PMF and Teixeira KRS** (2009). *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur J Plant Pathol* 45:36-43.
- Prigent-Combaret C, Blaha D, Pothier JF, Vial L, Poirier MA, Wisniewski-Dyé F and Moëgne-Loccoz Y** (2008). Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 65:202-219.
- Pulido LE, Cabrera A and Medina N** (2003). Biofertilization using rhizobacteria and AMF in the production of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and onion (*Allium cepa* L.) seedlings: root colonization and nutritional status. *Cultivos Tropicales* 24:5-13.
- Raverkar K and Konde B** (1988). Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. *Plant Soil* 106:249-252.
- Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes J, Mendez N, Toscano V, Mulling M, Galvez L and Vanderleyden J** (2008). Effect of *Rhizobium* – *Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312:25-37.
- Rodriguez-Salazar J, Suarez R, Caballero-Mellado J and Iturriaga G** (2009). Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiol Lett* 296:52-59.
- Rodriguez Caceres EA** (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl Environ Microbiol* 44:990-991.
- Russo A, Felici C, Toffanin A, Götz M, Collados C, Barea J, Moëgne-Loccoz Y, Smalla K, Vanderleyden J and Nuti M** (2005). Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. *Biol Fertil Soils* 2005:301-309.
- Steinberg C, Gamard P, Faurie G and Lensi R** (1989). Survival and potential denitrifying activity of *Azospirillum lipoferum* and *Bradyrhizobium japonicum* inoculated into sterilized soil. *Biol Fertil Soils* 7:101-107.
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moëgne-Loccoz Y, Bally R, Comte G** (2010) Host plant secondary metabolite profiling shows complex, strain-dependent response of maize to the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum*. *New Phytol.* (In press)

RESUME

Les plantes dans leur environnement établissent des interactions avec des micro-organismes du sol. Parmi ces interactions nous pouvons distinguer les symbioses associatives mettant en jeu des bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). L'impact de ces microorganismes phytobénéfiques (*Azospirillum*, *Pseudomonas*...) sur le métabolisme de la plante hôte est encore mal connu. Le modèle d'étude que nous avons choisi dans le cadre de ce travail est *Zea mays* L. qui peut établir de nombreuses symbioses associatives avec des PGPR. Pour étudier les effets de ces micro-organismes sur le maïs, deux approches ont été développées faisant notamment appel à des outils de profilage métabolique pour i) déterminer l'impact de la simple inoculation micro-organismes sur le métabolisme secondaire racinaire et des parties aériennes de la plante hôte, et ii) évaluer les effets physiologiques de consortia microbiens comprenant *Azospirillum*, *Pseudomonas* et *Glomus*. Les résultats de ce travail démontrent la place prépondérante des composés de type benzoxazinoïde (benzoxazolinone et benzoxazinone) dans les interactions et la modulation de leur synthèse induite par les inocula. Par ailleurs nos travaux mettent également en évidence que la réponse métabolique de la plante à l'interaction avec les micro-organismes est dépendante de l'espèce et de la souche bactérienne considérée suggérant ainsi un phénomène de reconnaissance entre les deux organismes.

Impact of phyto-benific microorganims inoculation on *Zea mays* L. secondary metabolism

ABSTRACT

In environment, plant performed some interactions with soil microorganisms. From these interactions, associative symbiosis involving PGPR bacteria (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) can be considerate. Impact of phyto-benific microorganisms (*Azospirillum* *Pseudomonas*...) leading to associatives interactions, on host plant metabolisms, still poorly understood. *Zea mays* L. was choose as study model because it can enter in various associatives symbiosis with Plant growth Promoting Rhizobacteria. To study effects of these microorganisms on maize, two approaches were developed thanks to metabolite profiling tools to (i) determine the impact of a single microorganism inoculation on host plant roots and shoots secondary metabolisms and (ii) evaluate physiological effect of microbial consortia including *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* species. Results of this work showed the major place of benzoxazinoids compounds (benzoxazolinone and benzoxazinone) in plant/microbe interaction and their synthesis modulation induced by inocula. Besides, our works brings to light that the metabolic answer of the plant to the interaction with microorganisms is dependent on species and bacterial strain suggesting a recognition phenomenon between both organisms.

DISCIPLINE

Ecologie Microbienne

MOTS-CLES

Zea mays L., PGPR, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Glomus*, métabolites secondaires, benzoxasinoïdes, consortia, HPLC, HPLC/MS.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

UMR 5557 CNRS UCBL CESN Ecologie Microbienne, 43, bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, Bat. Forel CESN.