HAL
open science

Variations métaboliques du maïs lors de l'association coopérative avec la bactérie phytostimulatrice Azospirillum lipoferum CRT1

Camille Rozier

To cite this version:

Camille Rozier. Variations métaboliques du maïs lors de l'association coopérative avec la bactérie phytostimulatrice Azospirillum lipoferum CRT1. Biologie végétale. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1296 . tel-01718865

HAL Id: tel-01718865

https://theses.hal.science/tel-01718865

Submitted on 27 Feb 2018

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.

N°d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale n° 341

(Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation)

Spécialité de doctorat : Ecophysiologie Végétale

Soutenue publiquement le 14/12/2017, par :

Camille Rozier

Variations métaboliques du maïs lors de l'association coopérative avec la bactérie phytostimulatrice *Azospirillum lipoferum* CRT1

Devant le jury composé de :

Bardin, Marc - Chargé de Recherche - UR 407 Pathologie Végérale INRA Avignon - *Rapporteur*
Lemoine, Rémi - Directeur de Recherche - UMR 7267 Ecologie et Biologie des Interactions Poitiers - *Rapporteur*
Campa, Claudine - Directrice de Recherche - IRD UMR Interaction Plantes Microorganismes Environnement - Montpellier - *Examinatrice*
Dijoux-Franca, Marie-Geneviève - Professeur - UMR 5557 Ecologie Microbienne - ISPB Lyon – *Examinatrice – Présidente de jury*

Legendre, Laurent - Professeur - UMR 5557 Ecologie Microbienne - Villeurbanne - *Directeur de thèse*
Czarnes, Sonia - Maître de Conférence - UMR 5557 Ecologie Microbienne - Villeurbanne - *Co-directrice de thèse*

‘Les livres ont cette qualité qu'ils ne changent jamais d'avis. Vous pouvez essayer. On les relit, ils disent toujours la même chose. Il n'y a que notre interprétation qui évolue.’

Henri Loevenbruck, Le Syndrome Copernic

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Table des matières

Avant-propos 1
Remerciements 3
Résumé 5
Abstract 7
Liste des abréviations 9
Liste des figures 13
Liste des tableaux 15
CHAPITRE 1 : Introduction générale 17
1. Une agriculture moderne en pleine mutation 19
1.1. Limites écologiques de l'agriculture intensive 19
1.2. L'agriculture écologiquement intensive 21
2. Les PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria 23
2.1. Définition et diversité 23
2.2. Mode d'ancrage des PGPR sur les racines de la plante 24
2.3 Modes d'actions des PGPR développant des symbioses associatives 25
2.4. Un genre de PGPR d'intérêt économique : Azospirillum 28
3. Les outils de métabolomique dans l'étude du végétal 29
3.1. La génération 'omique' et la place de la métabolomique 29
3.2. Les outils d'intégration des 'omique' 30
3.3. Approches non-ciblée et ciblée en métabolomique 30
3.4. Méthodes d'analyse des métabolites par chromatographie 33
3.5. Chromatographie gazeuse et dérivation chimique 34
3.6. Utilisation de standards internes 35
3.7. Retraitement des jeux de données 35
4. Objectifs de la thèse 36
CHAPITRE 2 : Etude des modifications du contenu chimique de la sève ascendante du maïs lors de son interaction avec *Azospirillum lipoferum* CRT1 39
1. Introduction 41

1.1 Objectif 41

1.2 La photosynthèse 42

1.2.1 Physiologie et fonctionnement chez les plantes en C4 42

1.2.2 Modifications du rendement photosynthétique en cas de stress 44

1.2.3 Optimisation de l'activité photosynthétique 45

1.3 Communication racines-feuilles : le xylème 46

1.3.1 Anatomie des vaisseaux conducteurs 46

1.3.2 Mécanisme de transport des éléments dans le xylème 47

1.3.3 Composition de la sève brute 48

1.3.4 Modifications métaboliques de la sève brute lors de stress et interactions symbiotiques 50

1.3.5 Prélèvement de la sève brute 52

1.4 Démarche expérimentale 53

2. Matériel et méthodes 55

2.1 Inoculation, culture, prélèvement de la sève ascendante et analyses métaboliques par GC-MS 55

2.2 Analyses spécifique d'hormones par GC/APCI-Q-TOF-MS 55

3. Résultats 55

3.1 Analyses non-ciblées des modifications métaboliques de la sève ascendante du maïs en réponse à l'association avec la PGPR Azospirillum lipoferum CRT1 55

3.2 Analyses ciblées des modifications des teneurs de certaines phytohormones 77

4. Discussion et conclusion 77

CHAPITRE 3 : Modifications métaboliques et transcriptomiques des compartiments racinaires et foliaires du maïs lors de son interaction avec la PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 81

1. Introduction 83

1.1 Objectifs 83

1.2 Les enjeux du couplage métabolomique/transcriptomique 83

1.3 Modifications des métabolomes et transcriptomes racinaires et foliaires par les PGPR 87

1.3.1 Modification de la nutrition minérale 87

1.3.2 Modification du métabolisme secondaire 87
1.3.3 Modification du métabolisme primaire 87
1.4 Démarche expérimentale 89
2. Matériel et méthodes 90
2.1 Culture bactérienne 90
2.2 Inoculation des grains de maïs 90
2.3 Culture des plantules de maïs 90
2.4 Analyses métabolomiques des compartiments racinaires et foliaires 91
2.5 Extraction d'ARN 91
2.6 RNA-Seq et analyses bioinformatiques 92
2.7 Analyses statistiques multivariées 93
3. Résultats 93
3.1 Modification des métabolomes racinaire et foliaire 93
3.2 Modifications globales des transcriptomes racinaire et foliaire 101
3.3 Enrichissement des termes GO 111
4. Discussion et conclusion 114
CHAPITRE 4 : Analyse en champ des mécanismes physiologiques et métaboliques de modification du rendement en grain du maïs par la PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 127
1. Introduction 129
1.1 Contexte 129
1.2 Objectifs 129
1.3 Démarche expérimentale 130
2. Résultats 131
3. Discussion 157
CHAPITRE 5 : Impact d'*Azospirillum lipoferum* CRT1 sur la germination des grains de maïs 160
1. Introduction 162
1.1 Objectifs 162
1.2 Le processus de levée des semences 162
1.2.1 Etapes clés 162

1.2.2 Induction de la germination par des facteurs abiotiques 166
1.2.3 Modification de la composition chimique des graines lors de la germination 166
1.2.4 Le microbiome de la graine: un héritage de la plante mère 167
1.2.5 Modification de la germination par les PGPR 170
1.3 Démarche expérimentale 171

2. Matériel et méthodes 172
2.1 Culture bactérienne, inoculation, semis et suivi morphologique de la germination des grains de maïs 172
2.2 Mesures des paramètres morphologiques et physiologiques des plantules de maïs 172
2.3 Dosage de l'amidon 173
2.4 Dosage des métabolites primaires 174
2.5 Analyses statistiques 175

3. Résultats 175
3.1 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur la germination 175
3.2 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur la teneur en amidon des grains en germination ... 179
3.3 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur le métabolome du grain 180
3.4 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur la physiologie et la morphologie des plantules de 11 j (3 feuilles) 184

4. Discussion 186

Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives 190
1. Les concepts traditionnels de nutrition et hormones expliquent-ils l'effet morphotrophe d'A. lipoferum CRT1 sur le maïs ? 192
2. Un rôle possible des sucres simples dans la signalisation de l'action morphotrophe d'A. lipoferum CRT1 sur le maïs 196
2.1 Inter-relations entre sucres et rhizobiome 196
2.2 Impact de sucres sur la signalisation hormonale dans la plante 198
3. Vers de nouvelles formulations à base de PGPR 201
4. Perspectives 203
Références bibliographiques 206

Avant-propos

La bourse de thèse a été financée par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (bourse école doctorale ED 341 Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation). Les expérimentations ont été financées par l'agence nationale pour la recherche (projet ANR-12-AGRO-0008 - AZODURE).

Ils ont donné lieu à la publication de deux articles :

- Rozier C., Erban A., Hamzaoui J., Prigent-Combaret C., Comte G., Kopka J., Czarnes S. and Legendre L. (2016*)* Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, Azospirillum lipoferum CRT1. *Metabolomics (Los Angel)* 6:182. doi:10.4172/2153-0769.1000182
- Rozier, C., Hamzaoui, J., Lemoine, D., Czarnes, S. and Legendre, L. (2017). Field-based assessment of the mechanism of maize yield enhancement by Azospirillum lipoferum CRT1. *Scientific Reports*, 7(1):7416. doi: 10.1038/s41598-017-07929-8

Deux articles supplémentaires sont en cours de rédaction.

Durant ces trois années de thèse, ces travaux ont été présentés lors de différents congrès (conférences et présentations de posters) :

- 9ème Journées Scientifiques RFMF-Lille : *9 au 11 juin 2015* (Poster)
- 2ème Symposium International AFERP/STOLON-Lyon : *15 au 17 juillet 2015* (Poster)
- 12ème Rencontre Plante-Bactérie-Aussois : *11 au 15 janvier 2016* (Présentation flash)
- Doctorales E2M2-Villeurbanne : *janvier 2016* (Présentation flash)
- 10ème Journées Scientifiques RFMF-Montpellier : *31 mai au 2 juin 2016* (Conférence)
- Plant Biology Europe EPSO/FESPB-Praha : *26 au 30 juin 2016* (Poster)
- Plant Biology (ASPB)-Honolulu : *24 au 28 juin 2017* (Poster)

Remerciements

Je remercie en premier lieu le directeur du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Yvan Moënne-Loccoz, pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans le Laboratoire.

Je remercie de même Claire Prigent-Combaret, chef de l'équipe Rhizosphère, qui m'a accueillie au sein de son équipe.

Mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse, Laurent Legendre, pour le temps qu'il a consacré à l'encadrement de mon travail, et pour ses nombreuses relectures de mon manuscrit. Merci de m'avoir permis d'aller à la rencontre d'autres chercheurs, par nos collaborations ou encore la participation à différents congrès et de m'avoir permis ainsi d'enrichir ce travail mais aussi d'avancer dans mes projets futurs. Merci aussi pour ces discussions plus informelles, ces petits moments sur des passions partagées…

Merci à ma co-directrice de thèse, Sonia Czarnes, pour son accompagnement et son soutien tout au long de ce travail et dans la découverte du monde de l'enseignant-chercheur.

J'aimerai remercier mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail, Marc Bardin, Rémi Lemoine, Claudine Campa et Marie-Geneviève Dijoux-Franca.

De même, je remercie les membres de mon comité de suivi, Floriant Bellvert, François Mesnard, Laurence Pascal et Gérard Lina pour leurs conseils.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche qui a financé cette thèse, en m'accordant un poste d'allocataire de recherche, puis d'attachée temporaire d'enseignement et de recherche.

Ce travail n'aurait pas été le même sans le travail de nos collaborateurs de l'Institut Max Planck of Molecular Plant Physiology de Golm, Joachim Kopka, Ines Ferhle et particulièrement Alexander Erban. Merci pour votre accueil et les nombreux outils que vous m'avez transmis afin de progresser dans mon travail. Ce travail n'aurait pas été si abouti sans vous.

Je remercie de même tout le Parmic et le CESN, en commençant par son directeur et mon co-encadrant de thèse, Gilles Comte. Merci à tous d'avoir été présents autour de moi durant ces 3 années, que ce soit lors d'instants formels ou plus informels. Les discussions du vendredi matin me manqueront ! Anne-Emmanuelle, Babeth, Céline, Dounia, Guillaume, Isa, Jihane, Laura, Laurence, Marie-Geneviève, Marjo, Max, Serge, Slimane, Tiphaine L, Tiphaine C, Vincent, sans oublier PE l'as de la débrouille et du bricolage qui m'a dépannée et épaulée tant de fois !

Merci à tous les membres de mon équipe pour leur dynamisme et leur soutien et à tous les doctorants de l'unité avec lesquels j'ai partagé les mêmes moments de doute, mais aussi les soirées de congrès, les animations, les restaurants, les sorties…, ces moments indispensables à la survie durant la thèse !

Je tiens aussi à remercier tous les étudiants qui ont participé à ce travail, réelles clés de voutes à l'édifice qu'il est devenu : Manon, Théo, Valentin, Lauriane, Léa, Xavier, Maxence,

Marjolaine, Laura, Léa A., Solène. Merci particulièrement à Leslie pour son implication et sa contribution dans ces travaux. Bonne continuation à tous !

Mais la thèse est aussi faite de belles rencontres et d'amitiés qui sont faites pour durer… Je remercie donc Elise, pour m'avoir apporté ce petit havre de sérénité et pour toutes ces discussions philosophiques dans l'idée de refaire le monde ! Khaoula, qui m'a montré à quel point une amitié peut être forte, qui a toujours été présente dans les moments difficiles et qui a veillé sur moi au cours de ces 3 ans ! Je ne remercie pas Florian pour son 'humour bien à lui', ce serait plagier, mais pour tous les moments de détente passés ensemble, les bonnes bouffes, les ragots et potins, et les vacances par procuration ! Je te dis 'à bientôt' ! Nam, mon ami, à qui je souhaite tout le bonheur possible auprès de sa famille enfin réunie !

Je remercie aussi mes collègues de badminton du BEL pour ce 'lâcher-prise' et l'équilibre dont j'ai eu besoin, particulièrement au moment de la rédaction !

Ces remerciements seraient incomplets si je ne remerciais pas ma famille.

Mon chéri, Yohan, qui depuis 10 ans, bientôt 11, supporte mes choix, mes humeurs et qui partage avec moi les hauts et les bas de la vie. Merci pour ton optimisme indéfectible et la confiance que tu as en moi dès que j'entreprends quelque chose.

Mes parents, que dire, à part que tout cela n'aurait jamais été possible sans vous et votre soutien, depuis le début ! Vous m'avez permis de réaliser mes projets, et encouragé dans mon choix de faire de grandes études … sans réellement préciser quand m'arrêter ! Ces travaux sont le résultat de toute une éducation, d'expériences, de voyages, de réussites et d'échecs, d'encouragements. Merci de m'avoir permis de m'épanouir dans mes entreprises !

Ma sœur qui m'a soutenue et a toujours été présente dès qu'il le fallait. Mon beau frère, et mes petites puces Lou et Lison qui me rappellent à chaque minute que la famille est un pilier solide auquel on peut toujours se raccrocher et qui permet de se retrouver parfois...

Mon grand-père et ses encouragements quotidiens, je ne sais pas si on peut dire que 'j'ai trouvé' Papy, mais c'est un bon début.

Merci.

Résumé

Variations métaboliques du maïs lors de l'association coopérative avec la bactérie phytostimulatrice *Azospirillum lipoferum* CRT1

Les bactéries rhizosphériques stimulatrices de croissance (PGPR) du genre *Azospirillum* sont utilisées commercialement pour leur capacité à stimuler la croissance et à augmenter le rendement des céréales *via* une relation associative complexe et peu comprise. L'objectif de cette étude a été d'utiliser les outils modernes de la métabolomique pour caractériser les mécanismes biochimiques activés par la souche *A. lipoferum* CRT1 chez son hôte, le maïs.
L'analyse des contenus phytochimiques des racines, feuilles et sève ascendante a suggéré pour la première fois l'importance de la communication racine-feuille et des sucres simples dans l'augmentation de croissance et du potentiel de conversion photochimique de jeunes plantules par *A. lipoferum* CRT1. Une analyse transcriptomique a révélé un impact modéré au niveau des racines et des modifications de nombreux nœuds régulateurs des processus biologiques cellulaires des feuilles, dont ceux contrôlés par les auxines et l'acide abscissique.
Des essais agronomiques conduits deux années consécutives sur quatre sites ont indiqué que l'augmentation de rendement par *A. lipoferum* CRT1 dérivait d'une sécurisation de la germination lors de stress environnementaux précoces et non de modifications des métabolomes (dont ceux liés à la nutrition azotée et phosphorée), de la croissance et du potentiel photosynthétique des plantules, des modifications qui étaient par contre liées aux contextes pédo-climatiques. La sécurisation de la germination était due à une accélération de la sortie de la radicule et de la consommation des sucres simples, et molécules apparentées, de la graine.

Mots clés : acide abscissique, acide jasmonique, architecture racinaire, auxines, *Azospirillum lipoferum*, germination, maïs, métabolomique, photosynthèse, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, sève brute, signalisation sucres, spécificité d'hôte, transcriptomique

Abstract

Maize metabolome variations after inoculation with the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Azospirillum lipoferum* CRT1

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of the genus *Azospirillum* are used commercially for their capacity to stimulate the growth and enhance the yield of cereal crops via an intricate, complex and poorly understood associative relationship. The aim of this study was to use modern metabolomics tools to decipher the biochemical mechanisms activated by *A. lipoferum* CRT1 in its maize host.

The analysis of the phytochemical contents of roots, leaves and ascending sap revealed for the first time the importance of root-to-shoot communication and of simple sugars in the enhancement of growth and photochemical conversion potential of young plantlets by *A. lipoferum* CRT1. A transcriptomic analysis showed moderate impact on roots and a coordinate modulation of several regulatory nodes of cellular biological processes, including some mediated by auxins and abscissic acid.

Agronomic field trials conducted two consecutive years in four sites correlated yield enhancement by *A. lipoferum* CRT1 to the securing of seed germination during environmental stresses. No correlation was found with modifications of plantlets metabolomes (including those linked to nitrogen and phosphorus nutrition), growth and photochemical conversion potential which were found to depend on additional soil and climate cues. Germination securing was due to a speeding of radicule emergence and of seed simple sugars consumption.

Keywords : abscissic acid, jasmonic acid, ascending sap, auxins, *Azospirillum lipoferum*, germination, host specificity, maize, metabolomics, photosynthesis, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, root system architecture, sugar signaling, transcriptomics

Liste des abréviations

A. lipoferum CRT1 : *Azospirillum lipoferum* CRT1

ABA : acide abscissique

ACC : acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique

ACP : Analyse en composantes principales

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

BNF : fixation biologique de l'azote

BSTFA : N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

CA : anhydrate carbonique

$CaCl_2$, $2H_2O$: Chlorure de calcium, dihydraté

CAPAC : Capacité au champ

CCM : Chromatographie sur couche mince

CFS : Chromatographie par fluide supercritique

$CHCl_3$: Chloroforme

CI : Chromatographie ionique

CO_2 : Dioxyde de carbone

DAPG : 2,4-diacétyl-phloroglucinol

DHZR : dihydrozéatine riboside

DO : Densité Optique

Eau UP : Eau Ultra Pure

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique

ESI : Electrospray iosation

FAO : Food and Agriculture Organization

$FeSO_4$, $7H_2O$: Sulfate de fer, heptahydraté

FNSEA : Fédération Nationale des Syndicats d'Exploitants Agricoles Ft/Fm' : Rendement quantique de conversion photochimique réel

Fv/Fm : Rendement quantique de conversion photochimique maximum

GABA : acide γ-aminobutyrique

GC : Chromatographie gazeuse

GC-MS : « Gaz Chromatography-Mass Spectrometer » Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Spectrophotomètre de Masse

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

I : Inoculé par la bactérie PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1

IAA : acide 3-indolacétique

IBA : acide 3-indolbutyrique

IE : Impact électronique

IPA : Isopentényladénine

ipdC : gène codant pour la 3-indolpyruvate décarboxylase

ISR : Induced Systemic Resistance

JA : acide jasmonique

K_2HPO_4 : Hydrogénophosphate de potassium

KH_2PO_4 : Dihydrogénophosphate de potassium

LC : Chromatographie liquide

MALDI : Laser assisté par matrice

MeOH : Méthanol

$MgSO_4$, $7H_2O$: Sulfate de magnésium, heptahydraté

$MnCl_2$, $4H_2O$: Chlorure de manganèse, tétrahydraté

MS : Spectromètre de masse

MSTFA : N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide

Na_2MoO_4, $2H_2O$: Molybdate de sodium

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NI : Non-inoculé avec la souche PGPR

nifH : gène codant pour une nitrogénase réductase

NO : oxyde nitrique

NUE : Nitrogen use efficiency

OAA : oxaloacétate

PEPc : Phosphoénolpyruvate carboxylase

PGPR : « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » bactéries stimulatrices de croissance

pH : potentiel hydrogène

PLS-DA : « Partial Least Square-Discriminant Analysis », analyse discriminante des moindres carrés partiels

PPDK : pyruvate Pi dikinase

RI : retention index

RMN : Résonnance magnétique nucléaire

RNA-Seq : Séquençage de l'ARN

rpm : Rotations par minute

SAR : systemic acquired resistance

TIC : Total Ion Current

TOF : Temps de vol

Tr : Temps de rétention

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : ultra violet

VIP : «Variable Importance in the Projection », importance de la variable dans la projection

VOCs : Composés organiques volatiles

Z : Zéatine

ZR : *trans*-zéatine riboside

Liste des figures

Figure 1.1 : Modèle conceptuel de l'impact d'une fixation et d'une utilisation du diazote atmosphérique croissante par l'Homme sur la santé publique globale (d'après Townsend *et al*. 2003) 20
Figure 1.2 : Utilisations potentielles des pratiques agroécologiques dans les prochaines décennies et relation avec leur intégration dans l'agriculture actuelle (d'après Wezel *et al.* 2014). 22
Figure 2.1: Méchanisme de concentration du CO_2 chez les plantes en C4 (d'après Leegood *et al.* 2002). 43
Figure 2.2: Modèle hypothétique de l'interaction entre les racines et les feuilles par les faisceaux vasculaires (d'après Satoh 2006). 50
Figure 3.1 : Modifications transcriptomiques chez *Arabidopsis* induites par l'inoculation avec la bactérie non-pathogène *P. fluorescens* SS101 (d'après Van de Mortel *et al.* 2012). 89
Figure 3.2 : Carte des voies métaboliques affectées par l'inoculation des 2 cultivars de maïs. 100
Figure 3.3 : Distribution sous forme de boite à moustache (A, D), courbe de distribution (B, E) et quartile contre quartile (C, F) des abondances des transcrits des racines (A, B, C) et feuilles (D, E, F). 105
Figure 3.4 : Visualisation de la répartition des transcrits dont les teneurs sont significativement différentes entre deux conditions. 107
Figure 3.5 : Affiliation des termes GO des transcrits dont l'abondance est modifiée dans les feuilles des plantules de maïs par *A. lipoferum* CRT1. Les processus biologiques et les fonctions moléculaires des cultivars Seiddi (A) et (C) et FuturiXX (B) et (D) sont représentés. 113
Figure 3.6 : Modification de la régulation de 2 gènes clé du photosystème II. 116
Figure 3.7 : Interaction entre le trehalose-6-phosphate (T6P), les hexokinases et les signaux de sucres (Paul *et al.* 2001). 118
Figure 3.8 : Modification de la régulation de différents gènes intervenant dans les voies de signalisation cellulaire des hormones JA (A), ABA (B) et auxines (C) au niveau des compartiments foliaires des deux cultivars. 122
Figure 5.1 : Les différents événements germinatifs et post-germinatifs du grain de maïs (d'après Bewley 1997). 164
Figure 5.2 : Régulation de la sortie de dormance de *Nicotiana* (a) et *Brassica* (b) par les hormones et la lumière (extrait de Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006). 165
Figure 5.3 : Différents éléments et fonctions inclus dans le phytobiome (http://www.phytobiomes.org/about/Pages/What-is-the-Phytobiome.aspx). 169
Figure 5.4 : Visualisation par hybridation in situ par fluorescence (A-C) et microscopie confocale à balayage laser (D) de la plante en tant que méta-organisme naturel (d'après Berg *et al.* 2013). 170
Figure 5.5 : Etapes du dosage d'amidon réalisées avec le kit de dosage enzymatique de l'amidon total AA/AMG (Libios). 174

Figure 5.6 : Pourcentage de germination du maïs après inoculation par *A. lipoferum* CRT1. 177
Figure 5.7 : Longueur des radicules de grains de maïs après inoculation par *A. lipoferum* CRT1. 178
Figure 5.8 : Modification du contenu en amidon total des grains de maïs après inoculation par *A. lipoferum* CRT1. 179
Figure 5.9 : Analyse multivariée non-discriminante (ACP – A) et discriminante (PLS-DA – B et C) du contenu métabolique des grains de maïs des cultivars FuturiXX et FriedriXX non-inoculés et inoculés avec *A. lipoferum* CRT1. 183
Figure 5.10 : Paramètres morphologiques et physiologiques des plantules de maïs inoculées avec *A. lipoferum* CRT1 et contrôle. 186
Figure 6.1 : Effets cultivar-spécifique observés sur la plante lors de l'interaction avec *A. lipoferum* CRT1. 194
Figure 6.2 : Modélisation de l'interaction entre un cultivar de maïs compatible avec la symbiose et *A. lipoferum* CRT1. 195
Figure 6.3 : Liens entre l'exsudation de carbohydrates de la plante et les mécanismes des PGPR (d'après Goswami *et al.* 2016). 197
Figure 6.4 : Cultures d'*A.lipoferum* CRT1 sous des conditions de fermentation (d'après Okon 1993). 197
Figure 6.5 : Importance des enzymes clivant le saccharose dans l'équilibre entre les signaux de sucres et les voies métaboliques (Koch 2004). 199
Figure 6.6 : Les sucres et les phytohormones sont des composants clé dans la régulation de la croissance des plantes (d'après Ljung *et al.* 2015). 200

Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Modifications métaboliques des racines (A) et feuilles (B) des 2 cultivars de maïs FuturiXX et Seiddi. 94
Tableau 3.2 : Initial quality check des extraits d'ARN (JEQ1 à JQ40) 103
Tableau 3.3 : Pourcentage de séquences présentant un match pour chaque échantillon par rapport à la séquence AGPv4 du génome du maïs. 106
Tableau 3.4 : Modifications significatives (p<0,05, FC>2) d'abondance de transcrits au niveau du compartiment foliaire (A) et racinaire (B) chez les cultivars Seiddi (fond en orange sur la colonne de gauche) et FuturiXX (fond en gris sur la colonne de gauche). 107
Tableau 5.1 : Modifications des teneurs en métabolites des grains des cultivars FriedriXX et FuturiXX. 181

CHAPITRE 1 : Introduction générale

1. Une agriculture moderne en pleine mutation

1.1. Limites écologiques de l'agriculture intensive

Afin de satisfaire les besoins d'une population planétaire croissante, l'objectif principal de l'agriculture durant les décennies qui ont suivi la Seconde Guerre Mondiale a été d'augmenter les rendements agricoles, une forme d'agriculture appelée agriculture intensive. Une étude de la FAO (Food and Agriculture Organization, 1997) montre ainsi que la production mondiale de céréales et de plantes à racines alimentaires a doublé entre 1961 et 1996. Ceci a été rendu possible par toute une série d'innovations dans la sélection variétale et le machinisme agricole et par l'augmentation du commerce international de denrées alimentaires et de la concentration des terres, et productions agricoles. Mais il a aussi été rendu possible par l'utilisation d'agents chimiques de protection et de fertilisation des cultures. Par exemple, l'augmentation de la production agricole entre 1961 et 1996 a été accompagnée d'une multiplication des fertilisations azotée et phosphatée de 6.87 et 3.48 fois, respectivement (Tilman 1999, Food and Agriculture Organization, 1997).

Même si le succès de l'agriculture intensive de la deuxième moitié du XXème siècle est indéniable en termes de baisse des prix des denrées alimentaires et du nombre d'humains souffrant de malnutrition, ses effets délétères sur la santé des sols, des écosystèmes et des humains sont devenus clairs au tournant du siècle. La durabilité d'une telle pratique agricole a ainsi été remise en cause avec la mise en place de nombreux plans de réduction des usages de pesticides organiques de synthèse comme le plan Ecophyto 2018 en France adopté fin 2007 suite au Grenelle de l'environnement. Même si l'objectif initial de réduction d'un facteur deux des substances les plus toxiques ne sera pas atteint, une première baisse de 2.7% du nombre de doses unité a été observée sur 2014-2015 et l'approche sera poursuivie avec le plan Ecophyto 2. La situation est plus complexe du côté des engrais car ils sont issus de denrées pétrolières (nécessaires à la minéralisation de l'azote atmosphérique) et géologiques (polyphosphate) en quantités limitées et leur échappement des champs est la source de dérèglements écologiques à large échelle (Townsend *et al.* 2003) (Figure 1.1). Dans le cas des engrais azotés, si leur utilisation augmente les rendements agricoles, ils perdent en efficacité à forte dose où ils commencent par contre à poser des problèmes de santé publique (Figure 1.1). Dans les années 2000, l'objectif de nombreuses études a donc été d'appréhender la relation entre rendement et fertilisation afin d'optimiser l'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE : nutrient use efficiency) en tant qu'engrais (Sadras et Lemaire 2014 ; Bodirsky et Müller 2014). Malgré les différents efforts, les pratiques culturales actuelles ne permettent pas une utilisation optimale des engrais

azotés et, encore aujourd'hui, la NUE n'avoisine que 50% (Bodirsky *et al.* 2012). L'usage d'engrais azotés d'origine minérale continue ainsi à contribuer à la pollution des sols et de l'eau notamment par lixiviation des nitrates. La capacité d'assimilation de l'azote par une culture dépend de nombreux facteurs tels que le type de culture, son âge, le climat, la texture et la structure du sol (Cassman *et al.* 1998). Le cycle biogéochimique de l'azote étant lui aussi complexe et lié à la vie microbiologique des sols et au climat, il est difficile pour les coopératives agricoles d'assurer chaque année des rendements optimums avec le minimum d'engrais nécessaire (Weinbaum *et al.* 1992). Une gestion optimisée nommée agriculture raisonnée a cependant permis de conserver des rendements optimums avec des excès de fertilisation conservés à leur minimum tout comme l'usage des pesticides.

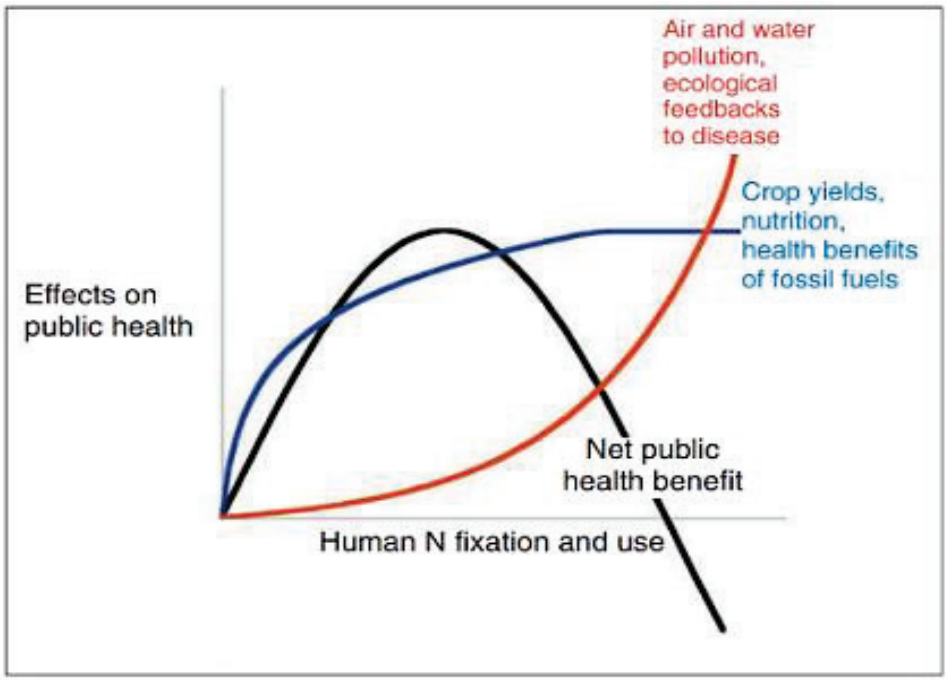


Figure 1.1 : Modèle conceptuel de l'impact d'une fixation et d'une utilisation du diazote atmosphérique croissante par l'Homme sur la santé publique globale (d'après Townsend *et al.* 2003)

Parallèlement à l'augmentation de la fixation du diazote atmosphérique réalisé par l'Homme, des effets positifs de l'azote sur la croissance végétale, la production alimentaire, et sur la nutrition globale ont été mis en évidence. Ceux-ci sont importants à de faibles doses d'azote et tendent à saturer. Inversement, les effets sur la santé humaine sont d'autant plus délétères que l'usage de l'azote est augmenté. Un optimum théorique existe donc pour la santé humaine.

Même si l'augmentation des connaissances scientifiques laisse envisager une diminution graduelle de l'usage des pesticides de synthèse et des engrais minéraux dans les décennies à

venir, l'augmentation de la contestation des agriculteurs et du suicide dans leur profession indique que l'agriculture raisonnée ne pourra pas résoudre toutes les difficultés générées par l'intensification de l'agriculture. Les causes du malaise sont multiples. Le développement d'une agriculture circulaire, la valorisation non-alimentaire des denrées agricoles et des négociations avec les distributeurs et l'état sont autant de leviers utilisés pour soutenir le revenu des agriculteurs. Mais ces actions ne résolvent pas le clivage croissant entre citadins et ruraux. Ces derniers sont de plus en plus mis au banc des nouvelles technologies et de la culture. Le lien des nouveaux citadins avec le monde rural est de plus en plus fin. Ceux-ci développent des souhaits alimentaires nouveaux pour, par exemple, l'agriculture biologique, l'alimentation végétarienne et végan, ou les fermes urbaines. Bien que pour l'instant aucune de ces pratiques agricoles n'ait fait la preuve de sa capacité à nourrir une large population, la position des citadins en tant que client et leur nombre toujours croissant leur permet d'imposer leurs souhaits. Le fait que ces décisions se prennent sans concertation avec les producteurs laisse les organisations agricoles amères. Contrairement à la plupart des consommateurs citadins, elles ont conscience des recommandations des Nations Unies pour un doublement de la production agricole mondiale d'ici 2050 afin de satisfaire l'augmentation prédite de population (United Nation 2009). Elles voient également que si seulement 3% des surfaces du globe sont cultivables, elles sont en constante régression du fait de l'expansion des banlieues autour des centres urbains. Finalement, mieux que quiconque, elles perçoivent les effets délétères des changements climatiques avec des baisses des fois importantes de rendement comme de 30% sur le raisin et 35% sur les pommes cette année en France. Tout ceci incitait le responsable de la FNSEA, Xavier Beulin, de titrer son dernier ouvrage par la phrase choc 'Notre agriculture est en danger' (Beulin 2017).

1.2. L'agriculture écologiquement intensive

Afin de répondre aux enjeux sociétaux et techniques, une des voies en cours d'exploration, notamment en France, est celle de l'agriculture écologiquement intensive (Griffon 2013). Cette approche agroécologique qui se situe à l'échelle du paysage est basée sur la biodiversité. Elle vise à conserver les rendements actuels tout en réduisant la consommation d'énergie, de pesticides et d'engrais en conséquence d'une augmentation de la fertilité des sols et des services écosystémiques rendus (Figure 1.2). Alors qu'en conditions contrôlées, l'augmentation du rendement peut être apportée par une intensité lumineuse plus importante, une photopériode optimisée, l'usage de températures spécifiques à l'espèce végétale ou une bonne disponibilité en eau (Dorais 2007), la problématique est très différente en plein champ. Le terme

agroécologie a été utilisé pour la première fois en 1928 par Basil Bensin (Wezel *et al.* 2014) (Figure 1.2). La discipline quitte le domaine de la recherche dans les années 80-90 pour devenir un mouvement agronomique d'importance notamment en Amérique latine où elle s'oppose à l'agriculture verte et productiviste jugée incapable de sortir les paysans de la misère. Ceci a conduit Miguel Altieri, professeur à l'université de Californie (Berkeley, USA) de définir l'agroécologie comme 'la gestion des ressources naturelles au bénéfice des plus démunis, confrontés à un environnement défavorable' (Altieri 2002). La discipline s'est ensuite étendue de la ferme aux paysages et pratiques agricoles. Elle fait désormais appel à des notions issues de l'agronomie et des sciences humaines et elle est maintenant pratiquée dans les pays développés pour être définie depuis 2003 comme 'écologie des systèmes alimentaires' (Francis *et al.* 2003).

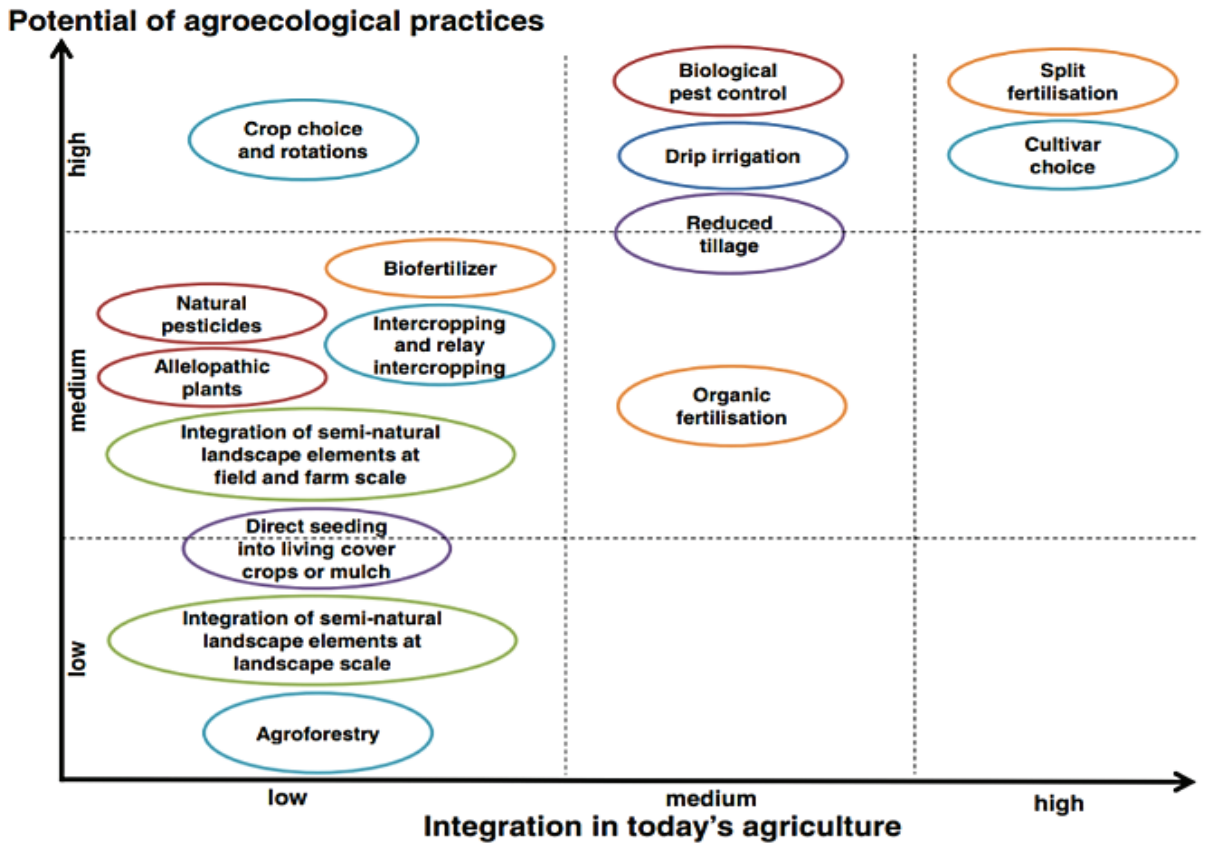


Figure 1.2 : Utilisations potentielles des pratiques agroécologiques dans les prochaines décennies et relation avec leur intégration dans l'agriculture actuelle (d'après Wezel *et al.* 2014).

La plupart des pratiques sont encore très peu intégrées dans l'agriculture actuelle avec un potentiel d'intégration dans un futur proche assez faible ou moyen. A l'inverse, la fertilisation organique, un travail du sol réduit, une irrigation au goutte à goutte, une lutte biologique contre les maladies, un meilleur choix du cultivar et une division de la fertilisation sont déjà moyennement ou fortement intégré et ont un fort potentiel pour le futur.

Le cycle de l'azote dans les sols est de loin celui qui a été le plus étudié car il est au centre de nombreuses problématiques écologiques, en particulier la dénitrification, et les composés azotés utilisables par les plantes constituent l'intrant le plus en manque actuellement (Herridge *et al.* 2008). De meilleures pratiques culturales spécifiques de la culture et de la zone cultivée permettent d'augmenter l'efficacité d'assimilation des composés azotés présents dans le sol (Cassman *et al.* 1998 ; Hochmuth 1992). Il est également possible d'exploiter des systèmes de fixation biologique de l'azote (BNF) (Watanabe et Liu 1992), ou d'utiliser les formes solubles organiques de l'azote initialement présentes dans les sols (Murphy *et al.* 2000). Plus récemment, de nombreuses équipes ont exploré une voie additionnelle basée sur l'utilisation de bactéries interagissant en coopération avec les plantes et augmentant la croissance racinaire et foliaire mais aussi le rendement de ces dernières. Celles-ci sont collectivement appelées PGPR pour Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Tahir et Sarwar 2013; Bhattacharyya et Jha 2011). Leur bénéfice sur les cultures a été démontré en tant que biofertilisant et agent de biocontrôle (Babalola 2010). Néanmoins, les mécanismes d'action de ces bactéries sur les plantes sont encore spéculatifs et mériteraient d'être mieux compris pour en tirer le meilleur potentiel (ingénierie agroécologique).

2. Les PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

2.1. Définition et diversité

Les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – bactéries stimulatrices de croissance) sont des bactéries qui interagissent avec les plantes à travers une étroite collaboration. Ces associations plante/rhizobactéries ont été observées dès 1904 par Lorenz Hiltner (Hartmann *et al.* 2007)**.** Les racines végétales sécrètent environ 30% des photosynthétats sous forme d'exsudats racinaires qui attirent, sélectionnent et maintiennent la microflore symbiotique au niveau des racines (Jones 2003; Shi *et al.* 2011). La rhizosphère, c'est-à-dire la zone directement influencée par les racines de la plante, est donc une zone plus densément peuplée en microorganismes que le sol non-rhizosphérique mais où la diversité microbienne y est moindre. Parmi les bactéries rhizosphériques, 2 à 5% a la capacité de stimuler la croissance végétale (Antoun et Prévost 2005; Sgroy *et al.* 2009; Jha *et al.* 2010). Leurs interactions avec les plantes sont connues pour augmenter la croissance et la santé (Faramarzi *et al.* 2012) de l'hôte végétal à travers différents mécanismes directs et indirects qui ne sont pas encore totalement connus (Vacheron *et al.* 2013). Parmi les nombreux genres bactériens pouvant développer des symbioses avec les plantes, certains ne créent que des interactions mutualistes

(symbioses associatives) alors que d'autres, beaucoup plus intimes (symbioses vraies), nécessitent la formation d'un organe spécifique tel que le nodule dédié aux échanges entre les deux partenaires (Martínez-Viveros *et al.* 2010). Même si la fixation d'azote dans ces derniers est beaucoup plus efficace, la formation de nodules n'est possible que chez peu de famille de végétaux (Fabaceae, Casuarinaceae et Betulaceae) et ne concerne que très peu de genres bactériens (*Allorhizobium*, *Azorhizobium, Rhizobium*, *Bradyrhizobium, Mesorhizobium* et *Frankia*) (Martínez-Viveros *et al.* 2010). Dans la plupart des cas de symbioses bactéries-plantes, les associations sont des symbioses associatives simplement coopératives. Ces interactions ne sont pas obligatoires et apparaissent comme beaucoup moins spécifiques (Drogue *et al.* 2012). La plupart des genres végétaux sont concernés et les genres bactériens impliqués appartiennent principalement aux Firmicutes et Proteobactéries (*Agrobacterium, Athrobacter, Azospirillum, Bacillus, Burkholderia, Caulobacter, Chromobacterium, Erwinia, Flavobacterium, Micrococcus, Pseudomonas* et *Serratia)* (Gray et Smith 2005; Jorge Barriuso 2008). Dans de rares cas, les PGPR impliquées dans des symbioses associatives pénètrent la surface racinaire pour se développer dans le cortex en tant qu'endophytes. Plus généralement, elles se limitent à coloniser la surface des racines où la compétition avec d'autres microorganismes rhizosphériques pour les exsudats riches en énergie est importante (Jones 2003; Shi *et al.* 2011; Dutta et Podile 2010; Drogue *et al.* 2012). Dans cette thèse, nous nous intéresserons aux PGPR impliquées dans des symbioses associatives.

2.2. Mode d'ancrage des PGPR sur les racines de la plante

Les sites préférentiels de colonisation des PGPR sont les zones d'élongation de la racine et les poils absorbants (Assmus *et al.* 1995; Ahmad *et al.* 2011). L'ancrage des bactéries aux racines de la plante est une étape essentielle dans la mise en place de l'interaction et des échanges nutritifs ou hormonaux entre les deux partenaires. Sans cet ancrage, les PGPR ne profiteraient pas directement des exsudats racinaires qui diffuseraient dans la rhizosphère. Il est réalisé dans la plupart des cas en 2 étapes successives (Bashan et Holguin 1997)**.** Une première étape d'adsorption, en général assez faible et réversible. La seconde étape est une étape d'ancrage *stricto sensu* qui est quant à elle beaucoup plus forte et irréversible. Elle est réalisée grâce aux exopolysaccharides synthétisés par la bactérie dont le temps d'action est dépendant du genre et de l'espèce (Egorenkova *et al.* 2000)**.** Une approche mutant a montré que chez *Azospirillum brasilense*, le flagelle polaire, dont la fonction première est la nage, participait largement à l'adsorption des bactéries sur les racines de blé (Croes *et al.* 1993). Le pH de la rhizosphère et la présence de cations semblent être des facteurs influençant directement l'ancrage de la

bactérie sur les racines de la plante. La première étape d'accrochage est par exemple fortement limitée par des concentration en Ca^{2+} et $(PO_4)^{3-}$ trop importantes de même que certains pH sélectionneront l'ancrage de certaines espèces (Dutta et Podile 2010).

2.3 Modes d'actions des PGPR développant des symbioses associatives

Les PGPR exercent de multiples actions sur les plantes : aide directe à la nutrition minérale, production de phytohormones pour modifier l'architecture de la plante et sa croissance, aide à l'établissement de symbioses vraies bactériennes et fongiques et protection contre les agents infectieux par la production de substances antimicrobiennes et l'activation des réponses de résistance aux stress (Menendez et Garcia-Fraile 2017). Cette diversité des actions est en grande partie liée à la diversité des PGPR (Barriuso *et al.* 2008). Même si de nombreuses souches de PGPR possèdent plusieurs compétences génétiques favorables au développement des plantes, aucune n'exerce tous les modes d'actions connus.

L'aide à la nutrition minérale des plantes implique la capacité de transformer le diazote atmosphérique, abondant mais non-utilisable par les plantes, en ammonium soluble dans l'eau et absorbable par les végétaux. Il implique aussi la solubilisation du phosphate inorganique des particules du sol. La production de sidérophores par certaines souches PGPR est de même liée à l'augmentation de croissance des plantes et au gain de rendement lors d'une inoculation par des PGPR (Kloepper *et al.* 1980). Ces derniers ont une très forte affinité pour les ions Fe^{3+} et vont donc permettent de les complexer et les solubiliser. Ce mécanisme augmente ainsi la capacité de la plante à assimiler le fer nécessaire à sa croissance, sa biodisponibilité étant limitée en milieu aérobie (Robin *et al.* 2008). L'utilisation des sidérophores de bactéries rhizosphériques par le maïs a notamment été montré lors d'intéractions avec des PGPR du genre *Pseudomonas* (Sah *et al.* 2017).

Parmi toutes les propriétés phytobénéfiques des PGPR, la modulation de la balance hormonale des plantes a les effets les plus pléiotropiques en affectant croissance, nutrition et tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Ceci est en partie dû aux multiples effets des hormones végétales sur ces différents registres mais aussi aux multiples rôles joués par les racines chez les plantes. Une modification de l'architecture racinaire est en effet un des premiers effets visibles de l'action des PGPR (El Zemrany *et al.* 2007). La racine est un organe de la plante extrêmement important et à l'origine de la nutrition minérale de cette dernière. Elle agit en aval de nombreux mécanismes et son architecture aura des répercussions dans la plante entière. Elle est construite de manière complexe où chaque zone a son rôle : la coiffe protège la racine lors de sa pénétration dans le sol, le méristème apical va permettre la formation de nouvelles cellules, une

région intermédiaire permet la croissance et la spécialisation des cellules et enfin de nombreux poils absorbants vont permettre l'assimilation des minéraux au niveau du sol (Scheres *et al.* 2002). Plus en aval, des racines latérales apparaissent. Un nombre de racines latérales plus important permettra à la plante de prospecter un volume de sol plus large. Ceci est directement lié à la nutrition minérale de la plante et donc à sa croissance. Le système racinaire peut rapidement changer d'architecture pour s'adapter à des variations locales ou temporelles du statut hydrique, nutritif ou structurel du sol qui l'entoure (Hu *et al.* 2009). Sa grande adaptabilité permet ainsi aux plantes de s'adapter aux nombreux stress rencontrés au cours de leur vie (Degenhardt et Gimmler 2000). En ce sens, la capacité des bactéries PGPR à affecter l'architecture du système racinaire va modifier leur capacité à s'adapter à leur environnement pour en tirer le meilleur parti.

Les PGPR ont la capacité de synthétiser et sécréter de nombreuses hormones végétales impliquées dans la construction de l'architecture du système racinaire : auxines, cytokinines, gibbérellines et acide abscissique (ABA). Elles sont aussi capables de détruire le précurseur biosynthétique de l'éthylène, l'acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique (ACC). Les PGPR ont donc la potentialité de modifier la balance hormonale de la plante. Les auxines sont les plus étudiées. Même si l'auxine centrale des mécanismes d'interaction plantes/PGPR est l'acide 3-indolacétique (IAA), l'IBA (acide 3-indolbutyrique) a aussi été identifié chez *Azospirillum brasilense* UAP 154 (Martínez-Morales *et al.* 2003)**.** La production d'IAA par la bactérie est directement dépendante de la présence de tryptophane, son précurseur mais aussi du pH (Ona *et al.* 2003). Il a de même été démontré que de faibles concentrations en vitamines B (pyridoxine et acide nicotinique notamment) dans le milieu augmentent la production d'IAA par *A. brasilense.* Sa synthèse est contrôlée par le gène *ipdC* isolé par Costacurta *et al.* (1994) qui code pour une enzyme clé de la synthèse de l'IAA : la décarboxylase de l'indole pyruvate. L'IAA stimule la croissance des coléoptyles, la réduction de la longueur de la racine principale et l'augmentation du nombre de racines adventives (Dobbelaere *et al.* 1999). En effet, de faibles concentrations en IAA peuvent stimuler une élongation de la racine principale alors qu'une forte concentration en IAA va stimuler la formation de racines latérales tout en inhibant l'élongation de la racine principale (Spaepen *et al.* 2007)**.** La balance entre l'auxine et les cytokinines a également son importance dans le développement racinaire, un ratio qui peut être modifié chez les plantes lors de leur interaction avec les PGPR (Aloni *et al.* 2006). En effet, de fortes concentrations en cytokinines vont inhiber la formation de racines latérales et l'élongation de la racine principale (Riefler *et al.* 2006). Les cytokinines stimulent également

la division cellulaire chez la plante (Werner *et al.* 2001). La production de cytokinines par des PGPR a notamment été mise en évidence chez *P. fluorescens* et *A. brasiliense*. Les principales formes synthétisées sont la zéatine (Z), l'isopentenyl adénosine (IPA), la *trans*-zéatine ribose (ZR) et le dihydrizéatine riboside (DHZR) (García de Salamone *et al.* 2001). Les cytokinines sont connues pour induire l'ouverture des stomates. En situation de stress hydrique, alors que la fermeture des stomates est logiquement initiée, il a été montré qu'une inoculation par des PGPR augmentait la concentration en cytokinines des parties aériennes et donc réduisait cette fermeture. Ceci est accompagné par une stimulation de la croissance des parties aériennes et donc une diminution du ratio de masses aérien/racinaire (Arkhipova *et al.* 2007). Les gibbérellines participent également aux effets phytobénéfiques des PGPR (Kang *et al.* 2014). Elles sont connues pour induire la germination des graines mais aussi augmenter la production de poils absorbants et la croissance des parties aériennes (Riefler *et al.* 2006). Leur production par certaines PGPR a été associée à une augmentation du rendement (Bottini *et al.* 2004).

Certains mécanismes d'action des PGPR vont permettre d'induire une réponse systémique de la plante (productivité de la plante et immunité) (Van Loon *et al.* 1998). C'est le cas des PGPR modifiant les teneurs en acide abscissique ou encore d'éthylène (Porcel *et al.* 2014). La production d'ABA a été mis en évidence chez *A. brasilense* Sp 245 (Cohen *et al.* 2007). Même si l'ABA est considéré comme une hormone de stress, certaines études ont montré son rôle important dans des fonctions de régulation de la plante, en absence de stress, avec des effets d'élongation des parties aériennes (Sharp et LeNoble 2002). La destruction du précurseur de biosynthèse de l'éthylène (désamination de l'acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique par l'ACC déaminase) est responsable des effets d'augmentation de croissance observés chez les plantes en coopération avec des PGPR (Shahzad *et al.* 2013). C'est le cas par exemple de la PGPR *Enterobacter* sp. UPMR18 qui possède le gène codant pour une ACC déaminase et qui induit une résistance au stress salin chez des plants de gombo (Habib *et al.,* 2016). En effet, l'éthylène inhibe le transport des auxines, la croissance racinaire mais c'est aussi un activateur des défenses des plantes (Glick 2005 ; Barnawal *et al.* 2012). L'utilisation de PGPR possédant une activité ACC déaminase est une piste très intéressante à suivre en plein champ où les stress abiotiques sont nombreux et variés (Glick 2014 ; Bal *et al.* 2012). Ces effets systémiques peuvent de même être notifiés par des modulations métaboliques en lien avec certaines voies. Ainsi, la concentration en acides aminés reliés à l'assimilation de l'azote à la fois dans les parties aériennes et racinaires est fortement augmentée chez les plantes inoculées avec des

PGPR et ceci s'accompagne d'une augmentation de concentration en malate et en éthylène chez le riz inoculé avec *Herbaspirillum seropedicae* (Curzi *et al.* 2008).

Certaines PGPR telles que des *Pseudomonas* sécrètent des composés antimicrobiens comme l'acide cyanhydrique (Sarma *et al.* 2002), dont certains ont également la propriété d'agir sur la croissance et l'expression des défenses végétales. C'est le cas du DAPG (2,4-diacéthylphloroglucinol), un antimicrobien très répandu qui induit de plus l'ISR (Induced Systemic Resistance) chez la plante (Couillerot *et al.* 2009) et provoque la ramification des racines (Walker *et al.* 2011b). Une autre substance à actions multiples produite par certaines PGPR est l'oxyde nitrique (NO) qui régule des défenses végétales et induit la formation de racines latérales et poils absorbants. La synthèse de cette dernière est dépendante des différentes sources d'azote accessibles à la PGPR (Molina-Favero *et al.* 2007)**.** Les PGPR peuvent aussi induire les défenses des plantes en stimulant la production de composés phénoliques tels que les acides gallique, protocatéchique, chlorogénique, caféique, férulique ou encore ellagique (Lavania *et al.* 2006). Il a d'ailleurs été envisagé de les utiliser dans des programmes de contrôle biologique de certains phytopathogènes.

Les PGPR sont également reconnues comme des aides très efficaces lorsqu'une résistance à des stress abiotiques naturels (sécheresse, salinité, pH, température) et d'origine anthropique (pollutions aux métaux lourds, pesticides, pollution de l'air) doit-être initiée. Elles sont de fait au centre de nombreuses études car elles affectent presque toutes les fonctions de la plante (Shao *et al.* 2007)**.** Le stress hydrique est par exemple un important facteur limitant l'agriculture dans le monde entier. L'inoculation par des PGPR telle que *P. fluorescens* lors d'un stress hydrique permet de limiter la perte de croissance de la plante (longueur des parties racinaires, nombre de feuilles et hauteur chez certaines plantes hôtes) en lien avec la production d'auxines (Jaleel *et al.* 2007). Mais les plantes sont aussi fortement sujettes au stress salin et selon la FAO (2008), 800 millions d'hectares sont affectés par une salinité trop importante du sol. Certaines PGPR produisent une quantité très importante d'exopolysaccharides pouvant protéger les racines de la plante d'une salinité importante du sol (Sgroy *et al.* 2009) ou réduire l'assimilation de Na^+ par la plante (Kohler *et al.* 2010)**.** D'autres PGPR ont la capacité d'augmenter la synthèse de proline chez la plante, une substance qui stabilise le statut hydrique des cellules végétales (Dimkpa *et al.* 2009; Bharti *et al.* 2012), ou d'induire la synthèse de métabolites secondaires tels que de triterpénoides (Awasthi *et al.* 2011)**.**

2.4. Un genre de PGPR d'intérêt économique : Azospirillum

Parmi les PGPR, les espèces du genre *Azospirillum* ont particulièrement attiré l'attention car elles sont inoffensives pour l'Homme et l'environnement et plusieurs études ont démontré leur efficacité en champ en tant que stimulateur de croissance de plantes céréalières (Drogue *et al.* 2012). Une méta-analyse d'études menées en plein champ de 1981 à 2008 sur l'inoculation de grains de blé par *Azospirillum* sp. a révélé leur capacité à augmenter le rendement en grain et en fourrage, de 14% et 27% respectivement, en absence de fertilisation azotée (Veresoglou et Menexes 2010). Les augmentations de rendement étaient plus basses, bien que la différence soit non-significative, lors du co-ajout d'azote minéral. De même, la co-inoculation avec des bactéries fixatrices d'azote du genre *Azotobacter* n'a pas modifié de manière significative les effets d'*Azospirillum* sp. (Veresoglou et Menexes 2010). La plupart des espèces d'*Azospirillum* possède le gène de fixation de l'azote atmosphérique *nifH* mais sa contribution dans la croissance de la plante hôte a été sujette à débat et jugée comme mineure (Bashan *et al.* 2004). Il est néanmoins connu que la plupart des *Azospirillum* sont capables de sécréter des hormones à effet auxinique, et parfois, des cytokinines et gibbérélines. Ces dernières pourraient être à l'origine de la modification de l'architecture racinaire et de la physiologie de la plante, et en conséquence, de sa capacité à prospecter le sol à la recherche d'eau et de minéraux (Bashan *et al.* 2004; Vacheron *et al.* 2013).

Une souche d'*A. lipoferum* : *A. lipoferum* CRT1 a été isolée de la rhizosphère du maïs en France et décrite comme un fixateur de diazote atmosphérique (Fages et Mulard 1988). Cette souche a été commercialisée dans les zones tempérées sur la base de sa capacité à améliorer la croissance et le rendement des plantules de maïs en champ (El Zemrany *et al.* 2006) et lors d'essais en pot (Jacoud *et al.* 1999; El Zemrany *et al.* 2007).

3. Les outils de métabolomique dans l'étude du végétal

3.1. La génération 'omique' et la place de la métabolomique

'Genomique', 'proteomique', 'transcriptomique', 'métabolomique', 'fluxomique' : l'aire des 'omics' nous a apporté de nombreux outils en biologie, notamment pour l'étude du végétal. La métabolomique, l'étude du métabolome, est l'un des moins achevés de cette série. Le métabolome est défini comme l'ensemble des petites molécules accumulées par les cellules. Nous distinguerons les métabolites primaires, essentiels au développement (division et différentiation cellulaires) et à la vie cellulaire qu'ils soient les produits finaux de voies de biosynthèse (acides aminés, nucléotides, oses et dérivés, et certains acides gras) ou des précurseurs ou intermédiaires de voies essentielles (fumarate ou citrate par exemple), et les

métabolites secondaires, plutôt impliqués dans l'adaptation de la plante à son environnement ou dans sa stratégies de défense. Le rôle exact d'un grand nombre de métabolites secondaires reste d'ailleurs mal connu. Il peut s'agir de composés phénoliques, terpéniques ou encore de composés azotés (alcaloïdes).

Selon Patti *et al.* (2012), les métabolites sont les signatures directes de l'activité biologique (*'metabolites serve as direct signatures of biochemical activity'*). Les teneurs en métabolites peuvent changer dans le temps en réponse à un stimulus, ce dernier pouvant être développemental ou externe comme lié à une infection bactérienne ou virale par exemple (Collino *et al.* 2013). L'étude de l'empreinte métabolique en réponse à une maladie, ou à une toxine, est devenue une discipline à part entière et a été renommée 'Métabonomique' (Nicholson *et al.* 1999). Une database du métabolome humain (HMDB) a été créée et est passée de 6500 métabolites annotés en 2009 à près de 400 000 en 2013 (version 3.0) (Wishart *et al.* 2013). Le nombre de métabolites primaires et secondaires dépend fortement de l'organisme. Alors que la database EcoCYC concernant *Escherichia coli* contient 1 170 métabolites distincts (Keseler *et al.* 2005), dans le règne végétal leur nombre avoisine les 200 000 (Mungur *et al.* 2005).

3.2. Les outils d'intégration des 'omique'

Comprendre un système biologique nécessite une intégration complète des différents 'omiques' afin de passer du génome d'un individu ou groupe d'individus à son phénotype (Fiehn 2002). Cette confrontation permet ainsi de comprendre les causes de petites variations propres à un système biologique (Zhang *et al.* 2010). Plusieurs logiciels ont été mis au point afin de faire le lien entre les importants jeux de données obtenus lors des études de génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique. La visualisation de réseaux métaboliques ou protéiques est à présent devenu un outils de pointe afin de confronter et comprendre les liens entre molécules et protéines (Gehlenborg *et al.* 2010). Même si certains logiciels sont payants, beaucoup sont en open access. Ils peuvent être en utilisation autonome ou nécessiter une synchronisation en ligne, et leur accessibilité est permise par la diversité des processeurs sur lesquels il est possible de les utiliser. Ces logiciels de visualisation tendent ainsi à se simplifier afin que des utilisateurs moins spécialistes puissent les utiliser. C'est le cas par exemple de Vanted (Junker *et al.* 2006) qui permet de visualiser des réseaux et réaliser des cartes de voies métaboliques, mais aussi de Cytoscape, VisANT ou encore NAViGatOR (revu dans Gehlenborg *et al.* 2010).

3.3. Approches non-ciblée et ciblée en métabolomique

Il existe différentes approches dans l'étude du métabolome et il est indispensable, avant de débuter les analyses, de déterminer l'approche à mettre en place afin de répondre correctement aux problématiques biologiques de l'étude.

L'approche non-ciblée (**profiling**) a pour objectif d'investiguer le profil métabolique d'un organisme, d'un organe ou d'un tissu cellulaire dans son ensemble. En théorie, ceci est impossible car de nombreuses barrières se dressent devant l'expérimentateur. La première correspond à la complexité et à la diversité chimique du métabolome (Goodacre *et al.* 2004; Fukushima *et al.* 2009). Chaque métabolite a des propriétés chimiques propres nécessitant un solvant d'extraction et un outil d'analyse adaptés. A partir de ce constat, il apparaît clairement que des métabolites polaires et apolaires notamment ne pourront pas être analysés (et souvent même extraits) conjointement. Pour une méthode d'extraction et d'analyse donnée, seule une fraction des métabolites ayant des propriétés physicochimiques semblables pourra être analysée. Cette fraction contient souvent tout de même plus de substances que les technologies actuelles de chromatographie gazeuse (GC) et liquide (LC) ne peuvent séparer au vue de leurs limites actuelles de résolution. Ceci limite encore plus le nombre de métabolites qui peut être analysé, même si de nombreuses améliorations récentes sur les traitements bioinformatiques des données de spectrométrie de masse aident considérablement sur ce point. Mais une des plus grandes limitations réside dans l'identification structurale de chaque substance dans chaque échantillon. Cette étape demande beaucoup de temps et requiert l'usage de standards spécifiques pour chaque substance.

L'analyse métabolique par '**fingerprinting**' a quant à elle pour but d'évaluer la signature d'un évènement ou d'un phénotype sur un groupe de métabolites. La différence principale avec la méthode précédente est que l'annotation des substances est simplifiée. Elle n'implique pas d'identification sur la base d'un standard chimique pur ni de quantification précise. Les substances sont généralement annotées sur la base de leur temps de rétention et d'une donnée spectrale (UV ou MS). L'aire du pic est souvent prise comme information sur la quantité sans vérification de la linéarité des réponses des instruments. Ces informations ont leurs lacunes évidentes mais la rapidité et la possibilité d'automatiser les analyses permet le traitement d'un grand nombre d'échantillons dont l'analyse statistique permet souvent de mettre en évidence, à moindre frais, l'existence de marqueurs chimiques spécifiques des processus étudiés. Une analyse ciblée sur ces substances peut alors être conduite dans un deuxième temps.

L'approche ciblée (**targeted analysis**) va quant à elle permettre de traquer un (ou un petit nombre de) métabolite(s) d'intérêt parmi tout le métabolome d'un échantillon biologique (Fiehn

2002; Vaclavik *et al.* 2014). Contrairement aux deux premières approches, celle-ci est aveugle aux substances non-ciblées mais elle garantit une réponse sur la (ou les) substance(s) ciblée(s). L'usage de standards internes d'extraction est également possible pour améliorer la quantification dans un échantillon (isotope du métabolite ciblé par exemple). Cette approche est notamment utilisée par les analyses de contrôle qualité pour la recherche de toxines ou pesticides par exemple (Cevallos-Cevallos *et al.* 2009).

Pour chaque échantillon, il sera nécessaire de définir la méthode d'extraction afin d'éliminer toute source de biais (effet matriciel notamment). Les métabolites extraits sont ensuite analysés. En fonction de l'outil d'analyse, l'extrait devra subir ou non une étape de dérivation chimique afin de rendre visible les métabolites d'intérêt. L'utilisation d'une librairie de standards est nécessaire à l'indentification des substances.

Ces différentes approches peuvent donc être utilisées indépendamment ou conjointement pour décrypter un système biologique. Au cours des dernières années, cet outil, au début très clinique, a été largement développé pour l'étude de systèmes végétaux. Néanmoins, il ciblait principalement des systèmes induisant de fortes modifications du métabolome tels que l'étude de l'impact de mutations ciblées (Roessner *et al.* 2001; Fiehn 2002) ou de stress environnementaux (hydriques, salins, températures) (Kaplan *et al.* 2004). L'étude de Shulaev *et al.* (2008) est le parfait exemple d'une étude de stress abiotique chez les plantes, mettant à profit les différentes approches de la métabolomique : fingerprinting, profiling puis analyses ciblées. Cette dernière met en évidence le challenge que représente le traitement de jeux de données issus d'analyses métaboliques afin de répondre à une question biologique. Néanmoins, les études des modifications plus fines du métabolome dans des systèmes tels que les interactions plantes/bactéries étaient jusqu'à maintenant très peu nombreuses étant donné la difficulté de traitement des jeux de données. L'évolution constante des technologies, et des outils bioinformatiques, d'analyse métabolique nous permet depuis une dizaine d'années d'aller chercher les plus petites modifications quantitatives des métabolites clés des interactions dynamiques complexes telles que les symbioses associatives. Cette application précise est d'ailleurs largement discutée dans l'article de revue de Allwood *et al.* (2008). Une étude récente a comparé les profils métaboliques de deux lignées de maïs en réponse à l'inoculation avec deux bactéries fixatrices d'azote (*Herbaspirillum seropedicae* et *A. brasilense*) afin de déterminer les mécanismes d'interaction plantes/bactéries (Brusamarello-Santos *et al.* 2017). Elle a mis en évidence des métabolites clés de l'interaction. Néanmoins, même si la métabolomique apparaît comme un outil de pointe afin d'étudier les compartiments du végétal

impliqués dans une réponse biologique, il ne faudra pas oublier que de puissants outils de traitement bio-informatique seront nécessaires afin de tirer des conclusions des larges matrices de données et d'établir un lien corrélatif avec un processus biologique.

3.4. Méthodes d'analyse des métabolites par chromatographie

Un grand nombre d'outils d'analyse chromatographique a été développé ces dernières années, possédant chacun leurs avantages et leurs limites. Le choix de l'outil d'analyse sera fortement dépendant de son accessibilité (laboratoire d'accueil, coût), du type d'échantillon et de la question biologique mais aussi de la sensibilité requise (quantité de matière de départ). Nous distinguerons la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie par perméation de gel (exclusion stérique), la chromatographie gazeuse (GC), liquide sur colonne (LC) mais aussi haute performance (HPLC), la chromatographie ionique (CI), ou encore la chromatographie par fluide supercritique (CFS) (Braithwaite et Smith 1985). Ces différents outils de séparation des molécules sont généralement couplés à un analyseur par spectrométrie de masse (MS). Ceux-ci se composent d'abord d'une chambre d'ionisation qui peut fonctionner selon deux principes, soit une ionisation 'dure' par impact électronique qui génère des cations radicaux métastables, soit une ionisation 'douce' par ajout ou soustraction de protons. Cette dernière méthode génère des ions plus stables chimiquement et donc moins susceptibles à la fragmentation avant détection. Elle peut être réalisée par électrospray (ESI), ionisation chimique (APCI) ou laser assisté par matrice (MALDI). Les ions formés sont alors séparés selon leur masse soit dans un quadripôle soumis à un courant alternatif (Q) soit selon leur temps de vol (TOF) pour ne citer que les deux technologies les plus courantes. La première technologie est moins précise sur la mesure de masse et seulement applicable à des masses faibles. Elle est aussi intrinsèquement moins sensible car nécessitant un scan des masses durant les analyses. Une fois séparés par leur taille, les ions peuvent éventuellement être redirigés vers une chambre de collision couplée à un séparateur de masse (MS^n). Ceci permet une plus grande spécificité et sensibilité d'analyse. Finalement, les ions sont comptés lors de leur impact sur un détecteur, rendant ainsi la mesure quantitative. Les chromatographies LC et GC sont les plus couramment utilisées. La résolution de la LC (même en UHPLC) est cependant nettement inférieure à celle de la GC (Kell 2004). Mais la LC permet de quantifier précisément des métabolites primaires nécessitant en GC une dérivation chimique qui ne permet qu'une quantification relative. Elle n'est de même pas limitée à l'analyse des substances volatiles ou pouvant l'être par action de la chaleur ou la dérivation. Contrairement à la GC, elle ne nécessite

pas de porter les échantillons à haute température pour les volatiliser avant analyse. Elle est donc plus à même d'analyser des substances thermo-sensibles.

Les optimisations récemment apportées aux outils de spectrométrie de masse ont permis une nette avancée dans l'étude du métabolome. Ces derniers sont devenus plus sensibles, largement automatisés, et reproductibles, permettant ainsi de traiter un large jeu d'échantillons biologiques (Mungur *et al.* 2005). Des bases de données MS se sont développées et grâce à des travaux collaboratifs de différents laboratoires de recherche, ces databases sont agrémentées au fil des années et des découvertes (Fiehn *et al.* 2000; Brown *et al.* 2009). L'utilisation de la MS ou de la RMN (jusque-là utilisée prioritairement pour l'identification et la quantification métabolique) est largement discutée dans la revue de Viant et Sommer (2013) pour des problématiques environnementales. Selon eux, même si les bases de données utilisées pour l'annotation sont encore à incrémenter, l'utilisation de MS pour ces problématiques, peu importe l'approche utilisée, est la plus efficace de nos jours et peut-être utilisée en routine dans les laboratoires.

La LC-ESI-MS est plus sujette aux effets de co-suppression d'ions car moins résolutive. Ceci a été largement étudié et induit une perte d'information (Annesley 2003). Cet effet néfaste pour les analyses peut être dû à la présence de sels ou de certains métabolites ou protéines endogènes. L'ionisation préférentielle d'une substance par rapport à une autre quand co-présentes dans la source ionisante conduit à l'absence d'ionisation de la substance la plus soluble. Ce biais peut être réduit par certains moyens (filtration de l'échantillon, utilisation de pré-colonne, tris par classes de polarité) mais reste inhérent à la chromatographie liquide couplée à des méthodes d'ionisation 'douces'. La détection par RMN (résonance magnétique nucléaire) ne présente pas cette limitation et permet donc une quantification précise de toutes les substances. La quantité de matériel biologique nécessaire reste néanmoins assez importante et la sensibilité de ces instruments est bien inférieure à celle de la MS.

3.5. Chromatographie gazeuse et dérivation chimique

Chaque technique d'analyse par chromatographie apparaît donc comme ayant ses avantages, ses points forts, ses faiblesses et ses limites. C'est à ce niveau que l'expérimentateur intervient pour faire la meilleure adéquation entre les substances à analyser et la méthode d'analyse. La problématique demande donc à l'expérimentateur de prendre de la hauteur au début d'un projet afin de déterminer l'outil d'analyse.

Dans cette étude, l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse a été déterminée comme l'outil le plus adapté. C'est l'outil le plus sensible. Il est donc adapté à nos faibles volumes de sève ascendante ou masses de racines et feuilles. Il permet notamment l'analyse de plantes individuelles le plus souvent. Les pics sont fins (bonne résolution qui est au moins 10 fois supérieure aux techniques LC les plus résolutives), permettant une analyse plus globale du métabolome. L'inconvénient principal de cette méthode est qu'elle nécessite une étape préalable de dérivation chimique par triméthylsilylation (ajout d'un groupement triméthylsilyl sur les groupements –OH, COOH, $-NH_2$ des molécules). Cette étape a pour but de supprimer les H pouvant participer à des liaisons hydrogène pour rendre volatiles des métabolites qui ne le sont pas naturellement tels que des sucres, acides aminés ou encore acides organiques. La quantification sera alors uniquement relative car l'affinité pour le réactif de silylation est variable selon les différentes fonctions chimiques. Les sucres et polyols ont en effet de nombreux groupement –OH qui réagissent préférentiellement contrairement aux groupements amines ou acides carboxyliques des acides aminés. Un effet de compétition est donc possible entre les substances de l'extrait. Elle est particulièrement forte avec l'eau et des polymères de sucre (amidon, fibres de paroi) ou protéines qui doivent être éliminés au maximum avant dérivation. L'usage d'un standard interne de silylation est nécessaire.

3.6. Utilisation de standards internes

L'ajout de mix de standards marqués (^{13}C) aux échantillons avant dérivation et analyse a permis de réduire les erreurs d'identification et de quantification. Leur utilisation a parfois été contestée à cause principalement de leur instabilité et de leur comportement (notamment leur temps de rétention) variable par rapport aux métabolites étudiés (Stokvis *et al.* 2005). Mais le principal problème lié à l'utilisation d'un tel mix de standards est leur coût. Pour certains organismes dont le métabolome est assez petit (levures, bactéries), un extrait cellulaire complet de l'organisme peut être marqué puis servir de standard interne afin de réaliser des analyses (Wu *et al.* 2005). De tels extraits demandent cependant à être quantifiés préalablement à toute analyse quantitative sur des échantillons d'intérêt. L'ajout d'un seul standard interne non-radiomarqué ne permettant qu'une quantification relative (et non absolue) des métabolites est l'approche la plus utilisée car elle est souvent suffisante pour résoudre la plupart des problématiques et c'est celle que l'on a utilisée dans nos études.

3.7. Retraitement des jeux de données

Pour le retraitement des données expérimentales issues de la GC, notre choix s'est porté sur TagFinder (Luedemann *et al.* 2008). L'avantage de ce logiciel est qu'il est basé sur une

comparaison avec une base de données incrémentée de jour en jour. Les métabolites de cette base de données sont à la fois des métabolites volatiles et stables mais aussi des métabolites non-volatiles ayant subi une dérivation chimique : méthoxyamination puis trimethylsilylation au N, O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) ou N-Methyl-N(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) (MSTFA). Afin d'annoter un composé, ce logiciel permet de comparer manuellement le spectre d'un cluster de masses (après déconvolution) avec ceux de composés inscrits dans la bibliothèque et ayant un RI (retention index) proche (Luedemann *et al.* 2008). La conversion des temps de rétention, en indices de rétention est effectuée à l'aide d'une batterie de standards chimiques (*n*-alcanes) encadrant chaque substance en tout point du chromatogramme.

4. Objectifs de la thèse

Dans le contexte actuel de développement d'une agriculture agroécologique, le semis de céréales enrobées d'une souche élite de PGPR du genre *Azospirillum* est une option travaillée par de nombreux industriels qui proposent des solutions commerciales. L'objectif affiché est de conserver les rendements actuels en diminuant l'usage des engrais minéraux. De nombreux essais agronomiques à travers le monde ont en effet suggéré une augmentation potentielle par cette technologie d'ingénierie agroécologique de 15 et 27% en grains et en fourrage (Veresoglou et Menexes 2010) en l'absence de tout ajout de fertilisation azotée. Mais la réponse du végétal à *Azospirillum* semble variable selon les années. Une étude comparative menée entre 2002 et 2006 sur 297 sites de culture de blé inoculés avec *A. brasilense* a notamment montré cette variabilité dans la biomasse des parties aériennes mais aussi dans l'augmentation de rendement en grains (Díaz-Zorita et Fernández-Canigia 2009). Même si les essais menés au Brésil et au Mexique ont montré des augmentations significatives du rendement, seulement 60% des essais sur des sites en Uruguay, Inde et en Egypte atteste de cette augmentation de rendement (Okon et Labandera-Gonzalez 1994). De plus, les études menées en France sur 6 ans et 12 sites reportent seulement 5 cas d'augmentation du rendement des cultures. L'effet de l'inoculation avec *Azospirillum* sur le rendement en agriculture, et notamment dans nos climats, semble donc imprévisible selon les années ou les sites. Afin de réduire la variabilité des augmentations de rendement des céréales après inoculation par *Azospirillum*, une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement de ce phénomène est nécessaire.

Lors de ce travail, nous avons fait l'hypothèse que l'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur son hôte requiert des modifications des contenus des métabolites primaires végétaux et que les progrès

récents en métabolomique sur l'analyse du métabolisme des plantes sont suffisants pour en caractériser certains. Ce domaine a été peu exploré et il est attendu que les analyses dévoilent des substances végétales d'importance dans l'interaction et permettent d'évaluer l'impact des deux principaux concepts actuels sur le fonctionnement de l'interaction entre *Azospirillum* et son hôte. Ces concepts sont 1/ par sa faculté à minéraliser l'azote atmosphérique, solubiliser le phosphore des roches et transporter le fer grâce à ses sidérophores, *Azospirillum* améliore la nutrition de la plante 2/ par sa faculté à synthétiser des hormones végétales (notamment l'auxine IAA), ou à en détruire les précurseurs biosynthétiques (pour l'éthylène), *Azospirillum* modifie l'architecture racinaire pour permettre à la plante d'explorer un plus grand volume de sol, et donc de mieux se nourrir. Les analyses métabolomiques seront conduites sur des plantes cultivées en champ mais aussi en laboratoire où les conditions ne sont peut-être pas naturelles mais sont contrôlées et où un plus grand nombre d'essais peuvent être conduits. Une des originalités de ce travail réside dans l'usage, comme contrôle négatif, d'un cultivar de maïs ne répondant pas à l'agent microbien. Ceci permet de distinguer les variations métaboliques liées au développement d'une relation symbiotique de celles liées à la croissance d'un microorganisme de manière saprophyte sur une plante. Une deuxième originalité du travail a été de réaliser une analyse métabolomique de la sève ascendante comme vecteur de communication chimique entre racines et feuilles lors de sa croissance et de la perception de son environnement, dont l'agent bactérien ajouté.

Le travail réalisé s'articule autour de quatre questions qui seront la base des quatre chapitres de résultats :

- Quels signaux chimiques sont modifiés dans la sève ascendante pour coordonner les effets du partenaire bactérien sur les racines et les feuilles ? Une analyse du métabolome de la sève ascendante a été réalisée par GC-MS dans des conditions de culture contrôlées sur un cultivar de maïs répondant positivement à l'inoculation (Seiddi) et un ne montrant aucune réponse en contact avec l'inoculum bactérien (FuturiXX). Les expériences ont été réalisées sur de jeunes plantules de 12 jours cultivées dans des conditions contrôlées. Cette étude était très exploratoire car le contenu chimique de la sève ascendante des végétaux est peu connu.
- Quels métabolites et gènes végétaux sont affectés par la présence de la bactérie PGPR ? Des analyses du métabolome (GC-MS) et du transcriptome (RNA-Seq) des racines et feuilles ont été réalisées sur les deux mêmes cultivars que nommés ci-dessus et dans les mêmes conditions de culture.

- Quelles modifications précoces du fonctionnement du végétal par les PGPR conduisent à une modification du rendement final en grain ? Cette étude a été conduite deux années consécutives sur quatre champs de l'Isère différenciés par les paramètres physico-chimiques de leur sol ou par leurs pratiques agricoles. La capacité des semences à générer un pied adulte a été mesurée en parallèle de différents paramètres de jeunes plantules de 6 feuilles (métabolomes de feuilles et racines, morphologies des racines, tiges, et feuilles, et potentiel photosynthétique, taux de levée des semences). Des corrélations ont ensuite été réalisées pour associer les modifications par la PGPR de ces paramètres précoces à celle du rendement final en grains.
- Quel est l'impact de la présence de la PGPR sur la germination du grain ? L'étude du point ci-dessus a en effet révélé que la souche de PGPR utilisée dans cette étude impacte positivement le rendement en sécurisant la germination. Or l'impact des bactéries PGPR sur la germination des plantes a été très peu étudié. Des conditions contrôlées ont été utilisées pour réaliser une analyse temporelle fine du processus germinatif. Le métabolome des grains a ensuite été suivi par GC-MS. Des cultivars répondant (FriedriXX) et ne répondant pas (FuturiXX) à la PGPR en terme d'accélération de germination ont été utilisés.

CHAPITRE 2 : Etude des modifications du contenu chimique de la sève ascendante du maïs lors de son interaction avec *Azospirillum lipoferum* CRT1

1. Introduction

1.1 Objectif

Ce chapitre vise à analyser le contenu chimique de la sève ascendante (sève brute ou liquide xylémien) afin de tester le rôle des concepts de modification de la nutrition et balance hormonale dans l'augmentation de croissance induite chez les céréales par les rhizobactéries du genre *Azospirillum*. Ces bactéries sont en effet connues pour augmenter la surface des racines sur lesquelles elles se développent et pour, dans certains cas, augmenter la croissance des parties aériennes ou tout au moins en améliorer le fonctionnement photosynthétique (Gururani *et al.* 2012; Stefan *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2008). Si un gain de nutrition et une modification de la balance hormonale de la plante par la bactérie sont des hypothèses attrayantes pour expliquer ces effets, elles n'ont jamais été démontrées de manière directe.

La sève brute est le véhicule obligatoire utilisé par tout composé non-volatile pour se déplacer des racines aux parties aériennes. Ainsi, toutes les substances impliquées dans la nutrition azotée ou phosphorée et dans la modulation des activités de croissance, développement et défense des parties aériennes par les racines, sont véhiculées par la sève brute. Ces substances peuvent provenir des bactéries présentes sur les racines ou des tissus racinaires eux-mêmes. L'analyse du métabolome xylémien, appelé 'xylènome' dans cette étude, est donc un moyen d'appréhender d'éventuelles modifications nutritionnelles ou hormonales induites par *Azospirillum* chez son hôte. Même si une information similaire peut être obtenue en réalisant une analyse métabolique des racines et des feuilles, il nous a paru, *a priori*, que les données seraient plus faciles à interpréter sur le fluide xylèmien que sur les racines et feuilles qui sont des organes complexes constitués de nombreux tissus dont les réactions métaboliques peuvent être différentes, voire opposées, en réponse à l'agent bactérien symbiotique. Nous avons donc réalisé l'analyse métabolomique du fluide xylémien dans un premier temps, celles des racines et feuilles ayant été réalisées dans un deuxième temps (chapitre 3).

Si le potentiel informatif du contenu chimique de la sève brute est important en physiologie végétale, une telle analyse n'a que rarement été réalisée (et encore plus rarement dans le cadre de l'étude de l'interaction plante-PGPR) du fait de la difficulté à correctement collecter ce liquide. Cette étude tout à fait novatrice a donc demandé un grand nombre d'optimisations et de mises au point pour prélever la sève brute sans contamination par la sève élaborée (phloèmiène) ou par des débris cellulaires. Des optimisations ont également été nécessaires au niveau de la méthodologie d'analyse des métabolites primaires pour s'adapter aux faibles concentrations des substances organiques présentes et pour éviter des interférences liées, par exemple, aux substances de haut poids moléculaire comme les protéines.

1.2 La photosynthèse

1.2.1 Physiologie et fonctionnement chez les plantes en C4

La photosynthèse est la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Chez les plantes en C_3, la réduction du carbone atmosphérique (CO_2) est catalysée par l'enzyme Rubisco qui génère alors 2 molécules à 3 carbones de 3-phosphoglycérate. L'une d'elle est exportée du chloroplaste puis utilisée dans la synthèse de saccharose transporté dans l'ensemble de la plante (Sonnewald *et al.* 1994) ou peut être utilisé pour la synthèse de l'amidon**.** L'autre molécule de 3-phosphoglycérate est recyclée par le cycle de Calvin en substrat de Rubisco grâce à l'ATP et le NADPH générés par les centres réactionnels des thylakoïdes. Mais la Rubisco possède également une activité oxygénase qui entre directement en compétition avec la fixation du CO_2 par fixation alternative de l'O_2. Les produits formés sont alors recyclés en 3-phosphoglycérate et CO_2 par diverses activités enzymatiques présentes dans les peroxysomes et mitochondries, un phénomène appelé photorespiration. L'activité photorespiratoire est donc en compétition directe avec la photosynthèse (Wingler *et al.* 2000)**.** Alors que chez les plantes en C_3 un accroissement de température augmente la limitation de la photosynthèse par la photorespiration, les plantes en C_4 possèdent une adaptation métabolique leur permettant de contourner ce facteur limitant et de survivre en milieu aride et sous de faibles précipitations. En effet, même en cas de sécheresse importante, le taux de photorespiration reste assez faible chez les plantes en C_4 (Carmo-Silva *et al.* 2008)**.** La photosynthèse en C_4 provient d'au moins 66 origines évolutives différentes. C'est le phénomène le plus convergent dans l'évolution des plantes (Sage *et al.* 2012). Deux types de cellules photosynthétiques coexistent chez les plantes en C_4 : les cellules de la gaine périvasculaire d'une part et celles du mésophylle, ce qui crée une compartimentation particulière de la photosynthèse (Hatch 1987; Furbank et Hatch 1987)**.** Le CO_2 est, dans un premier temps, fixé dans le cytosol des cellules du mésophylle par la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPc) qui forme une molécule à 4 carbones : l'oxaloacétate converti en malate ou en aspartate. Une isoforme particulière de la PEPc est produite chez les plantes en C_4. Elle est beaucoup plus efficace dans la fixation du CO_2 que celle des plantes en C_3 (Stockhaus *et al.* 1997)**.** La phase initiale de carboxylation a lieu dans les cellules du mésophylle alors que la phase de décarboxylation a lieu dans les cellules de la gaine périvasculaire (Chang *et al.* 2012)**.** Une pompe biochimique à CO_2 va permettre de concentrer le CO_2 au niveau de la Rubisco située au niveau des cellules de la gaine périvasculaire et séparée des cellules du mésophylle par une lamella imperméable au CO_2. La concentration en CO_2 est estimée être environ 6 fois supérieure à la concentration atmosphérique (Kiirats *et al.* 2002). Comme la concentration en O_2 reste inchangée, l'activité oxygénase de la Rubisco est diminuée

par rapport à l'activité carboxylase et la photorespiration est moins active. Le cycle de Calvin a ensuite lieu dans les chloroplastes de la gaine périvasculaire. Les photosystèmes I et II des cellules du mésophylle et de la gaine périvasculaire différent de par leurs phosphorylation, teneur en complexe pigment/protéine et émission de fluorescence qui leur sont spécifiques (Romanowska *et al.* 2006). La concentration du CO_2 et son assimilation par les plantes en C_4 sont fortement affectées par la qualité de lumière (intensité, longueur d'onde) (Sun *et al.* 2014). Les plantes en C_4 ont donc subi des remodelages génétiques importants afin d'augmenter l'efficacité du fonctionnement de la photosynthèse (Leegood 2002, Figure 2.1).

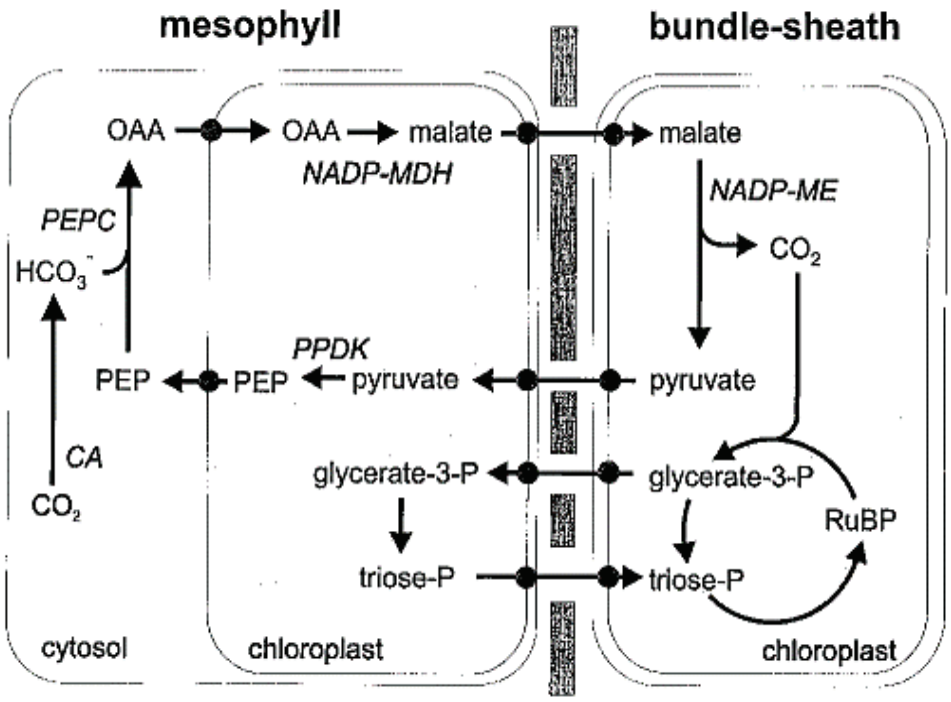


Figure 2.1: Méchanisme de concentration du CO_2 chez les plantes en C4 (d'après Leegood *et al.* 2002).

La PEP carboxylase (PEPC) fixe le bicarbonate au niveau du cytosol du mésophylle (généré du CO_2 par une anhydrase carbonique (CA)) et produit de l'oxaloacétate (OAA). L'OAA est réduit en malate dans le chloroplaste du mésophylle. Le malate est ensuite transporté dans la gaine périvasculaire par un plasmodesme et décarboxylé dans les chloroplastes de la gaine périvasculaire par l'enzyme malique à NADP (NADP-ME). Le CO_2 produit est fixé par la Rubisco dans le cycle de Benson-Calvin. La PEP est régénérée à partir du pyruvate via la pyruvate Pi dikinase (PPDK) dans les chloroplastes mesophyllien. Le glycérate-3-phosphate issu du cycle de Benson-Calvin est transporté dans le mésophylle pour être réduit en triose-phosphate.

1.2.2 Modifications du rendement photosynthétique en cas de stress

La photosynthèse est fortement affectée par les facteurs environnementaux. Certains, comme la lumière et la concentration en CO_2, en sont les substrats directs. D'autres comme la température agissent sur les cinétiques enzymatiques. Mais la relativement faible efficacité catalytique de Rubisco et des systèmes de fixation de la lumière ainsi que la grande diversité des systèmes protéiques nécessaires font que la majorité des protéines, des cofacteurs et minéraux d'une plante sont mobilisés par les activités directes et indirectes de la photosynthèse. Toute carence nutritive la ralentira donc. Et comme les photosynthétats sont un élément essentiel de la croissance végétale, tout élément de stress abiotiques (salin, hydrique) ou biotiques (pathogènes) ralentissant la croissance induira une rétro-inhibition des activités de photoconversion chimique. La photosynthèse constitue donc un indicateur de choix des niveaux de stress et de nutrition de la plante (Ashraf et Harris 2013). La quantité de pigments, l'état de fonctionnement des photosystèmes, de la chaîne de transport des électrons, ou encore de la réduction du CO_2 sont des indicateurs de l'efficacité de la photosynthèse. Lors de l'inoculation avec des PGPR, une augmentation de la quantité de plusieurs pigments (chlorophylle *a*, *b* et des auxiliaires de pigments photoprotecteurs telles que la violaxanthine, zéaxanthine, antéroxanthine, lutéine, néoxanthine et β-carotène) a été mise en évidence (Bashan *et al.* 2006). Le rapport Fv/Fm fait état du rendement quantique de conversion photochimique du photosystème II. Il permet de démontrer la présence de stress lumineux, salins, hydriques mais aussi une carence en nutriments, même s'il n'est pas nutriment-spécifique (Kromkamp *et al.* 2008). Le stress hydrique reste le plus étudié. La valeur optimale de Fv/Fm chez un maïs non, ou peu, stressé est d'environ 0.83 et elle baisse en cas de stress (Demmig et Björkman 1987). D'un cultivar à l'autre, cette valeur varie légèrement (Liu *et al.* 2012). En cas de stress hydrique, plusieurs phases se succèdent dans la photosynthèse : une première où la saturation en CO_2 des plantes en C_4 permet à la photosynthèse de rester stable, une seconde où s'alternent fermeture et ouverture des stomates et une dernière où les stomates se ferment complètement (Ghannoum 2009). Cette dernière phase provoque un déclin de l'activité photosynthétique, la saturation en CO_2 touchant à sa fin. Un réarrangement des photosystèmes a été mis en évidence lors de différents stress abiotiques comme c'est le cas des plantes capables de réaliser la photoinhibition afin d'éliminer les ROS (Reactive Oxygen Species), ou de moduler la synthèse des protéines et des pigments des photosystèmes (Mattoo *et al.* 1999; Choudhury et Behera 2001; Andersson *et al.* 2003).

Le métabolisme des sucres joue un rôle important sur l'efficacité et la régulation de la photosynthèse (Pego *et al.* 2000; Rook et Bevan 2003). Lorsque la concentration en produits finaux issus de la photosynthèse est trop élevée, des mécanismes de stockage au niveau des feuilles (amidon, hexose, saccharose) sont mis en place de même qu'un rétrocontrôle de la photosynthèse (Goldschmidt et Huber 1992; Paul et Pellny 2003). Il a été mis en évidence que des PGPR du genre *Bacillus* induisaient une augmentation de la photosynthèse par une régulation des signaux endogènes de sucres et la modulation de la voie de l'ABA chez *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.* 2008).

1.2.3 Optimisation de l'activité photosynthétique

En agronomie, un lien a été rapidement établi entre l'efficacité photosynthétique et le rendement. En effet, une activité photosynthétique élevée est corrélée positivement à un rendement élevé (Ainsworth et Long 2005). Le profil métabolique et les activités enzymatiques liés au cycle de Calvin-Benson ont notamment été analysés afin de définir des biomarqueurs (ici meilleure utilisation du carbone et investissement dans la photosynthèse) corrélés à l'augmentation de la biomasse chez l'Arabette (Sulpice *et al.* 2010). Il est connu que les plantes, notamment les plantes en C_4, ont la capacité de moduler leur photosynthèse, *i.e.* de modifier les voies métaboliques associées et le partitionnement des transporteurs en fonction des conditions environnementales (Stitt et Quick 1989; Szecowka *et al.* 2013). Etant donnée la nécessité actuelle d'augmenter les rendements agricoles afin de palier à la croissance continuelle de la population, l'Homme a tenté d'utiliser à ces fins la capacité des plantes à pouvoir modifier leur activité photosynthétique. Son optimisation est devenue un challenge biotechnologique (Long *et al.* 2015). Chez les cyanobactéries, un mécanisme de concentration du dioxyde de carbone permet d'augmenter l'efficacité photosynthétique. La Rubisco, enzyme constituant l'étape limitante du cycle de Calvin au sein des carboxysomes est donc plus efficace. Des travaux ont été menés afin de remplacer chez le tabac la Rubisco végétale par celle de la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* PCC7942 (Lin *et al.* 2014; Price et Howitt 2014). Ceci a le potentiel d'augmenter de 60% l'incorporation du CO_2 chez les plantes en C_3 notamment (McGrath et Long 2014). C'est une solution imaginée pour les plantes en C_3 mais pour les cultures en général, une augmentation artificielle du taux de CO_2 atmosphérique a été testée et s'est révélée très efficace sur les plantes en C_3 et peu sur les plantes en C_4, augmentant leur efficacité photosynthétique, leur rendement et leur biomasse (Kimball *et al.* 2002).

Le lien entre l'interaction avec une PGPR et une modification de la photosynthèse a été assez peu étudié chez le maïs. Chez d'autres genres végétaux, quelques travaux font état d'une

amélioration générale du fonctionnement de la machinerie photosynthétique par les PGPR. *Burkholderia phytoformans* induit une meilleure résistance aux basses températures chez *Arabidopsis thaliana.* Il a été montré que dans ces conditions, la PGPR induisait une augmentation du contenu en pigment dans la plante et un renforcement de la paroi cellulaire (Su *et al.* 2015). Une augmentation du contenu en pigments photosynthétiques (chlorophylle *a* et *b* mais aussi pigments photoprotecteurs comme la violaxanthine, zeaxanthine, anthéroxanthine, lutéine, néoxanthine et *β*-carotène) a été mise en évidence chez les plantules de blé en interaction avec *Azospirillum brasilense* Cd (Bashan *et al.* 2006). Un mélange de trois genres PGPR (*Rhizobium*, *Azobacter* et *Azospirillum*) a de même démontré son efficacité en cas de stress hydrique en augmentant notamment le contenu en chlorophylle mais aussi en diminuant l'accumulation de proline associée à la sécheresse (Abbasi *et al.* 2013). Cette augmentation de la teneur en chlorophylle par les PGPR est un phénomène démontré dans plusieurs études où il a été relié à une incorporation plus importante de N, P et K par les plantules inoculées (Heidari *et al.* 2011; Islam *et al.* 2014; Vafadar *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2008). Mais le lien entre la présence d'une PGPR et une augmentation du rendement quantique maximum de conversion photochimique du photosystème II (Fv/Fm) n'a été que rarement établi (Samaniego-Gámez *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2008). Chez le maïs, il a été montré que le champignon mycorhizien *Glomus intraradices* stimulait l'activité du photosystème II et la conductance stomatique lors de stress salin (Estrada *et al.* 2013). Mais il semblerait que ce soit la seule étude sur le maïs qui montre une modification dans l'activité des photosystèmes II par un organisme symbiotique. Les mécanismes permettant à des microorganismes au contact des racines de moduler l'activité des photosystèmes foliaires sont cependant inconnus.

1.3 Communication racines-feuilles : le xylème

1.3.1 Anatomie des vaisseaux conducteurs

Les végétaux possèdent deux types de vaisseaux conducteurs : le phloème et le xylème. Le phloème, constitué de cellules vivantes, va acheminer la sève élaborée contenant photosynthétats et molécules de signalisation et de défenses vers les zones en croissance de la plante (fruit, racines, méristèmes) (Turgeon et Wolf 2009). La sève brute, quant à elle composée en grande partie d'eau et de sels minéraux, est transportée dans les cellules mortes du xylème (Engels *et al.* 1992). Chez les gymnospermes, la sève brute n'est acheminée que par des trachéides, forme de conduction primitive de la sève constituée par des cellules minces et allongées (Hacke *et al.* 2004). Ces cellules présentent de nombreuses ponctuations et ne dérivent que d'une seule cellule cambiale (Thornber et Northcote 1961). Les vaisseaux

conducteurs du xylème des Angiospermes contiennent en plus des structures multicellulaires organisées par empilement de nombreux éléments de vaisseaux communiquant entre eux par des perforations (lyse de la paroi), un élément anatomique qui joue un rôle important dans les échanges gazeux, l'efficacité d'utilisation de l'eau et les capacités de croissance des plantes (Bacelar *et al.* 2007). La structure d'un vaisseau de xylème peut donc être assimilée à un capillaire creux, rigide, mais limité à chaque extrémité par des parois transversales non perforées. Le passage de la sève brute de vaisseau à vaisseau doit alors s'effectuer au travers de la paroi *via* des structures spécialisées, les ponctuations, zones amincies où seule la paroi primaire partiellement hydrolysée et poreuse permet le passage de la sève brute (Shane *et al.* 2000). Le diamètre des pores peut varier de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres (Fichot *et al.* 2009). Chez les différentes espèces de végétaux, la longueur des vaisseaux est variable. Néanmoins elle est toujours corrélée positivement au diamètre et reste en lien avec la vulnérabilité des plantes à la cavitation (Kolb et Sperry 1999).

Les communications entre vaisseaux permettent de faire face à des phénomènes qui réduisent ou bloquent entièrement l'ascension de l'eau par le xylème comme l'embolie, l'abscission de certaines parties de la plante ou la destruction des vaisseaux par des herbivores (Wahl et Ryser 2000). De même, dans des conditions de sécheresse ou de gel, la tension de vapeur saturante, reliée à la température de la sève, peut augmenter au sein des vaisseaux et donner lieu à des phénomènes de cavitation (Nardini *et al.* 2011). Dans le xylème, l'eau est sous tension et doit demeurer liquide bien en dessous de sa tension de vapeur, elle est donc en général sous forme métastable et peut changer rapidement d'état lors de stress abiotiques (Hacke et Sperry 2001). Le liquide xylémien contient, à faible dose, certains gaz dissous (dioxyde de carbone, oxygène, azote) et lorsque la tension du liquide augmente, ces gaz peuvent s'échapper, formant des bulles microscopiques à l'interface entre le liquide et la paroi. Une poche de gaz peut ainsi se former et créer une embolie empêchant l'ascension de la sève brute (Maherali *et al.* 2006). Il devient donc nécessaire lors d'essais visant à étudier le transport de molécules dans la sève brute de contrôler les conditions de culture afin d'éviter ce phénomène. Une diminution évolutive du diamètre des vaisseaux conducteurs a permis de faire face à ce phénomène (Lovisolo et Schubert 1998). Un lien pourrait exister entre le remplissage des vaisseaux de xylème après un phénomène de cavitation et le flux de sève élaborée induite dans les vaisseaux de phloème (Salleo *et al.* 2004). Une interaction entre xylème et phloème semble donc exister.

1.3.2 Mécanisme de transport des éléments dans le xylème

Dans le cas du transport *via* les vaisseaux de xylème, les molécules sont récupérées au niveau des racines qui assurent la prospection, un processus d'exploration et d'exploitation du sol environnant (Doussan *et al.* 2003). Ces molécules sont par la suite véhiculées vers les parties aériennes de la plante où elles pourront exercer leur effet biologique. S'il s'agit de molécules apoplastiques, la circulation se fait par les interstices des parois cellulaires jusqu'à l'endoderme dont la traversée ne peut être que symplastique pour atteindre le cylindre central où se trouvent les cellules mortes du xylème. L'apoplasme constitue la partie non vivante de la plante (Edgington 1981) et les molécules peuvent y être transportées à longue distance de manière passive. L'acidification de la rhizosphère et de l'apoplasme racinaire permet un meilleur transport apoplastique des composés (Freundl *et al.* 1998). La capacité d'une molécule à être assimilée par la plante et transportée des racines vers les feuilles est aussi largement liée à sa nature. En effet des composés organiques polaires non-chargés, et ayant une forte solubilité dans l'eau, seront plus facilement transportés dans les vaisseaux de xylème (Dettenmaier *et al.* 2009). Au cours et à l'issue de leur transport, les molécules pourront traverser le parenchyme très fin du xylème et réaliser des échanges très rapides avec les tissus environnants, les concentrations au sein de la sève brute fluctuent donc très rapidement (Metzner *et al.* 2010). Dans le cas d'une interaction plantes/micro-organismes (symbiotique ou pathogène), des molécules signales systémiques vont circuler à partir du lieu de contact avec le micro-organisme vers le lieu d'action de la molécule (parties aériennes par exemple) *via* la sève brute (Belimov *et al.* 2009). Le xylème est le lieu de transit des messages provenant de la rhizosphère et induisant une réponse systémique de la plante. Afin de permettre leur transport, ces molécules sont souvent conjuguées (Hansen et Dörffling 1999; Sauter *et al.* 2002). Il a été récemment montré que de nombreux mécanismes permettaient de moduler les connections des vaisseaux conducteurs afin de protéger la plante contre d'éventuels pathogènes pénétrant dans les vaisseaux à la recherche d'éléments nutritifs (sucres notamment) (Melnyk 2017).

1.3.3 Composition de la sève brute

La sève brute est constituée de différents éléments chimiques solubles en quantités variables : éléments minéraux (nitrate, traces de cuivre, zinc, manganèse, fer, calcium, potassium, magnésium, sodium) mais aussi acides aminés, acides organiques, sucres et protéines (López-Millán *et al.* 2000). Les fonctionnements photosynthétiques sont différents selon la forme d'azote apportée aux parties aériennes par les racines : le rendement photosynthétique est en effet plus important chez les plantes 'nourries' au NO_3^- que celles 'nourries' par du NH_4^+. Le transport du NH_4^+ a d'ailleurs été fortement discuté car de très faibles concentrations de NH_4^+

ont été mesurées dans la sève (Cramer et Lewis 1993). Mais la présence de NH_4^+ serait due à une interaction de ce dernier avec d'autres métabolites (acides aminés et amines) (Schjoerring *et al.* 2002). Chez le maïs, il a été montré que selon la forme dans laquelle l'azote est apporté (nitrate ou ammonium), la plante arrivait à adapter les mécanismes d'assimilation et de transport dans la sève (Ivanko et Ingversen 1971). De fortes corrélations entre les concentrations en malate, calcium, magnésium et le pH ont été montrées dans la sève brute du hêtre (Schell 1997).

Les acides aminés sont quant à eux transportés à la fois par le xylème et le phloème (Youssefi *et al.* 2000). Environ 80% des teneurs en acides aminés du phloème correspondent à de l'acide aspartique, thréonine, sérine, glutamine, glycine, alanine, valine, et lysine (Ohshima *et al.* 1990). Dans la sève brute, près de 76% des teneurs en acides aminés sont dues à la glutamine et la glycine. Une quantité minoritaire de sérine, thréonine, valine et d'autres acides aminés est de même présente (Alvarez *et al.* 2008). Certains acides aminés sont principalement responsables du transport de l'azote dans la sève : glycine, asparagine et acide aspartique (Grassi *et al.* 2002).

Il a été montré très tôt que des sucres et acides organiques (malique et citrique) circulent dans la sève brute (Hardy et Possingham 1969). La concentration moyenne en sucre total mesurée dans la sève brute de plusieurs espèces correspond à 0.1 mM soit environ 1.2% des composés analysés (Andersen *et al.* 1989). Les principaux sucres et dérivés identifiés dans la sève brute restent le glucose, le galactose, le *myo*-inositol, l'arabinose, le mannose et l'acide galacturonique (Iwai *et al.* 2003). Le *myo*-inositol, retrouvé en quantité importante dans le xylème, est impliqué dans le stockage et la conjugaison avec les auxines, le stockage du phosphore et est une source de biosynthèse des résidus uronosyl et pentosyl de pectine et d'hémicellulose (Gillaspy *et al.* 1995; Loewus et Murthy 2000). Il pourrait donc avoir un rôle important dans la relation d'association avec des PGPR. Des arabinolactane, glucane et galacturonane ont aussi été mis en évidence dans la sève brute, ces oligosaccharides jouant de nombreux rôles dans la plante (réponses de défense, contrôle de l'organogenèse) (Satoh 2006, Figure 2.2). Chez le maïs, le ratio entre éléments carbonés (sucres : acides aminés : acides organiques) a été évalué à 44 : 6 : 50 par Canny et Mccully (1988). Cette étude a de même mis en évidence qu'entre les racines d'une même plante, il existait une forte hétérogénéité dans la composition de la sève brute. Il est notamment possible que ceci soit lié au caractère non-répétable du processus de prélèvement, que nous développerons dans la partie suivante.

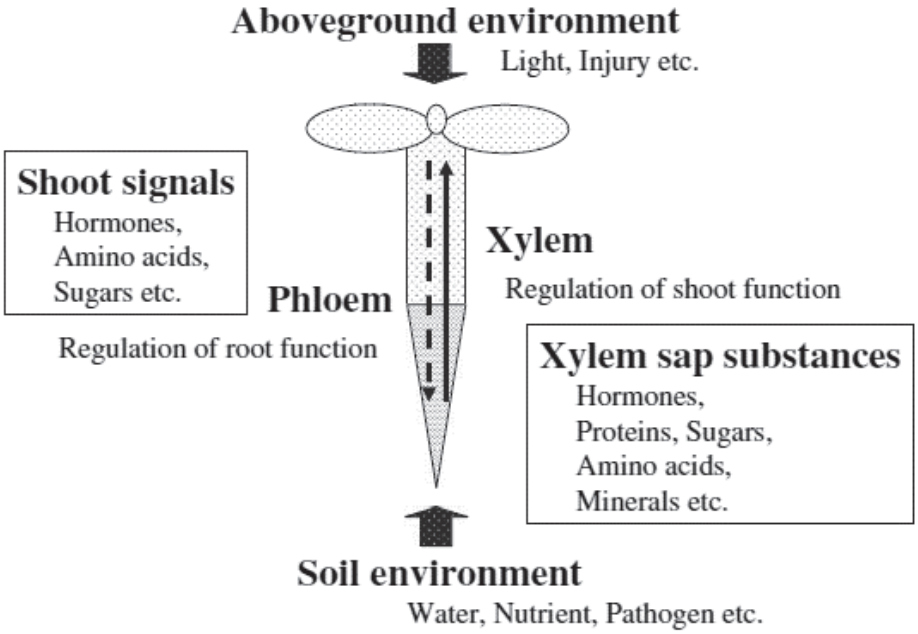


Fig. 3. Hypothetical model of interaction between root and shoot via vascular bundle. Production and transportation of xylem sap organic and inorganic substances in roots are controlled by soil environment as well as shoot-derived signals produced and transported in response to the above-ground environment. Some shoot-derived signals, except for auxin, may translocate in phloem

Figure 2.2: Modèle hypothétique de l'interaction entre les racines et les feuilles par les faisceaux vasculaires (d'après Satoh 2006).

La présence de phytohormones a été mise en évidence dans la sève brute, principalement l'acide abscissique (ABA) et les cytokinines (zeatines, isopentenyl adenine, dihydrozeatine, et leurs ribosides) (Dong *et al.* 2008). Les auxines et cytokinines, mais aussi les gibbérellines et l'ABA sont aussi connus pour être transportés dans les vaisseaux de phloème (Hoad 1995). Dans le cas des cytokinines, certaines n'ont été détectées que dans le xylème de par leur spécificité d'action tel que l'IPA (isopentényladénine) et d'autres en concentrations beaucoup plus élevées dans le xylème que dans le phloème, c'est le cas de la zeatine riboside (Baker 2000). Une forte concentration en CO_2 dans l'air et basse concentration en nitrate dans le sol provoqueraient une augmentation de concentration en zeatine dans la sève brute chez le cotonnier (Yong *et al.* 2000).

1.3.4 Modifications métaboliques de la sève brute lors de stress et interactions symbiotiques

Même si l'étude des protéines est en général réalisée sur le phloème (Kehr 2006), il a été montré que certains types de protéines étaient présentes dans le xylème (Kehr *et al.* 2005)**.** C'est le cas des protéines produites en réponse à une agression par un pathogène (pathogenesis-related protein) (Rep *et al.* 2004). Des protéines en concentrations variables (peroxydases, protéines de transfert des lipides, chitinases…) ont été identifiées dans des plantes en bonne santé mais surtout en proie à l'attaque de pathogènes (Buhtz *et al.* 2004). Lors d'un traitement avec des

éliciteurs du pathogène *Phytophthora sojae* par exemple, une augmentation des serine protéases et peroxydases est observée dans la sève brute (Subramanian *et al.* 2009).

En cas de stress abiotiques, des molécules signales sont transportées des racines jusqu'aux parties aériennes par les vaisseaux de xylème (Schachtman et Goodger 2008). Lors de stress hydriques, on observe chez le maïs une augmentation de concentration en ABA, cytokinine mais aussi en certains phenylpropanoides (acides coumarique, férulique, caféique) qui serait la conséquence d'une diminution de la biosynthèse de lignine (Alvarez *et al.* 2008; Korovetska *et al.* 2014). L'ABA est pour sa part un régulateur clé de la conductance stomatique. Sa production au niveau des racines et son augmentation de concentration dans la sève brute permettent la fermeture très rapide des stomates en réponse à un manque d'eau (Davies *et al.* 2000). Ce phénomène permet ainsi la croissance et l'élongation de la plante même dans des conditions délétères pour cette dernière (Sharp *et al.* 1994). Patonnier *et al.* (1999) a aussi montré une augmentation de la teneur en malate et en mannitol, deux produits terminaux de la photosynthèse. Il démontre que le malate est, de même que l'ABA, fortement impliqué dans le contrôle de la fermeture des stomates. Un stress hydrique induit également une diminution rapide de concentration en nitrate, ammonium, phosphate dans le xylème puis une diminution de la teneur en potassium (Bahrun *et al.* 2002). Lors d'un stress salin, la concentration en acides aminés (glutamine en particulier) est fortement diminuée alors qu'une accumulation d'enzymes impliquées dans la différenciation du xylème et dans la lignification (cysteine proteinases, peroxydases acides…) est observée (Fernandez-Garcia *et al.* 2011).

Une carence nutritionnelle en azote, phosphate ou potassium de la plante peut aussi être à l'origine d'une augmentation de concentration en acides aminés (glutamine), acides organiques (citrate, malate, shikimate) et sucres solubles dans la sève brute mais aussi de GABA (acide γ-aminobutyrique) (Sung *et al.* 2015).

Le pH de la sève brute semble aussi être corrélé au statut hydrique de la plante (Gollan *et al.* 1992). Lors d'un stress hydrique, une augmentation de pH de la sève brute a été observée (0.2 unité après 1 jour de non-arrosage) (Bahrun *et al.* 2002). Une augmentation artificielle du pH au niveau de la sève induirait d'ailleurs la fermeture des stomates et inhiberait la croissance foliaire, imitant ainsi les effets d'un stress hydrique (Bacon *et al.* 1998).

Le métabolome des racines et des exsudats racinaires lors d'interactions plante/PGPR a été décrit dans de nombreuses études (Barthes *et al.* 1996 ; Bais *et al.* 2006 ; Walker 2012 ; Vacheron *et al.* 2013). Les modifications métaboliques des feuilles et de la sève brute associées

à cette coopération sont par contre rares (feuilles), voire absentes (sève ascendante) de la littérature et elles se limitent en général aux métabolites secondaires, phytohormones, ou éléments minéraux nutritifs de base et sucres (Tomczyk 2002; Orhan *et al.* 2006; Fernandez *et al.* 2012; Cohen *et al.* 2015)**.** Lors d'un autre type d'interaction bénéfique, il a été montré chez le haricot mycorhizé que l'augmentation de la conductance stomatique était fortement liée à une diminution de concentration de l'ABA circulant dans la sève ascendante et donc du stress ressenti par la plante (Ebel *et al.* 1995). Des études de la communication racines/feuilles lors d'interactions plante/PGPR ont aussi ciblé les VOCs (volatil organic compound) (Farag *et al.* 2013)**.** La difficulté de prélèvement de la sève reste une barrière importante à son investigation métabolique. Avant donc d'investiguer les modifications métaboliques de la sève, il faut que les systèmes de prélèvement et d'analyse soient fiables et répétables.

1.3.5 Prélèvement de la sève brute

Il est possible de prélever la sève brute en utilisant la simple pression racinaire. Cette méthode a été largement utilisée afin d'étudier la concentration en ABA dans la sève brute. La pression racinaire est en effet directement reliée à l'ouverture stomatique (Zhang et Davies 1990 ; Bahrun *et al.* 2002). Si le volume de sève prélevé est faible, l'exsudation de plantules étêtées peut être doublée par ajout de KCl dans le milieu de culture de plantules de maïs et fortement augmentée par ajout de composés azotés tels que le nitrate, l'ammonium et la glutamine (Barthes *et al.* 1996)**.** Néanmoins, ce prélèvement à pression racinaire pose un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord ce type de prélèvement concentre les éléments chimiques composants la sève brute (Else *et al.* 1995; Schurr et Schulze 1995) car il y a une accumulation de sève au niveau de la tige coupée. Ensuite, elle nécessite un temps de récolte assez important (2-3 h) qui fait que la concentration de chaque molécule devient dépendante du temps de récolte (Bowling *et al.* 1985; Jeschke et Pate 1991; Liang et Zhang 1997). De même, on observe une contamination plus importante par des débris cellulaires et par la sève élaborée (phloème) (Passioura 1988).

La chambre à pression de type Scholander est un outil conçu à l'origine pour mesurer le potentiel hydrique de la plante au niveau de la tige ou des feuilles (Scholander *et al.* 1965; Sobeih *et al.* 2004)**.** Une pression croissante est appliquée au niveau d'une feuille coupée et lorsque cette dernière est égale au potentiel hydrique de la plantule, une goutte de sève brute apparaît au niveau de la coupure (Miller 1985; Liang et Zhang 1997). Cette utilisation a été détournée afin d'effectuer le prélèvement de la sève brute. Dans un premier temps, le but était de faire pression sur les racines afin de faire ressortir la sève brute au niveau de la tige

préalablement coupée au-dessus du mésocotyle. Mais il a été mis en évidence que l'application d'une pression trop forte faisait exsuder un liquide dont les constituants sont plus dilués dans la sève physiologique par augmentation artificielle du flux de sève même si cela permettait de récolter un volume plus important de sève. A l'inverse, une pression trop faible appliquée au niveau des racines concentre les métabolites présents dans le liquide exsudé (Goodger *et al.* 2005 ; Rothwell et Dodd 2014). L'important est donc d'appliquer au niveau des racines une pression juste suffisante pour induire au niveau de la zone découpée un flux de sève égal à celui qui existait avant découpe. En pratique, si une jeune plantule de maïs est découpée au-dessus de son mésocotyle, il faut appliquer au système racinaire une pression égale à la pression hydrique mesurée sur la feuille en croissance. La pression à appliquer sera donc très variable et dépendante du végétal étudié et des conditions de culture. En effet, comme le système racinaire est introduit avec sa motte de terre dans la chambre de Scholander, la nature du sol, sa teneur en eau et la structure du réseau racinaire affecteront la pression hydrique de la feuille en croissance et donc la pression à appliquer aux racines et le flux de sortie de la sève. Cette méthodologie a permis à certaines équipes d'étudier notamment des métabolites spécifiques présents dans la sève brute (Garvin *et al.* 2015). Par exemple, les variations de concentrations de l'ABA ont été étudiées par prélèvement de la sève brute *via* la chambre de Scholander dans des conditions physiologiques (Netting *et al.* 2012) et après incorporation d'ABA marqué, ^{3}H-ABA, ajouté à l'eau d'arrosage (Jia et Zhang 1999). Deux autres méthodes proches de la chambre à pression de type Scholander ont été décrites par Alexou et Peuke (2013), notamment la pressurisation de la rhizosphère grâce à la chambre à pression de Passioura est une méthode manuelle ou sur batterie de pressurisation à l'aide d'une pompe à vide. Le principe de ces deux techniques reste le même que celui de la chambre à pression de type Scholander. La chambre de Passioura va pressuriser l'ensemble de la rhizosphère et nécessite la construction et l'utilisation de pots spécifiques s'insérant dans la chambre. La plante entière peut être utilisée de par l'ouverture en deux du couvercle, dans lequel s'insère la tige. La collecte de sève peut ainsi être réalisée au niveau des veines de la feuille. Le principal verrou de la pompe à vide est que, si elle est utilisée manuellement, elle ne fonctionnera pas de manière homogène durant une longue période. Son avantage est qu'elle est plus facile à transporter que les chambres à pression.

1.4 Démarche expérimentale

La démarche expérimentale a consisté à faire une analyse comparative de deux cultivars de maïs répondant différemment à l'agent bactérien *A. lipoferum* CRT1. Le cultivar Seiddi

(Caussade Semences) a été sélectionné pour sa capacité à développer une plus grande surface racinaire et un meilleur rendement quantique maximum de conversion photochimique (Fv/Fm) 11 jours après semis avec *A. lipoferum* CRT1. Le cultivar FuturiXX (RAGT) a été sélectionné car il ne présente aucune de ces deux modifications. Ainsi, il nous sera possible de distinguer les métabolites végétaux dont la teneur est spécifiquement affectée lors de la réponse symbiotique à *A. lipoferum* CRT1 par opposition à ceux dont la teneur est modifiée par la simple croissance saprophytique de ces bactéries à la surface de ses racines.

Dans un premier temps, l'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur la morphologie et la conversion photochimique a été caractérisé sur les cultivars Seiddi et FuturiXX. Des échantillons de sève brute ont ensuite été récoltés sur ces deux cultivars en utilisant la chambre à pression de Scholander dans des situations d'inoculation bactérienne et de non-inoculation. Il a été vérifié que les modifications d'architecture racinaire induites par l'agent bactérien n'ont pas introduit de biais dans la récolte des échantillons de sève. Finalement, une analyse métabolomique par GC-TOF-MS a été réalisée. Toutes les cultures ont été réalisées dans des conditions contrôlées d'enceinte climatique en maintenant les sols à une humidité équivalente à la CAPAC (capacité au champ) pour limiter tout stress additionnel.

Ayant réalisé lors de cette première étude qu'aucune hormone n'était détectée dans nos échantillons, les mêmes types d'échantillons ont été ré-analysés avec un autre appareillage GC-MS (GC-APCI-Q-TOF) mieux adapté à l'analyse de substances peu abondantes (comme les hormones) noyées dans un bruit de fond important (généré par la source d'ions dans le MS). La méthode d'ionisation est cette fois-ci 'douce' en APCI pour générer moins de fragmentation des substances à analyser que la méthode plus classique d'impact électronique (IE) utilisée précédemment. Ceci génère des entités ionisées de masse plus élevée et donc plus spécifiques des substances recherchées. L'analyseur de masse est cette fois-ci un double analyseur d'ion MS/MS (Q-TOF) qui permet de diminuer les ions parasites du bruit de fond sans pour autant supprimer les ions des substances recherchées. Lors des analyses précédentes, un simple analyseur TOF avait été utilisé. L'appareillage utilisé lors de ce deuxième round d'analyses offre une des meilleures résolutions et sensibilités disponibles sur le marché. Les résultats ont été obtenus très récemment et seront donc traités dans un deuxième volet ci-dessous.

2. Matériel et méthodes

2.1 Inoculation, culture, prélèvement de la sève ascendante et analyses métaboliques par GC-MS

Voir article 'Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1' *Rozier C, Erban A, Hamzaoui J, Prigent-Combaret C, Comte G, et al. (2016)* Metabolomics (Los Angel) 6:182. doi:10.4172/2153-0769.1000182

2.2 Analyses spécifique d'hormones par GC/APCI-Q-TOF-MS

La culture des plantes, le prélèvement des échantillons de sève et la dérivation chimique ont été réalisés tels que décrits dans Rozier *et al.* 2016. La calibration et le calcul des indices de rétention ont été effectués grâce à un mix d'alcanes. La GC (Agilent 6890N24) est couplée à un spectromètre de masse (Brucker impact II - Brucker Daltonik GmbH, Brême, Allemagne) ayant une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et un analyseur d'ion de type Q-TOF. L'annotation et le retraitement ont été ensuite réalisés à l'aide de différents logiciels : Hystar Version 3.2, otof-Control Version 4.0.21.1960 et Profile Analysis Version 2.2 (Brucker Daltonik GmbH, Brême, Allemagne). L'acquisition des spectres a été faite en mode positif avec une fréquence de scan de 20 Hz et une fourchette de masse de 50 à 1500 *m/z*. L'annotation des métabolites est basée sur les temps d'élution théoriques calculés à partir des indices de rétention de la Golm Metabolom Database. Parallèlement, les spectres APCI (en mode positif) enregistrés ont été comparés manuellement aux spectres de référence EI et aux masses monoisotopiques des ions moléculaires protonés attendus et ions fragmentés.

3. Résultats

3.1 Analyses non-ciblées des modifications métaboliques de la sève ascendante du maïs en réponse à l'association avec la PGPR Azospirillum lipoferum CRT1

Rozier C., Erban A., Hamzaoui J., Prigent-Combaret C., Comte G., Kopka J., Czarnes S. and Legendre L. (2016) Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Metabolomics (Los Angel)* 6:182. doi:10.4172/2153-0769.1000182

Rozier *et al.* Metabolomics (Los Angel) 2016, 6:3

Metabolomics: Open Access

DOI: 10.4172/2153-0769.1000182

Research Article **Open Access**

Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, Azospirillum lipoferum CRT1

Camille Rozier[1]*, Alexander Erban[2], Jihane Hamzaoui[1], Claire Prigent-Combaret[1], Gilles Comte[1], Joachim Kopka[2], Sonia Czarnes[1] and Laurent Legendre[1]

[1]*CNRS, Microbial Ecology, Université de Lyon, Lyon, France*

[2]*Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Am Muehlenberg 1, D-14476 Golm, Germany*

Abstract

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) enhances host plant growth and tolerance to biotic and abiotic stresses. Despite increased knowledge of their functional activities, reports of their impact on host metabolism and signalling networks are rare. In this study, small organic substances were analysed in the ascending xylem sap of maize plantlets that were inoculated with the PGPR *Azospirillum lipoferum*. In this feasibility study, xylem sap collection using a Scholander chamber was combined with metabolome analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) based profiling. Two genotypes of maize were investigated. Cultivar Seiddi displayed *A. lipoferum*-mediated increases in lateral root growth and enhanced photosynthetic potential unlike non-responsive cultivar FuturiXX. A total of 119 small organic substances were annotated in maize xylem sap. The content of 17 substances, including primary metabolites, such as sucrose, maltose, glucose, TCA cycle intermediates, amino acids, GABA and shikimate pathway metabolites, decreased in both cultivars after *A. lipoferum* inoculation and may thus reflect general effects of the maize-*A. lipoferum* interaction. The content of 28 additional substances, namely glucose, lactic acid, acidic intermediates of the pentose phosphate and ascorbate/aldarate pathways and defense-related hydroxycinnamic acids, specifically changed in the xylem sap of the *A. lipoferum*-phytostimulated cultivar Seiddi, therefore, suggesting that phytostimulation of maize by *A. lipoferum* may involve xylem-transported metabolic signalling. Glucose or other metabolites that are retrograde transported through the xylem to the shoot by transpirational pull may act as feedback signals of the root status. Such signals may stimulate leaves to enhance photosynthesis-mediated C-assimilation that is needed to sustain *A. lipoferum*-triggered root growth. The untargeted metabolome analysis of the xylem, i.e., the xylenome, indicates that the differential interactions of the two maize cultivars Seiddi and FuturiXX with *Azospirillum lipoferum* could represent a feasible system for the study of the role of xylem transported signals in plant/ PGPR interactions.

Keywords: *Azospirillum*; Glucose signalling; Metabolite profiling; PGPR; Photosynthesis; Root-to-shoot communication; Xylem sap

Introduction

Inoculation of crop seeds with symbiotic bacteria has recently become a promising source of technologies to sustain plant productivity under reduced mineral nutrition and enhanced climatic havoc [1]. Among the many Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), some engage in a mutualistic relationship whereby the interaction is intimate, mostly obligate, and leads to the development of specialized plant structures such as nodules [2]. Though very efficient for nitrogen fixation, these interactions are a rarity in the plant kingdom as they concern few plant families like the Fabaceae, Casuarinaceae and Betulaceae, and few bacterial genera such as *Frankia*, *Rhizobium*, and related genera [2]. In most other cases, symbiotic plant-bacteria associations are merely cooperative. They are called associative symbioses, involve less obligate and specific relationships and concern diverse genera mostly from the Firmicute and Proteobacteria [3]. They rarely live as endophytes in the root cortex but colonize discrete spots on the surface of plant roots where they efficiently compete with other rhizosphere-associated microorganisms for the abundant and energy-rich exudates that ooze from plant roots [3]. Associative symbiotic bacteria promote better plant growth and health through direct and indirect mechanisms [4]. Among them, members of the genus *Azospirillum* have attracted particular attention for fieldapplications as growth-stimulators because of their innocuousness towards humans, and the environment, and because of their capacity to stimulate the growth of cereal crops [5]. A meta-analysis of field inoculation experiments of wheat conducted between 1981 and 2008 notably revealed their capacity to enhance grain and forage yields by 14 and 27%, respectively, (n=91 field trials) in the absence of nitrogen fertilization [6]. Yield enhancements were lowered in the presence of mineral fertilization and were not further boosted by co-inoculation with the nitrogen-fixing PGPR genus *Azotobacter* [6]. Though most *Azospirillum* isolates are equipped with a functional dinitrogen-fixing *nifH* gene, its contribution to host plant growth has been the subject of debate and is thought to be, at best, minor [7]. It is accepted that *Azospirillum* stimulates plant growth by secreting auxin type plant hormones and, in a few cases cytokinins, and gibberellins, to alter root system architecture and physiology and as a consequence, plant ability to access soil water and minerals [4,7].

Increased nutrient sourcing and root function will positively feedback to increase growth of above ground parts. So far, indirect lines of evidence suggest that PGPR may affect aerial plant parts also independently of nutritional effects. The biocontrol agent *Bacillus* improved photochemical conversion in *Solanum tuberosum* and tolerance to salt, drought or heavy metals stresses [8]. PGPR produced cytokinins were found to increase host plant leaf cytokinin concentration in parallel to growth increases of this organ. Root inoculation with *P. fluorescens* was shown to Induce Systemic Resistance (ISR) in *Arabidopsis thaliana* and

***Corresponding author:** Rozier C, CNRS, Microbial Ecology, Université de Lyon, INRA, UMR1418, Villeurbanne, Lyon, France, Villeurbanne, France, Tel: 0033750600583; E-mail: camille.rozier@univ-lyon1.fr

Received July 07, 2016; **Accepted** July 26, 2016; **Published** July 29, 2016

Citation: Rozier C, Erban A, Hamzaoui J, Prigent-Combaret C, Comte G, *et al.* (2016) Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. Metabolomics (Los Angel) 6: 182. doi:10.4172/2153-0769.1000182

Copyright: © 2016 Rozier C, *et al.* This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

boosted tolerance to both root and leaf pathogens including *P. syringae* [9]. Accordingly, several plant defence hormones, such as nitric oxide and Abscisic Acid (ABA) which concentrations are modulated by several PGPR in plant roots, are also known to regulate plant defence gene expression both locally and at a distance (systemically) via their ability to activate plant ISR [10]. Nevertheless, studies showing direct modulation of root to shoot signalling molecules by PGPR in host plants are still missing.

In most known cases, roots communicate with shoots via soluble mineral and small organic substances carried by the up-moving xylem sap [11,12]. Nevertheless, upward transport in phloem vessels has recently been observed for larger organic substances such as mRNAs and proteins [13]. Research in xylem sap mediated transport has been slow because of the difficulty to obtain xylem sap samples devoid of phloem, or other cellular contaminants. Contamination is typically unavoidable unless sap movement is forced either by pressurizing the root surface or by depressurizing the collect site on the shoot [14]. In addition, the speed of xylem sap outflow was found to affect its constitution [15]. These shortcomings can be avoided by applying to the roots a pressure equal to the water potential of a growing leaf in a Scholander pressure chamber in order to force xylem sap to flow at physiological speed [16]. In most xylem sap metabolite studies, only targeted metabolites were analysed such as ions and hormones [17-20], phenylpropanoids or amino acids, sugars and organic acids [21,22]. So far, only one study has employed global metabolomic analyses to characterize the impact of iron deficiency on xylem sap metabolite profile [23] so that, to date, xylem sap metabolite content still remains insufficiently characterized.

In this study, we used up-to-date metabolomic tools to conduct an analysis of xylem sap metabolites during plant-PGPR interactions using the commercial PGPR strain *A. lipoferum* CRT1 and maize as a plant model system [24]. Two genotypes of maize that exhibit differential growth responses to *A. lipoferum* CRT1 were chosen to highlight single metabolite, or differential patterns of metabolites that are either associated with *A. lipoferum* colonization of maize roots or with growth-promotion and associated shoot physiological changes.

Materials and Methods

Bacterial culture

Inoculation assays were carried out using the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 (Fages and Mulard) according to a previously published protocol with the following modifications [25,26]. A total of 15 µL of bacterial glycerol stock solution was spread on a solid medium (5.75 g Nutrient Agar and 2 g NaCl, in 250 ml) and left to grow for 4 d at 28°C. A single colony was selected and subjected to pre-culture and culture at 28°C under mild agitation (200 rpm) in Nitrogen-free broth supplemented with 1/40 (v/v) LB medium and 0.5% biotin (50 mg in 50 mL NaOH 0.1N) [27,28]. After a first centrifugation (10 min, 3800 rpm) bacterial cells were washed with sterile UP water, centrifuged again and resuspended in 20 mL sterile UP water. The adequacy of the bacterial suspension was first evaluated by PCR with the *A. lipoferum* CRT1specific primers F1676-Q1 (5'-ATCCCGGTGGACAAAGTGGA-3') and 1837-Q2 (5'-GGTGCTGAAGGTGGAGAACTG-3') [29]. Then, the proper mobility and the absence of contaminants were checked with light microscopy. The bacterial suspension was diluted

to a concentration of 1.10^7 cells/mL with sterile UP water and immediately used to inoculate maize seeds.

Seed inoculation

Seeds of the maize (*Zea mays* subsp. *mays* L.) genotypes FuturiXX (RAGT) and Seiddi (Caussade-Semences) that had similar mass (between 0.3609 and 0.3780 g) and shape were selected in order to reduce growth heterogeneity. Bacterial inoculation was performed at room temperature by depositing a 50 µL drop of the diluted bacterial suspension on each side of the maize seed. Mock-inoculated, control, seeds were treated similarly except that the bacterial suspension was replaced by UP water. This operation was repeated three times at 1 h intervals. During this process, seeds were stored in the dark and laid flat on a filter paper dampened with UP sterile water and enclosed in a plastic petri dish. They were then left undisturbed at room temperature in such a setup for an additional 9 h before sowing.

Maize cultivation

Top soil (5-30 cm below the surface) from a commercial maize luvisol field was sampled at Sérézin de la Tour (Isère, France) in early spring 2015 and sieved (<4 mm) upon harvest. It had a clay-loam texture devoid of limestone and consisted of 26.9% sand, 38.3% loam and 34.7% clay with 324.9 g of water per kg of soil at field water holding capacity. Organic matter content was 54.3 g/kg and Cation Exchange Capacity (CEC) was 228 meq/Kg. pH (water) was equal to 7.05 and pH (KCl) was 6.28. Sieved soil was introduced into pots (160 mm high and 60 mm diameter) at a density of 1.2 $g.cm^{-3}$ at soil water holding capacity. Soil water content was adjusted to its field water holding capacity (32.49% humidity) and immediately used for plant cultivation.

Inoculated and control seeds were sown about 0.5 cm below the soil surface and placed in a growth chamber at constant air humidity (60% RH), lightning (16/8 h light/dark cycle and 815 $\mu mol.m^{-2}$ photon density) and temperature (24°C). Soil water content was adjusted daily for each individual pot to maintain them at field water holding capacity. The entire experiment was repeated 4 times successively to generate 4 independent biological replicates.

Photosynthesis efficiency and chlorophyll content measurements

After 11 d of culture, chlorophyll fluorescence of the second leaf (most recent mature leaf) was measured about one third down from the leaf tip with a portable photosynthesis yield analyzer (Mini-PAMII, Walz, Germany) equipped with the clip holder 2035-B. For this, maize plantlets were first adapted to darkness for 30 min. Then the maximal Fluorescence (Fm) was measured at 20 kHz with a 1 s pulse of 6000 $\mu mol\ photon.m^{-2}s^{-1}$ of 'white light'. F0 was measured in parallel with a pulse of dark red light that activated PSII reaction centres only via the excitation of PSI. The maximum quantum efficiency of PSII primary photochemical conversion (Fv/Fm with Fv =Fm-F0) was finally calculated. Chlorophyll content was estimated in parallel on the same leaf with a handheld Chlorophyll meter (Konica Minolta SPAD-502 Plus). Values are expressed in single-photon avalanche diode units (SPAD units).

Xylem sap sampling

After 12 d of culture, the xylem sap of a single maize plantlet was sampled for each condition [15]. Briefly, the water potential of the third (growing) leaf was measured with a Scholander pressure chamber (M3000 model adapted with a linear slit, Soil Moisture Equipment Corp., Goleta, CA,

USA). Each plantlet stem was then topped through the coleoptile, about 3 cm above the mesocotyl (i.e., above the starting point of nodal roots). Stump cuts were immediately washed with distilled water and blotted dry with an absorbent Whatman paper twice to remove cell debris and potential phloem sap contaminants. Stumps were then introduced in the pressure cylinder of the Scholander pressure chamber adapted with a round slit. A pressure corresponding to the measured leaf water potential was applied to the root system during 30 min and xylem sap was harvested with a 100 µL glass syringe. Right after harvest, xylem sap was frozen in liquid nitrogen to inactivate enzymatic reactions and kept at -80°C until metabolite analyses were performed.

Shoot and root systems morphology analyses

When xylem sap sampling was over, stumps were unpotted and non-adherent soil gently removed from roots with finger taps and running water. Root morphological parameters were recorded with a scanner (Expression 1680, Epson) controlled by the WinRhizo software (Regent Instruments Inc., Québec, Canada). Recorded parameters included total cumulative root length (cm), average root diameter (mm), number of root tips, crossings and total root surface (cm^2). Roots and shoots were then dried (24 h, 110°C) and weighted.

Metabolite-profiling analysis

Seventy µL of frozen sap was thawed on ice, swiftly mixed with 10 µL of ribitol (1 mg/mL in methanol) and filtered through centrifugal filter units (Amicon Ultra-0.5mL 10K) to eliminate large molecular weight substances that may interfere with later silylation reactions and to remove residual enzymes that may change sap composition. Filtrates were frozen and dried in a Speed Vacuum concentrator. Ribitol was selected as an internal standard for this study according to [30,31]. Dried sap samples were mixed with 40 µL of methoxyamine hydrochlorid (40 mg Ml^{-1} in pyridine) and incubated for 1.5 h at 30°C. Then, 70 µL of BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) and 10 µL of an C_{10}, C_{12}, C_{15}, C_{18}, C_{19}, C_{22}, C_{28}, C_{32}, and C_{36} n-alkane mixture was added for retention index calibration [32]. The mixture was subsequently incubated for additional 30 min at 37°C to complete the reaction. Sample aliquots of 1 µL were injected in splitless mode using an Agilent 6890 injector system set to 250°C. Initial oven temperature was maintained at 70°C for 1 min, then raised to 350°C at 9°C s^{-1} and kept at 350°C for 5 min. All samples were run on a gas chromatography-electron impact ionization-time of flight/mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) instrument with an Agilent 6890N gas chromatograph and a LECO Pegasus III TOF mass spectrometer using the manufacturer's ChromaTOF software for acquisition and baseline correction (versions 2.32; LECO, St. Joseph, MI, USA). Data processing and peak identity annotation was manually performed using the TagFinder visualisation tool for mass spectral matching of time groups and clusters [33]. Mass spectral features were matched to the mass spectra and retention time indices of authenticated reference metabolites from the Golm Metabolome Database, http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/ [34]. Criteria for manually supervised metabolite annotation were the presence of at least 3 specific mass fragments per compound and a retention index deviation <1.0% [35].

Multivariate statistical analyses

Detector responses, i.e., baseline corrected peak height of arbitrary units, were normalized by the response of the

internal standard. For each compound, normalized responses were expressed as present of the maximum value obtained in the data set that consisted of 4 independent biological replicates of 4 experimental conditions, namely 2 maize cultivars either inoculated or mock-inoculated. For each biological replicate, metabolite percentages were divided by the mean value of the 4 (mock-inoculated and inoculated) plantlets of the replicate. This later step suppressed variability among biological replicates. Then, statistics were done on the normalized data to compare the 4 treatment groups using the 4 biological replicates.

All statistical analyses were carried out with the open source software R with the RV Aidememoire, mixOmics and ade4 packages (downloaded on March 2016) [36]. Non-parametric two-by-two Wilcoxon mean comparison tests were conducted to judge significances of mean differences in metabolite content between inoculated and mock-inoculated conditions for each cultivar. Significant threshold was fixed at 0.05, but substances with a significant level above 0.1 were also recorded and quoted as tendency of difference.

Results

Morphological and physiological modifications of maize root and shoot by *A. lipoferum* CRT1

Inoculation of the maize cultivar Seiddi with *A. lipoferum* CRT1 had a strong effect on its root system architecture. The treatment almost doubled the root biomass of 12 d old plantlets (Figure 1A) caused mainly by an increase of the cumulative length of all roots (Figure 1B) with mean total root lengths of 213.7 ± 5.5 cm and 280.5 ± 14.0 cm (p-value=0.0294, Wilcoxon test) for mock-inoculated and inoculated plants, respectively. This increase in cumulative root length was linked to a greater number of secondary roots on the radicle and lateral seminal roots, resulting in a higher number of root tips and, thus, generated an increase of total root surface. In contrast, inoculation of the maize cultivar FuturiXX had no impact on root biomass (Figure 1A) and root system architecture (Figure 1B).

Despite similar root biomass, mock-inoculated 12 d old plantlets of Seiddi and FuturiXX differed in shoot biomass (Figures 1A and 1C). This difference did not stem from differences in leaf length but from increased width of Seiddi leaves (data not shown). Mean photosynthetic efficiency of the youngest mature leaf, i.e., the second leaf from stem base, of the maize cultivar FuturiXX was also 35% higher than the one of Seiddi under mock-inoculated conditions (Figure 1D). Inoculation of both cultivars with *A. lipoferum* CRT1 did not affect shoot biomass (Figure 1C) but enhanced the photosynthetic efficiency of the maize cultivar Seiddi by ca. 30% while leaving this parameter unaffected in the other cultivar, FuturiXX (Figure 1D). Chlorophyll content of plant leaves an indicator of nutritional status, and more specifically of nitrogen content, was estimated photometrically and yielded values that were similar for all 4 treatment groups with 29.40 ± 4.17 SPAD units and 35.31 ± 1.97 SPAD units for mock-inoculated FuturiXX and Seiddi, respectively, and 35.54 ± 5.46 SPAD units and 37.98 ± 4.61 SPAD units for inoculated FuturiXX and Seiddi [37]. **Impact of *A. lipoferum* CRT1 on maize leaf water potential and stem xylem sap flow**

Because xylem sap flow speed at the wound harvest site is known to affect metabolite content in the collected fluid leaf water potential that drives xylem sap upward and xylem sap harvest speed were monitored in all sampled plants [15]. As shown on Figure 2A, the water potential of the

growing, and largest leaf, namely the third leaf from the stem base, was similar in all sampled plants regardless of their genotype and inoculation status. A mean water potential of 1.2 ± 0.02 bars was calculated (n=16). Similarly, no significant difference in xylem sap harvested volumes was observed after 30 min of sap harvest among the plants we sampled, regardless of the genotype of inoculation treatment (Figure 2B), with a mean harvest volume of 2.95 ± 0.08 µL.min^{-1}. All in all, these results demonstrate that any observed difference in metabolite contents in the harvested saps will reflect physiological differences and not sampling-related differences depending on harvest conditions.

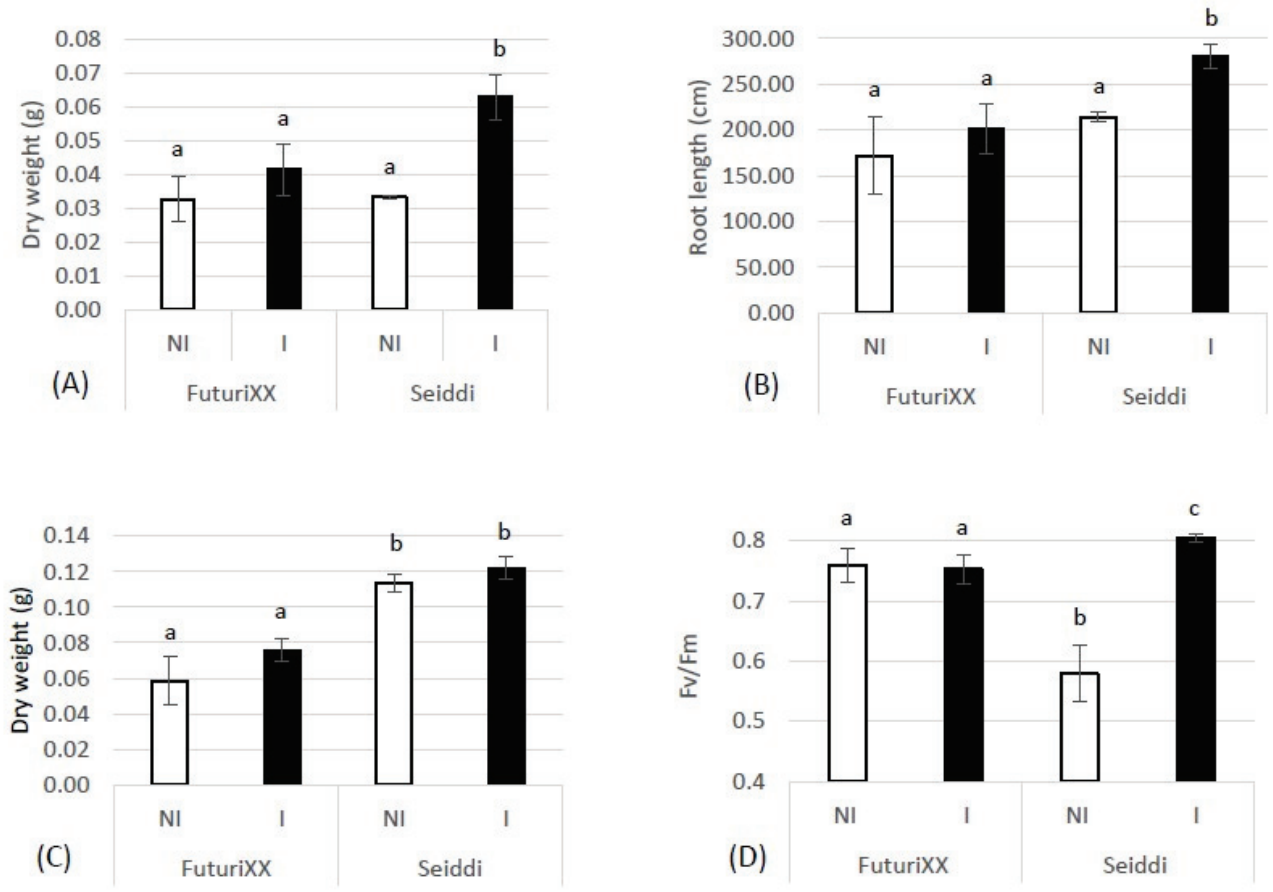


Figure 1: PGPR-induced physiological changes in maize. Root biomass (A), cumulative total root length (B), shoot biomass (C) and photosynthesis efficiency of the last mature leaf (D) were measured on two maize genotypes, FuturiXX and Seiddi, which were mock-inoculated (NI-white bars) or inoculated (I-black bars) with *Azospirillum lipoferum* CRT1. Results are expressed as mean ± SE (n=4 biological replicates). Statistical tests (Kruskall-Wallis non-parametric ANOVA and two-by-two Wilcoxon tests) were conducted to determine significant differences (p-value <0.05) among the 4 treatment levels and are indicated with the letters a, b and c.

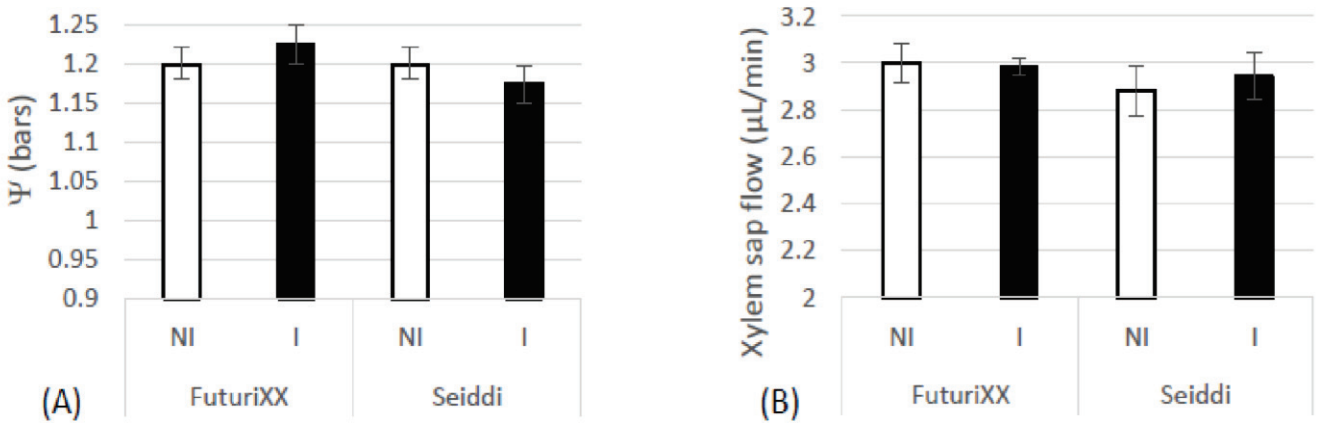


Figure 2: Third leaf water potential (A) and sap harvest volume rate (B) were measured on two 12 d old maize genotypes, FuturiXX and Seiddi, which were mock-inoculated (NI-white bars) or inoculated (I-black bars) with *Azospirillum lipoferum* CRT1. Data represent means ± SE, n=4 biological replicates. Non-parametric Kruskall-Wallis ANOVA did not reveal any significant difference among treatments (p>0.05).

Maize xylem sap metabolite content changes upon inoculation with *A. lipoferum* CRT1

A total of 119 metabolites were detected among all maize xylem sap samples, including 24 linked to amino acid metabolism, 22 sugars or other carbohydrates, 6 belonging to the ascorbate or aldarate metabolism, 8 TCA cycle components, 2 urea cycle metabolites, 6 polyols, 7 phenolic compounds and 2 purine or pyrimidine metabolites (Table 1; Table S1, supplemental section). Only a subset of 104 metabolites was detected in FuturiXX, whereas all were found in Seiddi. Similarly, mock-inoculated and inoculated plantlets yielded similar sets of metabolites so that potential differences among the four treatment groups were quantitative rather than qualitative. These differences could be separated into 4 responses classes according to metabolite response patterns across all sampled xylem conditions.

The first response class contained 28 substances that specifically displayed a tendency of difference at p<0.1, and for 15 substances significant at p<0.05, content decreases in Seiddi xylem sap upon inoculation with *A. lipoferum* CRT1 (Table 1A). This group comprised carbohydrates such as glucose and its dimers sophorose and gentobiose, acids of the pentose phosphate pathway, TCA cycle or ascorbate/aldarate metabolism, phenylpropanoids, and cadaverine. These are linked to the root growth and leaf photosynthesis-enhancing activity of the PGPR *A. lipoferum* CRT1.

Two other response classes grouped 28 metabolites that displayed a tendency of difference at p<0.1), and for 18 of them significant (p<0.05), content changes that were unrelated to root growth and photosynthetic enhancement. The largest contained substances which content changes were significant in both cultivars xylem sap, and therefore represented a general response of maize to *A. lipoferum* CRT1 (Table 1B). This group included carbohydrates such as sucrose, maltose, fructose and mannose, the glycolytic intermediate pyruvic acid, TCA cycle intermediates, alanine and acidic amino acids and some of their metabolites, shikimate pathway metabolites, *myo*inositol, GABA and triethanolamine. Few metabolites were found that were decreased solely in the PGPR-irresponsive cultivar FuturiXX (only 3 if significance level was lowered to p<0.05 (Table 1C).

Finally, 63 annotated substances displayed no significant (p>0.1) change upon inoculation with *A. lipoferum* CRT1 (Table S1, supplemental section) in the xylem sap of either cultivar. These included most of the detected polyols, benzoic acid derivatives, amino acid, amino acid-related metabolites, nucleotide bases and nucleotide base-related metabolites.

Discussion

Azospirillum lipoferum CRT1 phytostimulatory activity on maize

The PGPR genus *Azospirillum* contains more than fifteen species that modify root system architecture, stimulate shoot growth and enhance host tolerance to abiotic stresses [7]. The strain of *A. lipoferum* that was used in this study stimulates lateral root emergence and growth under greenhouse and European field conditions where grain and forage yields are raised [38,39]. The present study further reveals that lateral root growth stimulation is visible as early as 12 d after sowing. It occurred in the absence of visible shoot growth enhancement in agreement with earlier hypotheses that *A. lipoferum* stimulates shoot growth as a secondary consequence of improved nutrition caused, in part, by a more developed root system [7,4]. In the present study, the plants were likely at an early developmental stage and which root growth was already induced but the secondary impact on shoot growth was not yet apparent. Preceding differential growth, *A. lipoferum* already induced physiological changes in shoots as evidenced by enhanced photosynthetic efficiency of the youngest mature leaf.

Enhancement of leaf photosynthetic activity has been observed in numerous plant-PGPR experimental systems. For example, photosynthetic efficiency and chlorophyll content were enhanced in *Arabidopsis* plants inoculated with *Bacillus subtilis* GB03 [40]. However, most studies were conducted under drought conditions where maximum quantum efficiency (Fv/Fm) is strongly impaired and where PGPR help plants cope with their stress [3,4,41]. PGPRinduced improvements of photosystem efficiency may therefore reflect a lowering of the plant stress level. Alternatively, PGPR-mediated improvement of plant nutrition will positively impact photosynthesis by allowing leaves to produce greater amounts of photosynthetic pigments as observed in wheat plantlets inoculated with *A. brasilense* and correct impairments of photochemical conversion due to potential nutrient deficiencies [42,43]. In this study, the photosynthetic efficiency of mature maize leaves was enhanced by *A. lipoferum* CRT1 in the absence of any obvious abiotic stress or nutrient impairment. Indeed, soil water was not a limiting factor because it was kept at field holding capacity. Minerals may also not have been limiting because xylem sap phosphate levels and mature leaf chlorophyll contents, an indicator of leaf nitrogen content, were found to be unaffected by PGPR inoculation. In the control, PGPR-irresponsive maize cultivar, photosynthetic efficiency was also at a value that is indicative of optimum growth conditions for maize [37,44]. In conclusion, *A. lipoferum* CRT1-mediated enhancement of photosynthetic efficiency preceded growth enhancement and likely occurred independently of improved mineral nutrition or stress alleviation.

Maize xylem sap content

Currently, the most established role of xylem sap is the transfer of root-absorbed water and minerals from roots to aerial parts through what is thought to be a hollow, dead, system of xylem cells [45]. This movement is passive and requires no energy input as it is driven by a low water

pressure gradient generated by water evaporation mostly at leaf stomata. Nevertheless, proteomic analyses have unveiled the presence of numerous polypeptides in xylem sap. The postulated main function of these polypeptides is to thicken and/or remodel xylem cell walls [21]. Targeted and non-targeted metabolomic analyses have established that xylem sap also contains a wide range of small, water soluble, organic substances. These include many primary metabolites such as polyols and simple sugars, amino acids and organic acids [21,22,23,26,46-50]. Xylem transported metabolites also include plant hormones [18,20] and secondary metabolites that are part of the shikimate pathway and respective downstream products such as phenylpropanoids and benzoic acids [21,23]. The present analysis confirms the presence of most of the previously seen primary, and secondary, metabolites and expands their list in all metabolite classes with notably the organic acids glycolate, lactate and phosphate and with various primary metabolites biosynthetic intermediates. Careful elimination of contaminations and modifications through the sampling process was conducted. We could not confirm the presence of the plant hormones abscisic acid (ABA) and zeatin in the upwards directed xylem stream but we report for the first time the presence of γ-aminobutyric acid (GABA), a stress response signal over long distances in plants [51,52]. Its concentration was found to decrease in this study in agreement with the alleged stress-alleviating properties of this group of PGPR on plants [5]. The

N B : Les nuances de gris du tableau 1 de l'article ne sont pas apparues lors de l'édition de l'article. Malgré tous nos efforts afin de faire corriger cette erreur, cette dernière est encore présente dans l'article. Ci-dessus, vous trouverez le tableau d'origine.

(A) Metabolic pathways	Metabolic variation I vs. NI (%)	
	FuturiXX[a]	Seiddi[a]
Sugars Metabolism[b]		
Sugar dimers		
Sophorose	7,4 ± 14,55	-42,8 ± 4,55
Gentiobiose	1,3 ± 3,9	-37,5 ± 7,6
Galactose		
Tagatose	-12,8 ± 2,2	-45,2 ± 8,2
Pentose phosphate		
Gluconic acid	-14 ± 9,15	-39,6 ± 5,6
Glycolic acid	-7,8 ± 9,35	-29,6 ± 4,65
Glycolysis + neoglucogenesis		
Lactic acid	-28,2 ± 9,65	-48,8 ± 5,8
Glucose	-7,4 ± 10,6	-33 ± 5,75
Ascorbate and Aldarate Metabolism[b]		
Arabinonic acid	12,5 ± 6,05	-47,6 ± 3,3
Threonic acid	15,2 ± 19,35	-31 ± 7,55
Galactaric acid	9,7 ± 18,95	-25,3 ± 6,8
TCA Cycle[b]		
Glutaric acid, 2-oxo-	-14,5 ± 12,55	-27,6 ± 3,2
Itaconic acid	-14,7 ± 12,35	-25,6 ± 7,8
Amino Acids Metabolism[b]		
Lysine		
Cadaverine	-36,1 ± 7	-43,1 ± 5,6
Lysine	-12,3 ± 11,05	31,3 ± 10,7
Cysteine, Methionine		
Methionine	-5 ± 16,15	29,8 ± 12,4
Arginine, Proline		
Ornithine-1,5-lactam	1,3 ± 12,65	35,9 ± 9,3
Phenolic Compounds[b]		
Ferulic acid, trans-	NA	-26,6 ± 4,05
Cinnamic acid, 4 hydroxy-	-3,5 ± 9,75	-25,2 ± 5,3
Benzoic acid, 4-hydroxy-	NA	-29 ± 6,25
Purine and Pyrimidine Metabolism[b]		
Uracil	14,7 ± 18,9	-16,4 ± 4,5
Isopentylamine	-16,9 ± 8,45	-36,3 ± 10,1
Butanoic acid, 2,4-dihydıoxy-	-3,1 ± 7,5	-24,8 ± 8,95

Unknown Compounds[b]		
A214003	-6,1 ± 9,8	-30,2 ± 3,75
A213001	0,3 ± 9,8	-29,1 ± 3,9
A252002	-13,5 ± 8,85	-37,8 ± 3,95
A217004	3409,1 ± 1562,75	-24,6 ± 23,25
A170001	14,9 ± 21,7	-19,9 ± 5,7
Unknown compound-013	5,1 ± 4,4	-14,9 ± 4,1
(B) Metabolic pathways	Metabolic variation I vs. NI (%)	
	FuturiXX[a]	Seiddi[a]
Sugars Metabolism[b]		
Starch + sucrose		
Maltose	-43,7 ± 4,55	-41,3 ± 8,35
Sucrose	-11,2 ± 2,6	-10,4 ± 2,05
Fructose + mannose		
Mannose	-28,2 ± 8,25	-25,4 ± 4,8
Fructose	-15 ± 4,3	-25,1 ± 3,6
Galactose		
Galactinol	-43 ± 5,5	-53,2 ± 7,1
Glycolysis + neoglucogenesis		
Pyruvic acid	-28,9 ± 2,95	-40,5 ± 2,6
TCA Cycle[b]		
Malic acid	-56,7 ± 7,1	-30,3 ± 7,3
Succinic acid	-56,5 ± 3,1	-30,8 ± 7
Amino Acids Metabolism[b]		
Alanine, Aspartic acid, Glutamate		
Butanoic acid, 4-amino-	-30 ± 6,75	-26 ± 3,95
Aspartic acid	-28,5 ± 7,7	-20 ± 2,95
Alanine	-23,1 ± 7,75	-15,8 ± 3,8
Glutamic acid	-24,5 ± 5,65	-18,3 ± 4,55
Cysteine, Methionine		
Serine, O-acetyl-	-18,4 ± 3,95	31,5 ± 6,65
Aromatic amino acids		
Shikimic acid	-43,9 ± 5	-37,5 ± 4,4
Quinic acid	-44,2 ± 5,15	-35,2 ± 6
Polyols[b]		
Inositol, myo-	-26,4 ± 4,9	-10,9 ± 4,25
Other Pathway Metabolites[b]		
Triethanolamine	-24,4 ± 1,85	-64,3 ± 4,4

(C) Metabolic pathways	Metabolic variation I vs. NI (%)	
	FuturiXX[a]	Seiddi[a]
TCA Cycle[b]		
Aconitic acid, cis-	-34,5 ± 12,75	-18,9 ± 13,75
Fumaric acid	-40,6 ± 12,35	-17,9 ± 8,05
Amino Acids Metabolism[b]		
Alanine, Aspartic acid, Glutamate		
Pyroglutamic Acid + Glutamic Acid + Glutamine	-20,2 ± 5,25	-1,9 ± 11,7
Glycine, Serine, Threonine		
Glycine	-8 ± 1,25	-16,6 ± 5,4
Urea Cycle Metabolism[b]		
Urea	-15.1 ± 3	19,1 ± 21,2
Other Pathway Metabolites[b]		
Glycyl-phenylalanine	20.5 ± 6.1	12,6 ± 13,1
Unknown Compounds[b]		
similar to Ditertbutylphenol	11,4 ± 2,2	4 ± 2,35
A168011	-18 ± 8,5	22,7 ± 27,9
A237001	-20,7 ± 7,4	-22,1 ± 8,7
A167004	-16,3 ± 3,5	15,9 ± 19,15
A311002	-33,4 ± 6,8	-15 ± 14,7

[a]Ratios of mean values of inoculated plantlets over mock-inoculated plantlets were expressed as percentage values ± relative standard error. Wilcoxon non-parametric tests were conducted for each metabolite to compare inoculated and non-inoculated mean values in each cultivar. They are indicated as a background color (Dark grey, $p<0.05$; light grey, $p<0.1$; and white, $p>0.1$). NA indicates that the metabolite was detected in less than 2 of biological replicate samples. [b]Metabolites were classified according to KEGG's metabolic pathway database and grouped as (A) metabolites that with $p<0.1$ in Seiddi, (B) both cultivars or (C) FuturiXX. Metabolites unaffected by *A. lipoferum* CRT1 inoculation are shown in Table S1 supplemental section. Yet non-identified samples are indicated by the code of the Golm Metabolome Database.

Table 1: Percent variation of metabolite contents in the xylem sap of FuturiXX and Seiddi maize genotypes upon *A. lipoferum* CRT1 inoculation.

number of detected hormones is small given the predicted importance of xylem sap as a vehicle for root-to-shoot communication in plants, indicating that current analyses are still biased by analytical limitations, such as insufficient sensitivity and/or the fact that many hormones may be transported as conjugated forms that are not yet present in databases to allow their identification [52]. Greater effort in this area is therefore strongly needed.

Because xylem cells are not considered as metabolically active, it is likely to assume that controlled secretion and uptake by neighbouring parenchyma, protoxylem and/or sugar-rich phloem cells of the root system will enrich, or deplete, xylem sap of specific metabolites and subsequently on the path to the shoot apex (Shi *et al.* [45]). Xylem sap composition is, therefore, expected to reflect metabolite flux directions within the root though functional analyses of organic metabolite transporters in plant roots are so far limited.

Primary metabolites as a signature of the root status

Previous studies with the same PGPR strain have revealed that it expresses its phytostimulatory activity in a cultivar-specific manner in maize, a property shared with other PGPR genera [26,29,53]. Through qPCR analyses, these studies have shown that bacterial colonisation of the root system occurs at similar level, irrespective of its growth response. In agreement, this study further reveals that *A. lipoferum* triggers metabolite content decreases as a generic response of maize*Azospirillum* interaction. These were mostly simple sugars, amino acids and intermediates of starch degradation, glycolysis and TCA cycle in line with the loss of similar metabolites by roots as food contribution to their PGPR partner as exudates [54]. It is therefore hypothesized that PGPR-mediated increased organic matter exudation increases the flux of a variety of energetic metabolites towards the outside of the root at the expense of its xylem sap interior.

Additional metabolites displayed content decreases solely in the phytostimulated maize genotype. These were glucose, some of its low concentrated dimers, acidic derivatives of pentose phosphate and ascorbate/aldarate metabolisms, cadaverin and lactic acid. Their increased uptake from the xylem sap by neighbouring cell types may have been caused by PGPR-induced lateral root growth to sustain the increased metabolic needs of dividing cells with for, notably, the *de novo* synthesis of cell wall polymers like cellulose that is solely made of glucose. Although increases in exudation and cell division will both lead to the uptake of metabolites from xylem sap, these two processes may not affect similar metabolite transporters therefore explaining that they decrease the content of different sets of metabolites.

Because xylem sap moves up to the shoot, any single of its metabolites, or any pattern of multiple primary metabolites may act as a metabolic signature to retrograde signal the metabolic status and needs of the roots (sink) to the aerial (source) parts of the plant. In

concordance with the current knowledge on glucose signalling and growth inhibition, a plausible metabolic candidate signal could be glucose [55-58]. Glucose is the end product of photosynthesis transported via the phloem transport metabolite sucrose to the root system and thereby the main carbon supply and starting substrate of energy metabolism for both root and PGPR growth. However, independently of its energetic value, glucose constitutes one of the major cellular and long distance developmental signals that ensures that engagement into irreversible growth is matched by adequate supply of energy-rich C-substance and that sugar production by photosynthesis is in phase with sugar store level targets [33]. Glucose is indeed recognized by various plant cell membrane-bound and cytoplasmic proteins such as Hexokinase (HXK) that modulate the transcription of many developmental genes including some coding for biosynthetic enzymes and signalling elements of most developmental hormones such as auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and brassinosteroids [57]. Nevertheless, glucose and growth hormone signalling networks are intertwined in a way that is neither direct nor hierarchical so that it is equally possible that *Azospirillum*-induced lowered glucose levels affects hormonal signalling to stimulate growth or that *Azospirillum*-produced auxins affect plant growth and consequently glucose level in the xylem [55,58]. Additionally, glucose, as one of the primary photosynthesis products, is known to exert an inhibitory activity on photosystems photochemical conversion efficiency through direct Calvin-cycle enzyme inhibition, even from an extracellular location [59,60]. It is therefore also hypothesized that PGPR-induced xylem sap glucose content lowering led to the observed increased photosynthetic potential to enhance C-sequestration and sustain increased root biomass formation. In agreement with a proposed role of xylem sap glucose in PGPR-modulated root growth signalling and leaf photosynthesis, glucose content, and not the one of the other hexose isomers, fructose and mannose, nor of the sugar dimers maltose and saccharose, was differentially lowered in the two cultivars of this study following the *Azospirillum*-induced phytostimulatory response in maize. In a separate study lower glucose content and increased photosynthesis activity were observed in *Arabidopsis* leaves after root inoculation with the PGPR *Bacillus subtilis* [40].

Secondary metabolite signature

Xylem sap phenolic compounds also exhibited an interesting response signature after *Azospirillum* inoculation. Early biosynthetic metabolites belonging to the shikimate pathway, namely shikimic acid and quinic acid, decreased in content as a generic response to maize*Azospirillum* interaction. Nevertheless, most downstream products of the shikimate pathway such as aromatic amino acids, phenolic acid and coumarin derivatives were unaffected by *Azospirillum* inoculation. Only

phenylpropanoids were found to specifically respond in the phytostimulated maize cultivar. Because phenylpropanoids serve as building blocks for the *in situ* synthesis of monolignols and later deposition as lignin polymer in the sclerenchymatous xylem cell walls (Ferrer etal. [61]), the results of this study suggest that phytostimulation of maize by *Azospirillum* may modify the lignin content of the host plant. Such hypothesis agrees with earlier IR spectrum analyses that demonstrated modifications of the lignin over cellulose ratio in maize cell walls after *A. lipoferum* inoculation [39,61]. The fact that previous studies have shown enhancements of phenylpropanoids, or phenylpropanoid products, in both maize and rice roots after *A. lipoferum* inoculation suggests that sequestration of phenylproponoids by roots may be the cause of the decrease of shikimic acid and quinic acid in retrograde transported xylem sap [62,63].

Acknowledgements

Elise Lacroix and the greenhouse technical platform of FR BioEnviS (University Lyon 1) are thanked for plant caring and harvest.

Funding CR was supported by a fellowship from the « Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche » and the work was funded by the national research agency of France (ANR), project ANR-12-AGRO-

0008.

References

1. Tahir M, Sarwar MA (2013) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. Pak J Life Soc Sci Pak.
2. Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML, *et al.* (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J Soil Sci Plant Nutr 10: 293-319.
3. Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2012) Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? Res Microbiol 163: 500-510.
4. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moënne-Loccoz Y, et al. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Front Plant Sci 4: 356.
5. Wisniewski-Dyé FB, Drogue S, Borland C, Prigent-Combaret (2012) Azospirillum.plant interaction: from root colonization to plant growth promotion. In Beneficial Plant-Microbe Interactions: Ecology and Applications, pp: 237-269.
6. Veresoglou SD, Menexes G (2010) Impact of inoculation with Azospirillum spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science (1981-2008). Plant Soil 337: 469-480.
7. Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE (2004) Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (19972003). Can J Microbiol 50: 521-577.
8. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, et al. (2012) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Abiotic Stress Tolerance in Solanum tuberosum Through Inducing Changes in the Expression of ROS-Scavenging Enzymes and Improved Photosynthetic Performance. Jou Pla Grow Regul 32: 245-258.
9. Weller DM, Mavrodi DV, van Pelt JA, Pieterse CMJ, van Loon LC, *et al.* (2012) Induced Systemic Resistance in Arabidopsis thaliana Against Pseudomonas syringae pv tomato by 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Pseudomonas fluorescens. Phytopathol 102: 403-412.
10. Kuc J (2001) Concepts and Direction of Induced Systemic Resistance in Plants and its Application. Eur Jour Plant Pathol 107: 7-12.
11. Davies WJ, Zhang J (1991) Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42: 55-76.
12. Dodd IC (2005) Root-to-shoot signalling: Assessing the roles of "up" in the up and down world of long-distance signalling in planta. In: Lambers H, Colmer TD (eds.) Root Physiology: From Gene to Function, pp: 251-270.
13. Thieme CJ, Rojas-Triana M, Stecyk E1, Schudoma C1, Zhang W1, *et al.* (2015) Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. Nat Plants 1: 15-25.
14. Jackson M (1997) Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants. Trends Plant Sci 2: 22-28.
15. Goodger JQ, Sharp RE, Marsh EL, Schachtman DP (2005) Relationships between xylem sap constituents and leaf

conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques. J Exp Bot 56: 2389-2400.

16. Liang J, Zhang J (1997) Collection of Xylem Sap at Flow Rate Similar to in vivo Transpiration Flux. Plant Cell Physiol 38: 1375-1381.

17. Bahrun A, Jensen CR, Asch F, Mogensen VO (2002) Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (Zea mays L.). J Exp Bot 53: 251-263.

18. Dong H, Niu Y, Li W, Zhang D (2008) Effects of cotton rootstock on endogenous cytokinins and abscisic acid in xylem sap and leaves in relation to leaf senescence. J Exp Bot 59: 1295-1304.

19. Korovetska H, Novák O, Juza O, Gloser V (2014) Signalling mechanisms involved in the response of two varieties of Humulus lupulus L. to soil drying: I changes in xylem sap pH and the concentrations of abscisic acid and anions. Plant Soil 380: 375-387.

20. Zhang J, Davies WJ (1990) Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. Plant Cell Environ 13: 277-285.

21. Alvarez S, Marsh EL, Schroeder SG, Schachtman DP (2008) Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. Plant Cell Environ 31: 325-340.

22. Sung J, Sonn Y, Lee Y, Kang S, Ha S, *et al.* (2015) Compositional changes of selected amino acids, organic acids, and soluble sugars in the xylem sap of N, P, or K-deficient tomato plants. Jour Plant Nutr Soil Sci 178: 792-797.

23. Rellán-Álvarez R, El-Jendoubi H, Wohlgemuth G, Abadía A, Fiehn O, *et al.* (2011) Metabolite profile changes in xylem sap and leaf extracts of strategy I plants in response to iron deficiency and resupply. Front Plant Sci 2: 66.

24. Kopka J (2006) Current challenges and developments in GC-MS based metabolite profiling technology. J Biotechnol 124: 312-322.

25. Fages J, Mulard D (1988) Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez Zea mays. Agronomie 8: 309-314.

26. Walker V, Bertrand, C, Bellvert, F, Moënne-Loccoz Y, Bally R, *et al.* (2011) Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus Azospirillum. New Phytol 189: 494-506.

27. Nelson LM, Knowles R (1978) Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by Azospirillum brasilense grown in continuous culture. Can J Microbiol 24: 1395-1403.

28. Sambrook GA (1990) Molecular cloning: A laboratory manual. (2nd Edn.) Current protocols in molecular biology. Cell 61: 17-18.

29. Couillerot O, Bouffaud ML, Baudoin E, Muller D (2010) Development of a realtime PCR method to quantify the PGPR strain Azospirillum lipoferum CRT1 on maize seedlings. Soil Biol Biochem 42: 2298-2305.

30. Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nat Protoc 1: 387-396.

31. Ribeiro PR, Fernandez LG, de Castro RD, Ligterink W, Hilhorst HW (2014) Physiological and biochemical responses of Ricinus communis seedlings to different temperatures: a metabolomics approach. BMC Plant Biol 14: 223.

32. Erban A, Schauer N, Fernie A, Kopka J (2007) Nonsupervised Construction and Application of Mass Spectral and Retention Time Index Libraries From Time-of-Flight Gas Chromatography-Mass Spectrometry Metabolite Profiles. In Metabolomics, Weckwerth W (eds) pp: 19-38.

33. Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)based metabolite profiling experiments. Bioinformatics 24: 732-737.

34. Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, *et al.* (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. FEBS Lett 579: 1332-1337.

35. Strehmel N, Hummel J, Erban A, Strassburg K, Kopka J (2008) Retention index thresholds for compound matching in GC-MS metabolite profiling. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 871: 182-190.

36. R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing.

37. Piekielek WP, Fox RH, Toth JD, Macneal KE (1995) Use of a Chlorophyll Meter at the Early Dent Stage of Corn to Evaluate Nitrogen Sufficiency. Agron 87: 403-408.

38. E Zemrany H, Czarnes S, Hallett PD, Alamercery S, Bally R, *et al.* (2007) Early changes in root characteristics of maize (Zea mays) following seed inoculation with the PGPR Azospirillum lipoferum CRT1. Plant Soil 291: 109-118.

39. E Zemrany H, Cortet J, Peter Lutz M, Chabert A, Baudoin E, *et al.* (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.

40. Zhang H, Xie X, Kim MS, Kornyeyev DA, Holaday S, *et al.* (2008) Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. Plant J 56: 264-273.

41. Silva MA, Jifon, JL, Silva JAG, Sharma V (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. Braz J Plant Physiol 19: 193-201.

42. 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 Fertil Soils 42: 279-285.

43. Beardall J, Young E, Roberts S (2001) Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. Aquat Sci 63: 44-69.

44. Liu YF, Qi MF, Li TL (2012) Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery. Plant Sci 196: 8-17.

45. Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002) The putative plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 controls long-distance Na(+) transport in plants. Plant Cell 14: 465-477.

46. Iwai H, Usui M, Hoshino H, Kamada H, Matsunaga T, *et al.* (2003) Analysis of sugars in squash xylem sap. Plant Cell Physiol 44: 582-587.

47. Krishnan HB, Natarajan SS, Bennett JO, Sicher RC (2011) Protein and metabolite composition of xylem sap from field-grown soybeans (Glycine max). Planta 233: 921-931.

48. Oda A, Shimizu M, Kuroha T, Satoh S (2005) Induction of xylem sap methylglycine by a drought and rewatering treatment and its inhibitory effects on the growth and development of plant organs. Physiol Plant 124: 515-523.

49. Tatár E, Mihucz VG, Kmethy B, Záray G, Fodor F (2000) Determination of organic acids and their role in nickel transport within cucumber plants. Microchem J 67: 73-81.

50. Wei Z, Wong JW, Hong F, Zhao H, Li H, *et al.* (2007) Determination of inorganic and organic anions in xylem saps of two contrasting oilseed rape varieties: Roles of anions in long-distance transport of cadmium. Microchem J 86: 53-59.

51. Nayyar H, Kaur R, Kaur S, Singh R (2013) Aminobutyric Acid (GABA) Imparts Partial Protection from Heat Stress Injury to Rice Seedlings by Improving Leaf Turgor and Upregulating Osmoprotectants and Antioxidants. J Plant Growth Regul 33: 408-419.

52. Piotrowska A, Bajguz A (2011) Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. Phytochemistry 72: 2097-2112.

53. 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. Agron Sustain Dev 10: 649-654.

Citation: Rozier C, Erban A, Hamzaoui J, Prigent-Combaret C, Comte G, et al. (2016) Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. Metabolomics (Los Angel) 6: 182. doi:10.4172/2153-0769.1000182

54. Phillips DA, Fox TC, King MD, Bhuvaneswari TV, Teuber LR (2004) Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. Plant Physiol 136: 2887-2894.

55. Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, *et al.* (2002) A unique shortchain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. Plant Cell 14: 2723-2743.

56. Cho JI, Ryoo N, Eom JS, Lee DW, Kim HB, *et al.* (2009) Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. Plant Physiol 149: 745-759.

57. Ljung K, Nemhauser JL2, Perata P3 (2015) New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. Curr Opin Plant Biol 25: 130-137.

58. Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. Nature 425: 521-525.

59. Goldschmidt EE, Huber SC (1992) Regulation of photosynthesis by endproduct accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. Plant Physiol 99: 1443-1448.

60. Stitt, M, Schaewen A, Willmitzer L (1991) "Sink" regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. Planta 183: 40-50.

61. Ferrer JL, Austin MB, Stewart C Jr, Noel JP (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiol Biochem 46: 356-370.

62. Walker V, Couillerot O, Felten A, Bellvert F, Jansa J, *et al.* (2011) Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with Azospirillum, Pseudomonas and Glomus consortium under field conditions. Plant Soi 356: 151-163.

63. Chamam A, Sanguin H, Bellvert F, Meiffren G, Comte G, *et al.* (2013) Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the Azospirillum-Oryza sativa association. Phytochemis 87: 65-77.

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700+ Open Access Journals
- 50,000+ Editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at major indexing services.
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: http://www.omicsgroup.org/journals/submission

Supplemental material

Metabolic pathways	Metabolic variation I vs NI (%)	
	FuturiXX [a]	Seiddi [a]
SUGARS METABOLISM [b]		
Starch + sucrose :		
Trehalose, alpha,alpha'-	NA	-16,2±12,9
Xylose	-13,6±11,05	0,8±16,7
Fructose +mannose :		
Rhamnose	31,2±34,5	9,3±16,45
Galactose :		
Galactonic acid	NA	-5,3±11,55
Galactose	-21,1±8,45	-4,8±8,7
Pentose phosphate :		
Ribose	22,1±15,25	-15,7±8,3
Arabinose	-13,4±9,1	-13,7±13,45
Glycolysis + neoglucogenesis :		
Glucose-6-phosphate	NA	15,5±18,65
Fructose-6-phosphate	NA	3,1±19
ASCORBATE AND ALDARATE METABOLISM [b]		
Arabinonic acid-1,4-lactone	-5,8±0	-58,4±1,75
Glucuronic acid	-37±8,8	-22,5±1,15
Glucaric acid	12,1±28,3	13,9±22,7
TCA CYCLE [b]		
Isocitric acid	48,6±50,65	-18,2±20,25
Citric acid	-6,6±23,3	-17,9±11,45
AMINO ACIDS METABOLISM [b]		
Alanine, Aspartic acid, Glutamate :		
Asparagine	9,4±26,7	11±7,6
Alanine, beta-	-7±5,85	9,2±6,85
Cysteine, Methionine :		
Alanine, 3-cyano-	-2,8±10,4	13,7±8,5
Arginine, Proline :		
Proline	5,4±7,7	25,8±10,7
Putrescine	-4,4±15,75	-16,1±8,5
Glycine, Serine, Threonine :		

Threonine	-1,2±8,2	8,9±5,9
Propane, 1,3-diamino-	-14,4±6,5	-13,2±6,3
Valine, Leucine, Isoleucine :		
Valine	16±13,7	11,3±6,5
Isoleucine	9,8±17,35	10,5±8,15
Aromatic amino acids :		
Phenylalanine	0,8±8,55	1,7±3,3
Tyrosine	-8±8,4	0,3±7,75
UREA CYCLE METABOLISM [b]		
Arginine + Citruline + Ornithine	6,9±7,45	9,5±8,9
POLYOLS [b]		
Glycerol-3-phosphate	NA	-21±8,7
Arabitol	112,5±55,4	-16,4±9,65
Erythritol	78±34,8	-6±5,7
Threitol	82,4±38,2	-0,1±9,1
Glycerol	1,4±1,95	-0,8±1,3
PHENOLIC COMPOUNDS [b]		
Dihydrocoumarin	-54,8±5,2	-15,6±11,45
Benzoic acid, 3,4-dihydroxy-	NA	-11,1±9,4
Benzoic acid	10,9±7,2	-7,5±4,45
4-Methylbenzoic acid	-4,1±5,9	5,4±8
PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM [b]		
Allantoin	NA	30,2±23,75
OTHER PATHWAY METABOLITES [b]		
Glyceric acid	-10,8±8,1	-21,8±8,15
Mannosamine, N-acetyl-	NA	18,5±17,8
Glucose, 1,6-anhydro-, beta-	22,6±15,4	-8,9±6,65
Glycinamide	13,7±10	-7,8±11,5
Nicotinic acid	-14,3±6,2	-5,6±3,95
Phosphoric acid	26,4±15,8	-3,3±8,9
Octylamine	5,4±15,55	-0,7±9,4
UNKNOWN COMPOUNDS [b]		
similar to Fructose Derivate	NA	207,3±98,95
similar to Fructose Derivate	NA	159,8±77,2
similar to Asparagine Derivate	-4,8±9,55	20,5±7,35
similar to Glycerolaldopyranosid	-14,9±6,85	-17,5±13,15
NA180001	-4,6±8,9	-56,3±1,35
A196004-101	NA	-38,8±9,55

A249001-101	-30,4±10,25	-35,1±6,2
A224002-101	11,5±1,95	-27,9±1,25
A167003-101	-24,7±17,9	-20,6±8,95
A166002-101	-14,6±12	-20,1±6,95
A171003-101	-12,9±6,55	15,1±13,45
A148003-101	4,1±26,4	-13,3±13,95
A209004-101	NA	11,5±20,3
A250001-101	NA	10,5±19,85
A125003-101	37,7±38	10,2±21,85
A254002-101	-33±15,1	-8,7±17,2
A228001-101	NA	-5,1±11,2
A216002-101	36,2±2,25	-3,3±21,35
A172005-101	-12,6±12,15	-3,2±4,85
A112003-101	3,6±16,05	0±15,05

[a] Ratios of mean values of inoculated plantlets over mock-inoculated plantlets were expressed as percentage values +/- relative standard error. Wilcoxon non-parametric tests were conducted for each metabolite to compare inoculated and mock-inoculated mean values in each cultivar. They are indicated as a background color (Dark grey, $p<0.05$; light grey, $p<0.1$; and white, $p>0.1$). NA indicates that the metabolite was detected in less than 2 of biological replicate samples. [b] Metabolites were classified according to KEGG's metabolic pathway database and grouped as metabolites unaffected by A. lipoferum CRT1 inoculation. Yet non-identified samples are indicated by the code of the Golm Metabolome Database (http://gmd.mpimpgolm.mpg.de/).

3.2 Analyses ciblées des modifications des teneurs de certaines phytohormones

L'analyse précédente était une analyse non-ciblée qui nous a permis de déterminer les groupes de métabolites impactés par l'inoculation avec la PGPR d'intérêt. Néanmoins, une famille de métabolites était absente de nos profils métaboliques : les phytohormones. Ces dernières étaient-elles réellement absentes de la sève ascendante ou était-ce un problème de sensibilité des outils utilisés ? C'est ce à quoi nous avons répondu par des analyses par GC/APCI-Q-TOF-MS, un outil plus sensible et résolutif que la GC/ESI-TOF-MS. Ces analyses préliminaires, sont restées qualitatives (n=6 réplicats techniques) car nous n'avons pas fait le choix et testé de standard interne dans un premier temps. Il est probable que le ribitol soit un standard approprié pour cette nouvelle méthode mais il reste nécessaire de le vérifier. Une normalisation des métabolites par rapport au standard interne nous permettra par la suite d'évaluer quantitativement des différences entre plantules inoculées avec la PGPR et non-inoculées.

Cette nouvelle technologie de spectrométrie de masse a permis d'annoter la grande majorité des substances déjà annotées précédemment comme le glucose et le fructose. De même, le GABA (acide 4-aminobutanoique) ($[M-H]^+$=104) et la putrescine ($[M-H]^+$=89) ont pu aussi de nouveau être annotés par cette méthode. Il est par ailleurs probable que leur quantification soit plus précise avec l'utilisation de cette méthode plus sensible.

Néanmoins, de nouveaux métabolites, non-annotés par la méthode précédemment utilisées, ont pu être détectés. Il s'agit notamment de l'acide salicylique ($[M-H]^+$=139) et de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) ($[M-H]^+$=102). Par analyse des profils de fragmentation, nous avons pu annoter 2 composés contenant de la gibbérélline GA3 ($[M-H]^+$=347). Les 2 conjugués n'ont néanmoins pas encore été identifiés.

4. Discussion et conclusion

Nos résultats confirment que la sève ascendante sert de véhicule pour le transport de nombreuses substances organiques (acides organiques, acides aminés, composés phénoliques) des parties racinaires vers les feuilles. Contrairement à certaines études, il nous a fallu utiliser un spectromètre de masse à haute résolution et sensibilité pour pouvoir détecter des phytohormones. Ceci est vraisemblablement dû au plus grand soin que nous avons pris pour récolter nos échantillons de sève et éviter toute contamination par la sève élaborée du phloème ou le parenchyme coupé. Les seules autres analyses du métabolome de la sève brute récoltée avec une chambre à pression de Scholander à la pression hydrique n'ont aussi détecté qu'un

faible nombre de phytohormones (Alvarez *et al.* 2008; Hansen et Dörffling 1999). Si la technologie moderne d'APCI-Q-TOF-MS semble plus à même de détecter et quantifier les phytohormones dans la sève brute, des améliorations doivent encore être apportées au niveau des bases de données qui doivent être complétées en y ajoutant notamment les nombreuses formes conjuguées possibles des hormones végétales.

Le dispositif expérimental que nous avons utilisé (usage de deux cultivars développant, ou non, des réponses symbiotiques avec *A. lipoferum* CRT1) nous a permis de montrer que la présence d'*A. lipoferum* CRT1 sur les racines du maïs s'accompagne d'une baisse des teneurs de nombreux composés énergétiques simples et ce, même en absence de toute réponse symbiotique de la plante à la bactérie. Notre hypothèse est que ce phénomène est lié à la consommation d'exsudats racinaires par les bactéries. Elle sera testée dans le chapitre 3 durant une analyse des métabolomes et transcriptomes des feuilles et racines de ces deux variétés de maïs en présence ou absence d'*A. lipoferum* CRT1.

Un des métabolites dont la teneur est spécifiquement modifiée dans la sève brute lors d'une réponse symbiotique à *A.lipoferum* CRT1 est le glucose. Ce métabolite intervient au niveau de différents processus physiologiques dans la plante. Il peut être utilisé en tant qu'élément énergétique, de stockage du carbone, de formation de la paroi cellulaire, de molécule signale pour la croissance (en interaction avec les voies de signalisation des phytohormones) ou de répresseur de la photosynthèse en tant que produit terminal de cette dernière (Moore *et al.* 2003a). Des approches mutant chez *Arabidopsis* ont pu montrer le rôle prédominant du glucose en tant que signal d'induction de la morphogénèse précoce de la plantule (Arenas-Huertero *et al.* 2000). Les signaux de réponses du glucose, médiés par des hexokinases nécessitent de même une forte accumulation d'ABA chez la plantule à ce stade de croissance, une preuve que le signal glucose et la signalisation par les phytohormones sont fortement liés. D'après nos résultats, la concentration en glucose diminue uniquement dans la sève ascendante du cultivar Seiddi inoculé avec la PGPR, en comparaison avec le contrôle et le cultivar FuturiXX qui ne développent pas de réponse symbiotique à *A. lipoferum* CRT1. Rappelons que la réponse symbiotique du maïs à *A. lipoferum* CRT1 se caractérise par une augmentation de croissance racinaire et une meilleure efficacité de conversion photochimique. L'hypothèse probable est donc que la diminution de la teneur en glucose observée dans la sève ascendante lèverait l'action inhibitrice que cette molécule exerce sur la photosynthèse, un phénomène que nous avons observé lors de nos mesures de rendement quantique de conversion photochimique (Fv/Fm).

La formation accrue de photosynthétats qui en résulterait permettrait alors de soutenir l'augmentation concomitante de croissance racinaire.

Les modifications d'architecture racinaire que nous avons observées ressemblent à celles induites par les auxines. Même si de nombreuses souches d'*Azospirillum* sont productrices de l'auxine IAA, celle que nous avons utilisée dans cette étude ne possède pas le gène *IpdC* qui est classiquement utilisé pour la synthèse de cette substance. Il est cependant possible qu'elle possède une autre voie de synthèse encore inconnue ou qu'elle produise d'autres substances aux effets auxiniques (Sauer *et al.* 2013). La question reste donc entière de savoir si l'augmentation de croissance racinaire induite par *A. lipoferum* CRT1 est liée à sa sécrétion de substances aux effets auxiniques ou à son impact négatif sur les teneurs en glucose. Glucose et auxines sont en effet des substances signal qui partagent une grande partie de leurs voies de signalisation cellulaire. La théorie a même été émise que l'induction de la dominance apicale chez les plantes n'était finalement pas due à un signal auxinique mais à un signal produit par les sucres dont le glucose (Mason *et al.* 2014). Ainsi deux hypothèses sont probables selon lesquelles *A. lipoferum* CRT1 :

1) soit diminue la teneur en glucose dans une partie stratégique de la plante qui induirait par voie de conséquence des modifications morphologiques du système racinaire qui ressemblent à celles induites par les auxines par modulation de la cascade de signalisation des auxines endogènes
2) soit sécrète une substance aux effets auxiniques qui pénètre la plante pour y induire une modification de l'architecture racinaire de type auxinique. Cette croissance racinaire serait alors à l'origine d'une baisse de la teneur en glucose du fait de sa plus grande consommation par les tissus en croissance.

Une perspective intéressante à ce niveau serait d'investiguer le dialogue entre les deux partenaires. Ceci peut être mis en place par un marquage isotopique d'un des deux partenaires de l'interaction. Il serait alors possible de déterminer si la bactérie envoie directement un signal à la plante qui modifie la concentration en sucre et/ou agit comme signal auxinique sur la plante. Des analyses transcriptomiques et métabolomiques des racines en interaction avec *A. lipoferum* CRT1 pourraient également apporter un éclairage sur cette question. Les analyses ont été réalisées dans l'étude suivante (Chapitre 3).

CHAPITRE 3 : Modifications métaboliques et transcriptomiques des compartiments racinaires et foliaires du maïs lors de son interaction avec la PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1

1. Introduction

1.1 Objectifs

L'étude décrite dans le chapitre précédent (Chapitre 2) a permis de caractériser l'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur les rendements photosynthétiques maximum et réels et sur l'architecture racinaire de plantules hôtes de maïs. Les impacts de cette bactérie rhizosphérique sont donc multiples sur son hôte et incluent à la fois des modifications métaboliques et morphologiques. Un autre point remarquable est l'impact systémique d'*A. lipoferum* CRT1 sur son hôte avec notamment des modifications du fonctionnement des photosystèmes dans les parties aériennes où la bactérie est absente. La caractérisation dans l'étude du Chapitre 2 de modifications concomitantes de la concentration des constituants de la sève ascendante confirme l'impact systémique d'*A. lipoferum* CRT1 sur son hôte. Cette étude ne renseigne cependant pas sur les mécanismes conduisant à la modification des teneurs en métabolites dans la sève, croissance racinaire et meilleure efficacité photosynthétique.

Lors de cette étude, l'objectif a donc été de réaliser une étude métabolomique des parties aériennes et racinaires de plantules de maïs interagissant avec *A. lipoferum* CRT1. Comme les métabolites analysés lors d'une telle étude sont extraits de nombreux tissus qu'il est impossible de séparer avant extraction, des effets confondants liés à deux tissus réagissant de manière opposée à l'agent microbien sont possibles. Expliquer les teneurs en métabolites dans la sève ascendante est de plus complexe car elles résultent de mécanismes de pompages entrant et sortant de métabolites qui dépendent non seulement des teneurs en métabolites dans les cellules voisines mais aussi des activés de transporteurs protéiques. Pour clarifier tous ces points, cette étude a eu pour objectif de complémenter les données métabolomiques par des données transcriptomiques.

1.2 Les enjeux du couplage métabolomique/transcriptomique

Comme nous l'avons défini plus tôt, la métabolomique correspond à l'étude de l'ensemble des métabolites (primaires et secondaires) d'un individu, d'un compartiment ou d'un organe. Même si le contenu en métabolites d'un individu explique directement son phénotype, les analyses métabolomiques ne permettent pas d'établir une telle corrélation. Les métabolites annotés sont en effet souvent impliqués dans différentes voies métaboliques et présents dans plusieurs compartiments (cellulaires et tissulaires) de la plante. Pour des raisons analytiques exposées dans le Chapitre 1, il est de plus techniquement impossible d'analyser, en une analyse métabolomique, l'ensemble des métabolites d'un extrait. Ceci est lié à la très grande variété des propriétés physico-chimiques des métabolites composant un organisme vivant. L'analyse

métabolomique est de plus une analyse d'une image instantanée d'un état physiologique, ce qui ne permet pas de comprendre comment un organisme vivant répond à un stimulus. Le décryptage d'un phénotype doit donc faire appel à une approche plus intégrative des phénomènes biologiques que la seule analyse métabolomique. L'approche la plus classiquement employée pour complémenter les données de métabolomique est la transcriptomique. Cette dernière correspond à l'étude de l'ensemble des ARN messagers, c'est-à-dire des transcrits d'un génome (Wang *et al.* 2009).

La très grande majorité des métabolites d'un organisme vivant est produite par l'action de catalyseurs protéiques appelés enzymes. Ceux-ci sont eux même produits (traduits) à partir de l'information portée par des ARNm qui eux-mêmes sont générés (transcrits) à partir de l'information portée par les zones codantes du génome. La compartimentation cellulaire des métabolites tient au fait que leurs enzymes possèdent des séquences qui les adressent spécifiquement dans les bons compartiments des cellules. La compartimentation tissulaire, tient quant à elle à l'expression tissus-spécifique des ARNm, une information contenue dans leurs zones promotrices d'expression qui sont souvent situées en amont des zones codantes des gènes. Le manque de connaissance sur le fonctionnement des zones promotrices de transcription et la multiplicité des mécanismes de régulation post-traductionnelle des enzymes rend cependant impossible l'établissement de connexions directes entre métabolome et génome d'un individu (Nielsen et Oliver 2005). L'analyse expérimentale directe du métabolome est donc nécessaire mais des informations génomiques et transcriptomiques seront également nécessaires pour compléter les limitations expérimentales des analyses génomiques. Idéalement, des informations protéiques seraient aussi utiles. Leur séquence nous renseigne sur leur localisation et la mesure des activités enzymatiques sur leur niveau de fonctionnement. Ces analyses sont hélas complexes, coûteuses et sujettes à des limitations intrinsèques comme les analyses métabolomiques. En ce sens, les analyses transcriptomiques représentent un compromis intéressant car elles peuvent être réalisées en une seule analyse, couvrir une très large part du transcriptome à coût raisonnable et tout de même renseigner sur le niveau de régulation transcriptomique et la localisation subcellulaire et tissulaire des transcrits.

Il existe deux principales méthodes d'analyse du transcriptome : celle faisant appel à des puces de microarray et celles résultant du séquençage direct des ARNm (RNA-Seq). Même si le RNA-Seq a l'avantage de pouvoir être appliqué à des espèces végétales pour lesquelles une connaissance intégrale du génome n'est pas disponible, les progrès récents dans les technologies de séquençage à haut débit font qu'il fournit une plus grande couverture du génome exprimé

que les microarray (Sekhon *et al.* 2013). Dans le cas où le génome de l'organisme a été séquencé et annoté, le RNA-Seq renseigne également sur les évènements d'épissage alternatifs. Etant quantitatif, le RNA-Seq permet une analyse plus fine des différences significatives entre conditions. Par exemple, dans l'étude de Sekhon *et al.* 2013, alors que les microarrays montrent une différence d'expression de 390 gènes, l'analyse par RNA-Seq met en évidence celle de 427 gènes. Le RNA-Seq est ainsi considéré comme la technologie la plus appropriée pour évaluer le niveau des transcrits et leur épissage différentiel (Wang *et al.* 2009).

Les outils modernes de bioinformatique permettent de tirer plus d'information d'une analyse RNA-Seq si une annotation fonctionnelle du génome de l'organisme étudié est disponible. Ces outils permettent en effet de relier l'expression différentielle d'un groupe de gènes avec l'enrichissement d'un terme d'ontologie de gènes (GO). L'effort actuel sur l'ontologie des gènes permet de définir les gènes de manière non-spécifique d'une espèce et donc d'utiliser un vocabulaire unique et universel pour communiquer sur la fonction d'un gène selon trois termes, la localisation cellulaire, la fonction cellulaire et le processus biologique auquel il participe. Ces outils utilisent également comme données de fond des cartes d'expression spatio-temporelle des gènes de l'organisme étudié. Même si ces outils ne sont pas optimaux pour le maïs où la fonction de nombreux gènes est extrapolée selon l'analyse fonctionnelle d'un orthologue dans une autre espèce végétale, ils sont tout de même disponibles (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php) de même que des cartes d'expression spatio-temporelles en dehors de tout stress connu (Sekhon *et al.* 2011). Les nombreux séquençages RNA-Seq réalisés ces dernières années par de nombreuses équipes ont permis d'agrémenter les bases de données même si ces dernières sont encore limitées pour des organismes non-modèles. Pour les génomes non-séquencés, des méthodologies appropriées et qui ne sont pas basées sur un alignement de séquence mais sur un ré-assemblage, doivent-être créées et optimisées (Grabherr *et al.* 2011).

Le génome du maïs a été entièrement séquencé et plusieurs études ont étudié son transcriptome avec la création d'un certain nombre d'outils d'analyse bioinformatique. Dans une étude, Sekhon *et al.* (2013) a montré que 39 429 gènes étaient transcrits chez le maïs, tout organe confondu, et qu'au maximum 29 447 gènes étaient transcrits au sein d'un même organe (feuilles, embryon, tige, grain en germination). En tout, 32 540 gènes codant pour des protéines, appartenant à 11 892 familles ont été annotés chez le maïs dans une autre étude. C'est plus que chez le Sorgho mais un nombre de gènes inférieur à celui de l'Arabette ou du Riz (Schnable *et al.* 2009). Plus récemment, certaines études ont pu augmenter le nombre de transcrits séquencés afin d'aller

chercher un plus grand nombre de transcrits et atteindre 126 708 transcrits annotés chez le maïs dont 4 842 transcrits nouvellement annotés (Ja *et al.* 2014). Il a été montré que le transcriptome du maïs était fortement modifié lors d'un stress abiotique ou lors de l'attaque d'un pathogène. Lors de stress hydriques notamment, le niveau d'expression des transcrits issus de la voie de l'ABA augmente en parallèle à une diminution de la concentration en glucose, faisant penser à une modification dans la signalisation ABA/sucre (Kakumanu *et al.* 2012). Au niveau des ovaires et au niveau du méristème basal des feuilles, respectivement, 10 426 et 682 gènes sont différentiellement exprimés chez les plantes soumises au stress. Ceci indique que le nombre de transcrits dont l'expression est significativement modifiée entre deux conditions peut être très différent en fonction de l'organe étudié.

Le couplage d'analyses métabolomiques et transcriptomiques a permis d'étudier des phénomènes biologiques complexes tels que la tolérance des plantes à des stress abiotiques comme le froid ou le gel (Hincha *et al.* 2012). Dans cette étude, le couplage entre les deux 'omiques' a permis d'étudier non seulement le facteur 'stress' mais aussi le facteur 'espèces végétales' en reliant les données de céréales, buissons et arbres. C'est le cas aussi de l'étude de Lee *et al.* (2017) qui couple la transcriptomique et la métabolomique afin de mettre en exergue les différences fines dans la biosynthèse du ginsenoside entre différents cultivars de ginseng. Dans le cas d'études de stress, certaines équipes ont utilisé des biosimulations qui prenaient en compte les voies métaboliques modifiées afin de définir des biomarqueurs pour prédire les transcrits discriminants. Cette approche a été appelée technologie 'transriptome-to-metabolome' (TTM) (Phelix et Feltus 2015). Il a de même été envisagé d'utiliser le couplage des 'omiques' dans un contexte actuel de culture du maïs difficile, afin de mieux comprendre comment cette plante fait face aux différents stress environnementaux (Gong *et al.* 2014). Dans le cas précis des interactions plantes-microbes chez les plantes non-modèles, il a été montré que la génomique et la transcriptomique seules n'étaient pas assez puissantes pour déceler les modifications minimes et que l'ajout d'information issue de la métabolomique avait permis de découvrir de nouvelles molécules intervenant dans ces interactions (Feussner et Polle 2015). Des corrélations ont été établies entre les niveaux des transcrits, ceux des métabolites et la réponse de systèmes biologiques à des transformations (Urbanczyk-Wochniak *et al.* 2003) afin de mettre à jour les gènes clés de ces réponses. Combiner les informations issues des transcriptomes et métabolomes est un challenge actuel important pour éviter de tirer des conclusions erronées.

1.3 Modifications des métabolomes et transcriptomes racinaires et foliaires par les PGPR

Alors que les études du compartiment xylémien sont complexes à réaliser et restent rares, l'organe en contact direct avec la PGPR, la racine, et l'organe dont les modifications physiologiques sont la preuve de l'effet systémique des PGPR, la feuille, ont été au cœur de plusieurs études métabolomiques lors du processus d'interaction entre plantes et PGPR. Certaines ont été complétées par des analyses transcriptomiques.

1.3.1 Modification de la nutrition minérale

En parallèle des effets morphologiques connus des PGPR (augmentation du rendement en fruit, de la biomasse, diamètre de la tige et longueur racinaire), le contenu foliaire en éléments minéraux (N, P, K, Mg, Ca, Fe, Mn et Zn) est significativement modifié chez le pommier lors de l'inoculation avec des mélanges croisés de PGPR dont des souches de *Bacillus* (M3 et OSU-142) et de *Microbacterium* (FS01), avec principalement une forte augmentation du contenu en phosphore et en azote chez les pommiers inoculés (Karlidag *et al.* 2007). Une étude sur des plantules de maïs a montré de même que l'état nutritionnel (azote, phosphore, potassium) de ces dernières était fortement modifié par l'inoculation avec la PGPR *P. putida* et *A. lipoferum* parallèlement à des augmentations de rendement (Adjanohoun *et al.* 2012). Ces observations sont récurrentes lors d'études sur l'inoculation avec des PGPR (Orhan *et al.* 2006).

1.3.2 Modification du métabolisme secondaire

Au niveau des racines, les études des modifications du métabolisme secondaire en réponse à l'inoculation par une PGPR sont les plus courantes. C'est le cas des travaux de Cappellari *et al.* (2013) qui ont révélé une augmentation de la production en monoterpènes et en composés phénoliques chez la Tagète des décombres (Astéracée qui a pour habitude d'envahir les vignes) suite à une inoculation par les PGPR *P. fluorescens* WCS417r et *A. brasilense* Sp7. De même, d'importantes modifications du métabolisme secondaire (notamment composés phenoliques, flavonoides, xanthones, et benzoxazinoides) ont été mises en évidence chez le maïs lors d'inoculations avec des PGPR des genres *Azospirillum* et *Pseudomonas* ou encore avec le champignon mycorhizien *Glomus* (Walker 2012).

1.3.3 Modification du métabolisme primaire

Il a été montré que le contenu de certains acides aminés tels que l'histidine, la glycine, la thréonine, l'arginine et l'alanine augmente significativement dans les parties aériennes du chou inoculé par la PGPR *Paenibacillus polymyxa* RC14 (Dursun *et al.* 2017). Plusieurs études montrent de même que les PGPR modifient le contenu global en sucres solubles et en amidon

chez la plante hôte. L'inoculation avec des souches de *Bacillus subtilis* et *P. fluorescens* dans des conditions de stress salin a montré une augmentation de la biomasse fraiche et sèche des racines et des feuilles chez le radis parallèlement au contenu en pigments photosythétiques, proline et autres acides aminés (Mohamed et Gomaa 2012). Des plants de blé inoculés avec la bactérie *P. putida* AKMP7 ont montré une forte augmentation de la concentration de différents métabolites comprenant un certain nombre de sucres, acides aminés (dont la proline), protéines, amidon mais aussi de la chlorophylle (Ali *et al.* 2011). C'est de même le cas de la bactérie *Burkholderia phytofirmans* PsJN qui, inoculée sur des plants de vigne, induit une meilleure acclimatation au froid et ce par une augmentation du contenu en glucose, fructose, maltose, sucrose, raffinose et mannose (Fernandez *et al.* 2012). Une étude transcriptomique a néanmoins montré un phénotype transcriptionnel similaire à celui induit par un fort appauvrissement en sucres. Les gènes induits sont ceux soumis à une répression par les carbohydrates (Schwachtje *et al.* 2011). L'hypothèse émise ici est qu'un signal serait transmis par la bactérie à la plante afin de simuler cette carence en sucre et d'induire une remobilisation des sucres au niveau des racines. La plante fournirait ainsi plus de saccharose au niveau des racines lorsque la bactérie est présente pour contribuer à la nutrition de la PGPR.

Une autre étude concernant *Burkholderia phytofirmans* et sa capacité à augmenter la résistance des plantes hôtes aux basses températures a montré que le métabolisme des hydrates de carbone, et principalement ceux du tréhalose, tréhalose-6-phosphate et du saccharose, était modifié lors de l'inoculation de plants de vigne. L'induction de l'accumulation du tréhalose et tréhalose-6-phosphate dans la tige et les feuilles suite à l'inoculation bactérienne pourrait même être la base du mécanisme de résistance (Fernandez, *et al.* 2012). Une modification significative du contenu en tréhalose, mannitol, et isocitrate s'est révélée être caractéristique de l'interaction de différents cultivars de maïs avec des bactéries fixatrice d'azote (Brusamarello-Santos *et al.* 2017). L'étude de Van de Mortel *et al.* (2012) a couplé la métabolomique et la transcriptomique afin de comprendre les mécanismes d'induction d'une résistance systémique aux pathogènes chez *Arabidopsis* par une souche de *Pseudomonas* non-pathogène (Pf.SS101) et agissant comme agent de biocontrôle (Figure 3.1). Dans cette étude près de 1910 gènes et 50 métabolites se sont avérés discriminer les plantes inoculées des plantes non-inoculées. Ils montrent une induction de la voie de signalisation du salicylate lors de l'induction de la résistance systémique ainsi qu'un enrichissement en camalexine et glucosinolates.

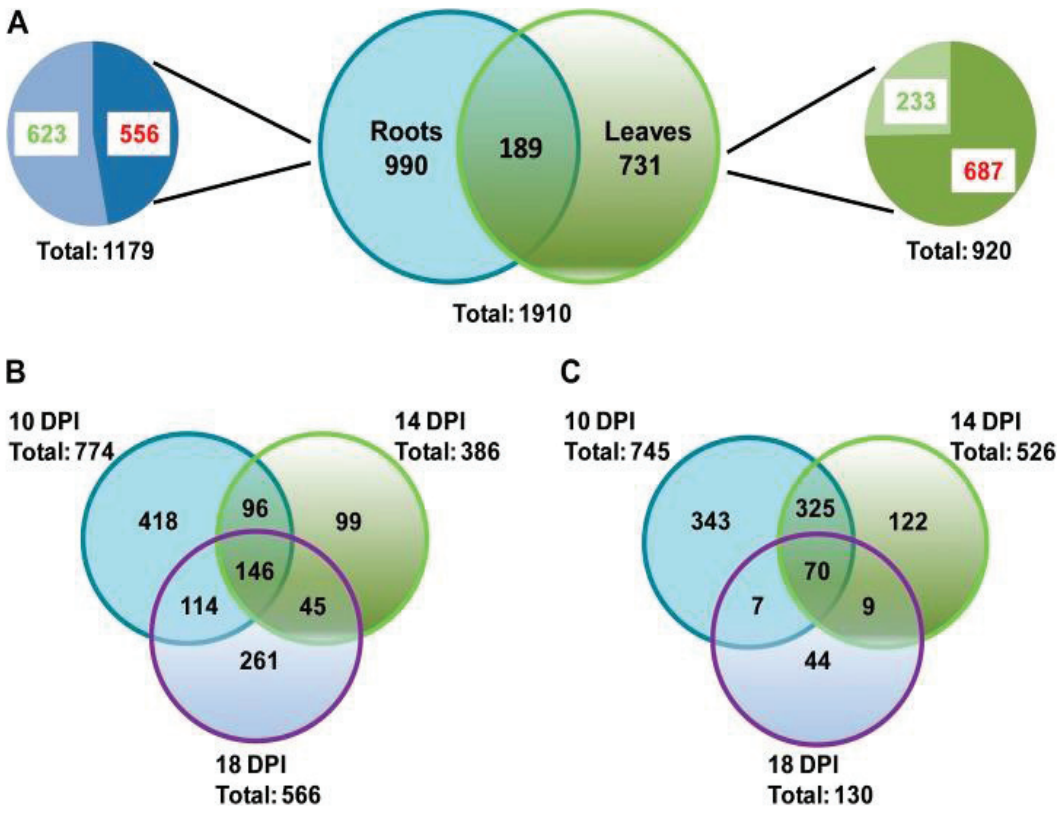


Figure 3.1 : Modifications transcriptomiques chez *Arabidopsis* induites par l'inoculation avec la bactérie non-pathogène *P. fluorescens* SS101 (d'après Van de Mortel *et al.* 2012).

(A) représente le nombre total de gènes induits (en rouge) et réprimés (en vert) dans les racines et feuilles des plantules traitées. Les diagrammes de Venn (B et C) montrent les recouvrements entre gènes régulés différentiellement dans les racines (B), et feuilles (C) à 10, 14, 18 jours après inoculation avec Pf SS101.

1.4 Démarche expérimentale

Un plan d'expérimentation similaire à celui du chapitre précédent (Chapitre 2) a été utilisé. Les mêmes deux cultivars de maïs et conditions de culture ont donc été utilisés. En présence d'*A. lipoferum* CRT1, le cultivar Seiddi présente des réponses morphologiques au niveau des racines, un potentiel photosynthétique accru et une importante modification de la teneur de plusieurs composés de la sève ascendante. Inversement, aucune réponse physiologique ou morphologique n'a pu être détectée chez le cultivar FuturiXX. Les plantules ont été cultivées dans des conditions contrôlées similaires à celles utilisées dans le Chapitre 2 (teneur en eau du sol égale à la capacité au champ afin de limiter tout stress abiotique) puis extraites 12 jours après semis également. Les systèmes racinaires et les plus jeunes feuilles matures (feuille 2 en partant du bas) ont été récoltés et leurs métabolomes et transcriptomes analysés.

2. Matériel et méthodes

2.1 Culture bactérienne

L'inoculation a été réalisée avec la souche PGPR *A. lipoferum* CRT1 (Fages et Mulard 1988) à partir du protocole de Walker *et al.* 2011a. Brièvement, 15 µL d'un stock glycérol bactérien a été étalé sur un milieu solide (5.75 g de Nutrient Agar and 2 g NaCl, qsp 250 ml d'eau déminéralisée) et mis en culture 4 j à 28°C. Une colonie isolée a été sélectionnée et mise en pré-culture puis culture liquide à 28°C sous agitation (200 rpm) dans un milieu sans azote (Nfb, Nelson and Knowles, 1978) supplémenté avec 1/40 (v/v) de milieu LB et 0.5% biotin (50 mg dans 50 mL NaOH 0.1N) (Sambrook 1990). Suite à une première centrifugation (10 min, 3800 rpm) les cellules bactériennes ont été lavées avec de l'eau UP stérile, centrifugées à nouveau puis re-suspendues dans 20 mL d'eau UP stérile. L'adéquation de la suspension bactérienne a tout d'abord été évaluée par PCR avec les amorces spécifiques d'*A. lipoferum* CRT1 F1676-Q1 (5'-ATCCCGGTGGACAAAGTGGA-3') et 1837-Q2 (5'-GGTGCTGAAGGTGGAGAACTG-3') (Couillerot *et al.* 2010). Ensuite, la bonne mobilité et l'absence de contaminants ont été contrôlées par microscopie optique. La suspension bactérienne a été diluée à une concentration de 1.10^7 cellules/mL avec de l'eau UP stérile et immédiatement utilisée afin d'inoculer les grains de maïs.

2.2 Inoculation des grains de maïs

Des grains de maïs (*Zea mays* subsp. *mays* L.) appartenant aux genotypes FuturiXX (RAGT) and Seiddi (Caussade Semences) et ayant des masses similaires (entre 0,3609 et 0,3780 g) ont été choisis afin de réduire l'hétérogénéité lors de la croissance. L'inoculation des grains a été réalisée à température ambiante par dépôt de 50 µL de la suspension bactérienne diluée sur chaque face du grain. Les grains contrôle non-inoculés ont reçu le même traitement excepté que la suspension bactérienne a été remplacée par de l'eau UP stérile. Cette opération a été répétée 3 fois à 1 h d'intervalle. Durant l'étape d'inoculation, les grains ont été stockés à l'obscurité sur un papier filtre humidifié avec de l'eau UP stérile et dans une boîte de Pétri fermée. Ils ont été incubés ainsi durant 9 h avant d'être semés.

2.3 Culture des plantules de maïs

Le sol de surface (5-30 cm sous la surface) d'un champ de type luvisol ayant hébergé une culture de maïs l'année précédente a été récolté à Sérézin de la Tour (Isère, France) au début de l'été 2015 puis tamisé (<4 mm) après récolte. Il a une texture argilo-limoneuse dépourvue de calcaire et consiste en 26,9% de sable, 38,3% de limon et 34,7% d'argile avec 324,9 g d'eau par kg de

sol à la capacité au champ (CAPAC). La teneur en matière organique était de 54,3 g/kg et la capacité d'échange cationique (CEC) était de 228 méq/kg. Le pH (eau) était de 7,05 et le pH (KCl) de 6,28. Le sol tamisé a ensuite été placé dans les pots (hauteur 18 cm) à une densité de 1,2 $g.cm^{-3}$ à la CAPAC. Le contenu en eau du sol a été ajusté à sa CAPAC (32,49% d'humidité) et immédiatement utilisé pour la culture des plantes. Les grains inoculés et non-inoculés ont été semés à environ 0,5 cm sous la surface du sol à raison d'un grain par pot. Les pots ont été placés dans une chambre de culture avec une humidité constante de 60%, une luminosité de 815 $\mu mol.m^{-2}$ de photon avec un cycle jour/nuit de 16/8 h et une température de 24°C. La teneur en eau du sol a été ajustée à la CAPAC par pesée quotidienne de chaque pot.

2.4 Analyses métabolomiques des compartiments racinaires et foliaires

Après 12 j de croissance, la dernière feuille mature (deuxième feuille en partant du collet) et les racines des plantules inoculées et non-inoculées ont été récoltées (quatre conditions en incluant les deux cultivars, n=8). Le sol adhérent aux racines a été enlevé manuellement aussi rapidement et délicatement que possible. Les feuilles et racines ont ensuite été plongées dans l'azote liquide afin de bloquer le métabolisme. Elles ont été lyophilisées durant 48 h, découpées en morceaux d'environ 1 mm et broyées à l'aide d'un broyeur à billes durant 8 min à 30Hz (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Germany). Les métabolites ont été extraits à partir de 7 mg de matière broyée par une extraction biphasique eau/méthanol/chloroforme en utilisant du ribitol (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) comme standard interne tel que décrit dans Rozier *et al.* (2016). Les métabolites ont été trimethylsilylés, puis analysés par GC-MS (Agilent 7890A and 7000A, Santa Clara, USA) et annotés en utilisant les logiciels MetAlign (https://www.wur.nl/en/show/MetAlign-1.htm - (Lommen et Kools 2012)) et TagFinder (Luedemann *et al.* 2008) et une quantification relative a été réalisée avec MassHunter (Agilent, Santa Clara, USA) par estimation des aires des pics du TIC sur le chromatogramme (Rozier *et al.* 2016). L'association visuelle des métabolites à des voies métaboliques a été réalisée avec le logiciel VANTED (www.vanted.org -(Rohn *et al.* 2012)).

2.5 Extraction d'ARN

Après 12 j de croissance, la dernière feuille mature (n=5 Seiddi NI/I et FuturiXX NI/I) et les racines (n=5 Seiddi NI/I et FuturiXX NI/I) des plantules inoculées et non-inoculées ont été récoltées. Ces plantules ont subi les mêmes traitements que celles utilisées pour les analyses métabolomiques mais sont différentes. Le sol adhérent aux racines a été délicatement et rapidement enlevé avant de plonger feuilles et racines séparément et immédiatement dans l'azote liquide. Un à un le matériel végétal (racines et feuilles) a été sorti de l'azote liquide et

broyé au pilon et au mortier (rendus RNase free par autoclavage). Les ARNs totaux ont ensuite été extraits grâce au kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey Nagel). Les quantités et qualités des extraits d'ARN ont été immédiatement estimées au Nano Drop. Chaque extrait d'ARN a ensuite été dilué avec de l'eau RNase free à une concentration de 2 µg/20 µL. La plaque 96 puits contenant les extraits d'ARN dilués a ensuite été fermée par des barrettes de bouchons et conservée à -80°C jusqu'au séquençage.

2.6 RNA-Seq et analyses bioinformatiques

Le RNA-Seq a été réalisé par l'entreprise Fasteris (Ch. du Pont-du-Centenaire 109 CH-1228 Plan-les-Ouates, Suisse). Les échantillons d'ARN totaux ont d'abord suivi une étape de contrôle de leur qualité par Qubit (vérification de la pureté des ARN et quantification). Ceux contenant une queue poly-A ont été purifiés et transformés en banque de cDNA par le kit Illumina TruSeq stranded mRNA. Cette étape correspond à une sélection des poly-A, une fragmentation des transcrits, la synthèse d'un premier brin de cDNA avec des amorces aléatoires puis la synthèse d'un deuxième brin complémentaire. S'en suivent une adénylation en 3', une ligation avec des adaptateurs indexés, et une amplification de la bibliothèque. Une étape de contrôle de la qualité des bibliothèques a été réalisée en vérifiant son profil, par dilution à 10 nM et analyses par qPCR. Le séquençage a ensuite eu lieu par Illumina Sequencing - Run - HiSeq High-Output (HO) en lecture 'paired-reads' (2x 75 bp) full lane - HiSeq 4000.

Le traitement des séquences a été réalisé à l'aide du pipeline TUXEDO (Trapnell *et al.* 2012). L'alignement des transcrits sur le génome du maïs et l'assignation à des évènements d'épissage différentiel ont été réalisés par Fasteris avec le logiciel TOPHAT en utilisant l'annotation du génome du maïs AGPv4 présent sur EnsemblPlant (http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index). L'abondance des transcrits a été réalisée sur CUFFLINKS, leur expression différentielle estimée avec CUFFDIFF ($p<0,05$ - test de Wilcoxon) et les résultats visualisés avec CUMMERBUND.

Les codes Ensembl des gènes différentiellement exprimés ont été convertis en codes UniProt à l'aide du convertisseur g:Profiler (http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/ - Reimand *et al.* 2016) pour permettre l'évaluation de l'enrichissement des termes GO par la plateforme AgriGo (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/ - agriGO v2.0: Tian *et al.* 2017) en utilisant l'outil Singular Enrichment Analysis (SEA), le Maize Genome Locus (maizegenome.org) comme génome de fond, des statistiques de Fisher, la méthode d'ajustement multi-test de Yekutieli, $p<0,05$ et un minimum d'entrée par terme de 5. Ces données ont été visualisées à l'aide de la plateforme ReviGO (http://revigo.irb.hr/ - Supek *et al.* 2011). Le site UniProt (http://www.uniprot.org/ -

The UniProt Consortium 2017) a de même permis de convertir les identifiants d'Ensembl Genomes Transcript en identifiants KEGG afin de pouvoir visualiser le positionnement des gènes modifiés par l'inoculation dans des voies métaboliques sous KEGG (http://www.genome.jp/kegg/ - Kanehisa *et al.* 2002).

2.7 Analyses statistiques multivariées

Pour les analyses métabolomiques par GC-MS, l'aire des pics des TIC (UA : unité arbitraire) après correction de la ligne de base et normalisation avec la réponse du standard interne (ribitol) a été exprimée comme pourcentage de la valeur maximum obtenue pour l'ensemble des conditions. Pour les analyses transcriptomiques, des étapes préliminaires de normalisation à partir des abondances et volumes ont été réalisées afin de construire la matrice utilisée pour réaliser les tests statistiques.

Pour les analyses métabolomiques et transcriptomiques, les datasets consistaient en 8 conditions comprenant 2 cultivars, 2 organes d'intérêts (feuilles et racines) et 2 niveaux d'inoculation (non-inoculées et inoculées avec la PGPR) avec n=8 et n=5, respectivement.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team 2008) adjoint des packages RVAidememoire, mixOmics et ade4 (téléchargés en mars 2016). Des ANOVA non-paramétrique (Kruskall-Wallis) puis des tests de comparaison 2 à 2 (tests de Wilcoxon) ont été conduits afin d'établir la significativité entre les moyennes du contenu en métabolites et en transcrits entre les plantules non-inoculées et inoculées pour chaque cultivar. Le seuil de significativité a été fixé à $p<0,05$ pour les métabolites. Les substances ayant une différence significative à $p<0,1$ (tendance) ont aussi été reportées pour information. Pour les transcrits, le seuil a été établi à $p<0,05$ avec un fold-change (facteur de changement entre les conditions non-inoculée et inoculée pour chaque cultivar) supérieur à 2.

3. Résultats

3.1 Modification des métabolomes racinaire et foliaire

Au niveau des racines et des feuilles, 124 et 154 métabolites ont été annotés, respectivement, toutes conditions confondues. Ces métabolites appartiennent à différentes familles et voies métaboliques dont les métabolismes des sucres, de l'ascorbate et aldarate, des acides aminés, des polyols, de la purine et pyrimidine mais aussi des composés phénoliques, ou de la dégradation de l'aminobenzoate (Tableau 3.1). La figure 3.2 représente l'ensemble des

substances dont la teneur est modifiée par *A. lipoferum* CRT1 à $p<0,1$ en les contextualisant par rapport aux voies de biosynthèse comme définies par KEGG (http://www.genome.jp/kegg/).

Chez le cultivar Seiddi, 16 métabolites sont significativement différents entre les racines des plantules inoculées avec *A. lipoferum* CRT1 et celles des plantules non-inoculées ($p<0,05$ - Test de Wilcoxon) et 17 supplémentaires présentant une tendance significative à $p<0,1$. Tous sans exception présentent des augmentations de concentration dans les racines des plantules inoculées. Pour les feuilles de ce même cultivar, 21 métabolites sont significativement modifiés à $p<0,05$ et 14 additionnels à $p<0,1$. La majorité présente des diminutions de concentration chez les plantules inoculées. Dans le cultivar FuturiXX, 28 métabolites sont discriminants à $p<0,05$ entre les racines des plantules inoculées et non-inoculées et 13 additionnels à $p<0,1$. Dans les feuilles, la concentration de 11 métabolites a été significativement modifiée par l'inoculation à $p<0,05$ et de 19 additionnels à $p<0,1$.

Tableau 3.1 : Modifications métaboliques des racines (A) et feuilles (B) des 2 cultivars de maïs FuturiXX et Seiddi.

(A)

RACINES		evolution (%)	
		FuturiXX [a]	Seiddi [a]
SUGARS METABOLISM [b]			
Starch+sucrose :			
	Maltose	-36,8±20,2	55,5±8
	Sucrose	-39,5±15,5	30,6±8,7
	Trehalose, alpha,alpha'-	42,6±18,3	12,8±3,6
	Xylose	-3,1±12,4	16,1±13
	Maltotriose	-39,1±7	5,8±1,2
Sugar dimers :			
	Sophorose	-28,1±18,8	45,7±5,2
	Gentiobiose	-29,1±19,2	25,9±15,4
Fructose+mannose :			
	Mannose	10,3±8,1	38±7,1
	Fructose	-35,4±23,5	27,5±16,2
Galactose :			
	Galactinol	-74,9±18,6	180,3±19,2
	Galactonic acid	23,6±20,8	19,9±26,8
	Galactose	22,8±6,75	56±14,2
	Raffinose	-70,7±17,8	12,8±13,9
Pentose phosphate :			
	Gluconic acid	12,8±18,5	32,1±26,7
	Glycolic acid	-0,2±5,5	15,2±5,3
	Ribose	22,6±10,4	14,4±12,3
	Arabinose	25,7±16,3	24,6±19,2
Glycolysis +neoglucogenesis :			
	Lactic acid	56,9±3,1	17,7±5,9
	Glucose	-39,3±21,4	2,6±6,1
ASCORBATE AND ALDARATE METABOLISM [b]			
	Threonic acid	-2,9±13,9	1,2±19,4
	Galactaric acid	15,3±9,6	-23,7±14,5
	Lyxonic acid	19,7±11,3	36,5±5,7
TCA CYCLE [b]			
	Malic acid	-23,4±6	9,2±13,1
	Itaconic acid	25,9±8,1	68,4±14,3
	Aconitic acid, cis-	-43±22,2	-6±21,1
	Citric acid	-23,7±2,8	5,2±18,9
	Fumaric acid	17,6±8,7	13,3±9,2
	Fumaric acid, 2-methyl-	25,4±7,8	66,8±11,1
	Glutaric acid, 2-hydroxy-	0,6±6,8	0,8±5,2
	Glutaric acid, 2-oxo-	-17,5±6,5	13±11,8
AMINO ACIDS METABOLISM [b]			
Alanine, aspartic acid and glutamate :			
	Butanoic acid, 4-amino-	-6,7±18,3	4,1±22
	Aspartic acid	8,9±20,1	-6,1±14,5
	Alanine	-16,1±19,6	19,9±10,3
	Glutamic acid	25,8±36,2	-26,1±11,8
	Alanine, beta-	2,6±18,4	6,8±13
	Glutamine	1,4±0,5	NA
	Pyroglutamic acid+Glutamic acid+Gl	18,5±12,9	13,2±17,6
Histidine :			
	Histidine	NA	22,2±1,9
	Homoserine	-73,3±15,6	1,2±22,9
	Alanine, 3-cyano-	-28,3±13,4	-18,5±9,7
Arginine, Proline :			
	Proline	18,3±31,6	53,6±11,7
	Putrescine	-56,9±18,3	-18,9±14,2
Glycine, Serine, Threonine :			
	Glycine	-35,1±18,2	-6,2±5,8
	Serine	0,2±19,3	NA
	Threonine	-35,2±19,3	-3,2±14,2
	Propane, diamino-	11,1±2,2	51,7±7,7
	Glycine, N,N-dimethyl-	37,1±3,1	-17,6±8,6
Valine, Leucine, Ile :			
	Valine	12,5±12,1	-12,3±9,9
	Leucine	-6,1±25,2	56,8±19,7
	Isoleucine	-25,7±27,1	43,3±13,2
	Isocaproic acid, 2-oxo-	13,5±22	26,1±19,3
Aromatic amino acids :			
	Shikimic acid	21,3±6,8	1,6±2
	Quinic acid	-0,1±12,8	15,4±9
	Phenylalanine	-15±16,8	21,4±10,1
	Tyrosine	-38,2±10,3	19,5±12,7
POLYOLS [b]			
	Inositol, myo-	-14±16,6	18,4±11
	Arabitol	185,8±15,2	48,4±14,2
	Erythritol	33,6±12,9	34,2±6,5
	Glycerol	27,9±1,4	10,7±3,5
	Benzene-1,2,4-triol	-22,3±6,7	1,5±4,7

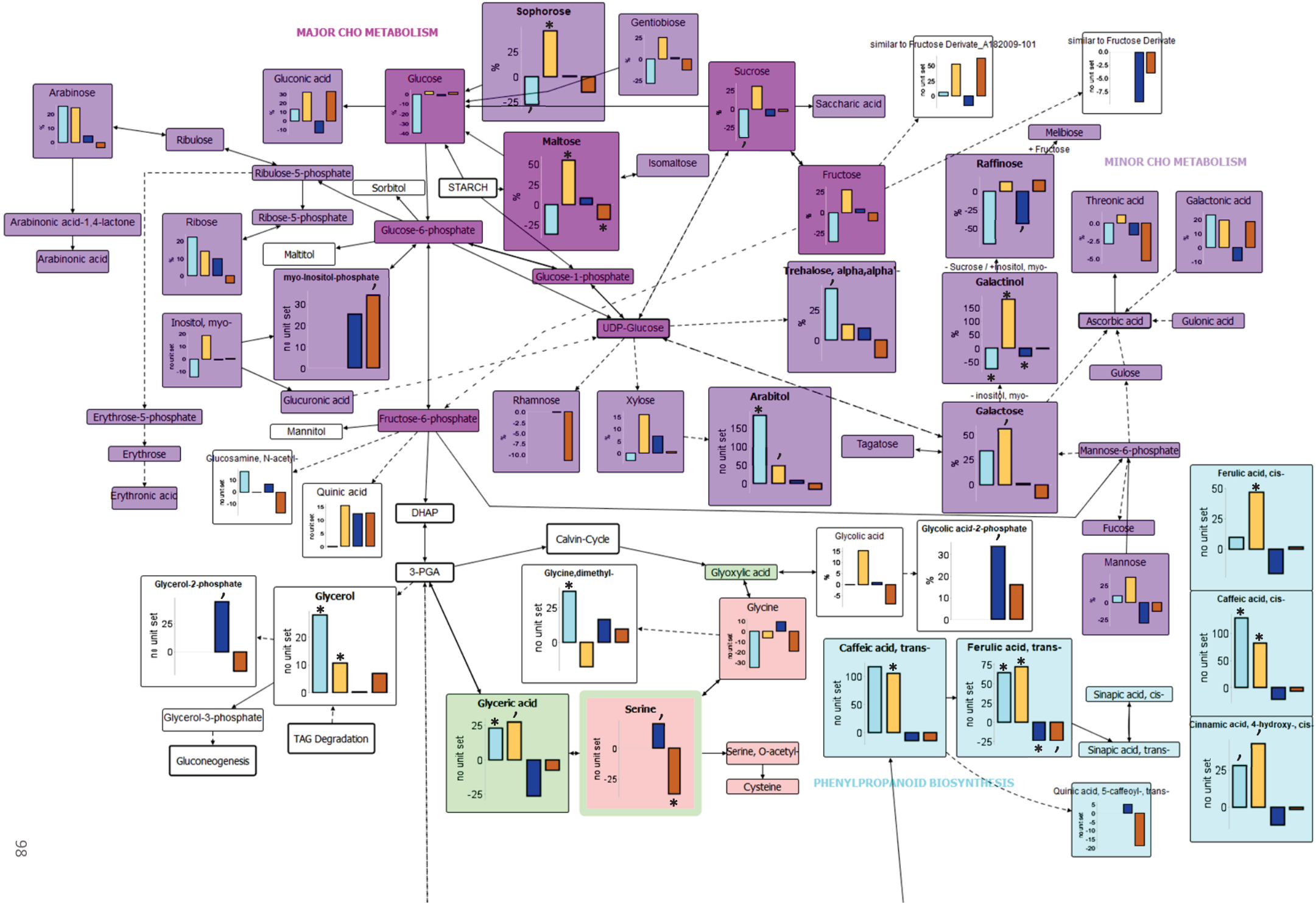
PHENOLIC COMPOUNDS [b]		
Ferulic acid, cis-	9,6±7,7	46,7±9,3
Ferulic acid, trans-	64,6±3,6	72,9±3,7
Cinnamic acid, 4-hydroxy-, cis-	27,7±7,1	42,8±7
Cinnamic acid, 4-hydroxy-, trans-	9,7±8	38,2±5,4
Caffeic acid, cis-	128±13,1	81,3±9,5
Acenaphthenequinone	47,4±5	-9,2±5,3
Caffeic acid, trans-	118,1±7,8	106,1±6,6
PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM [b]		
4-Methylbenzoic acid	88±9,3	48,8±8,9
Cytidine	NA	11,8±16,7
Uracil	32,3±6,9	-7,4±6,3
Adenine	-5,4±10,8	20,9±2,9
Allantoin	NA	4-26±7,6
Guanine	63,6±7,6	-6,8±4,7
Guanosine	-11,7±15,1	7,5±23,9
Guanosine, 2'-deoxy-	NA	-2,7±6,7
Thymine	51,5±9,5	70,2±5,2
Uridine	0,9±10,4	73±20,7
Inosine	10,2±3,4	-21±8,8
AMINOBENZOATE DEGRADATION		
Vanillic acid	-4,8±6,9	4,8±6,5
Catechol	13±10,8	NA
Vanillyl alcohol	-23,1±14,3	47,7±17,3
4-Hydroxybenzaldehyde	-5,3±6,4	1,8±6,7
OTHER PATHWAY METABOLITES b		
Isopentylamine	45,5±10,2	30,9±5,7
Butanoic acid, 2,4-dihydroxy-	12,5±3,3	11,9±7,6
Glyceric acid	23,2±4,4	27,6±9,1
Glucose, 1,6-anhydro-, beta-	53,9±10,4	-2,6±2,4
Phosphoric acid	48,8±1,3	11,8±7,1
Glucosamine, N-acetyl-	17,5±7,4	0,1±11,2
Nigerose	-31,6±12,2	52,2±3,1
Palatinose	-19,4±21,5	27,1±15,4
Ribofuranose, 2-deoxy-	97,6±13,9	64,6±14,8
Ethanolamine	15,6±1,8	2,6±1,4
UNKNOWN COMPOUNDS b		
A214003-101	10,6±13,1	26,6±16
NA213001	12,1±13	97,7±23,3
A252002-101	-16,5±9,4	52,5±14,7
A217004-101	142,2±7,2	NA
NA170001	-21,6±13,7	51±8,9
Unknown#bth-pae-013	32,5±4,5	23,9±6,8
similar to Fructose Derivate_A18200	6,4±1,3	52,9±20
similar to Glycerolaldopyranosid	-8,7±11,5	23,5±7,3
NA180001	2,8±6,1	34,8±6,3
A167003-101	NA	18±3,8
A311002-101	-11±16,9	18,9±9,5
A250001-101	49,7±11,2	46,6±24,9
A254002-101	105,7±12,6	38,5±12
A216002-101	87,6±25,7	2,9±3,4
A141003-101	50,4±15,8	16,6±33,5
A145008-101	NA	33,6±6,5
A159002-101	58,9±9,5	3,4±16,4
A182007-101	38,8±7,5	14,2±10,6
A203003-101	-33,1±19,5	5,2±9,9
A230002-101	12,1±13,7	13±17,2
A234001-101	NA	-5,3±1,3
A263002-101	-6,3±14,8	15±8,9
A273003-101	-19,1±8	-8,3±3,4
A275003-101	-16,8±15,8	18,2±15,9
NA147011	-1,1±13,1	-11,6±14,2
NA161010	17,7±3,6	-7,4±6
NA165004	60,7±8,1	30,1±7,4
NA170011	-11,3±3	-11±8,9
NA174031	32,6±6	18,3±12,1
NA176001	24,3±3,2	16,4±10,7
NA176004	-31,9±24,5	-8,7±13,9
NA181001	57,2±9,7	11,6±12,2

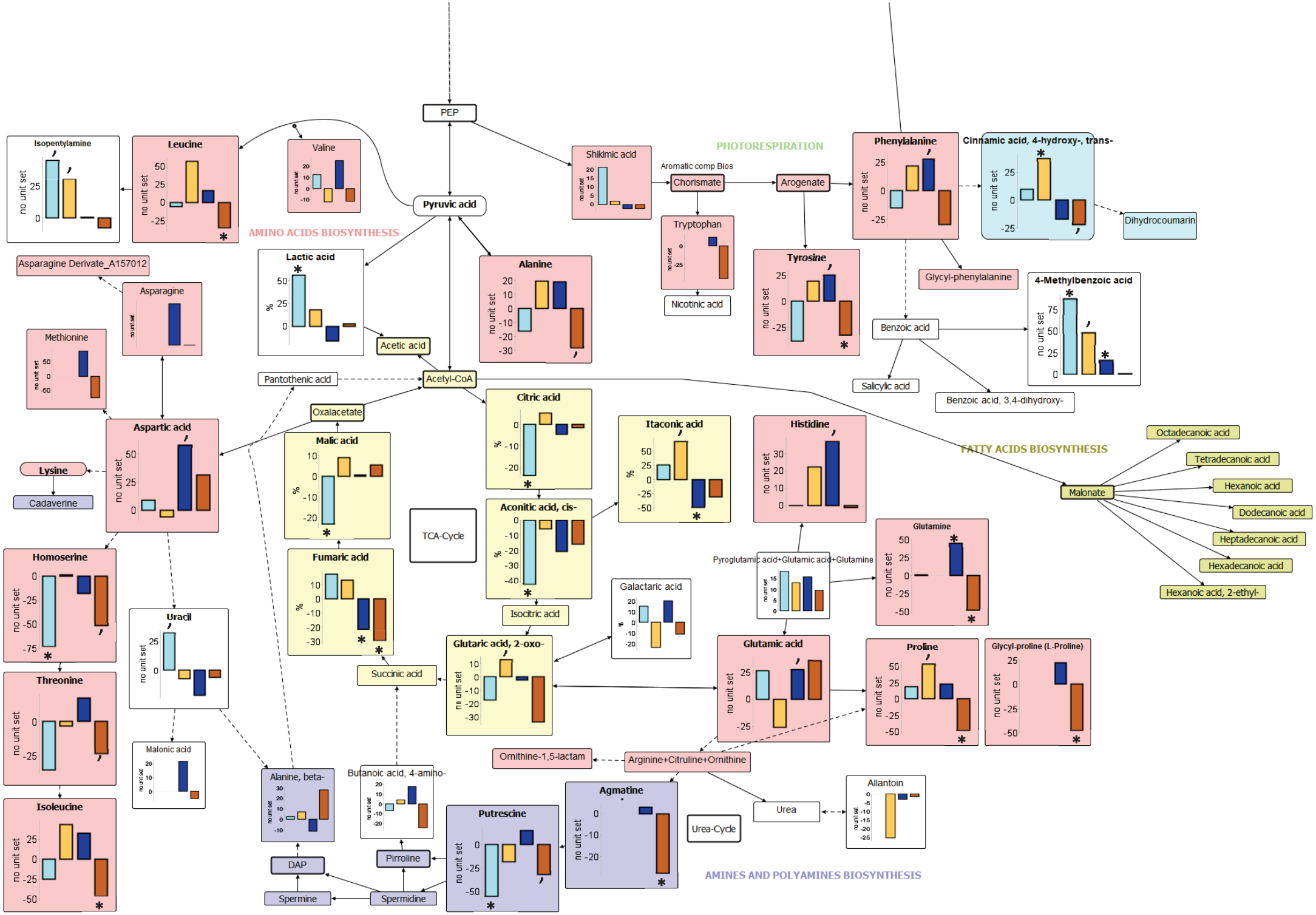
(B)

Leaves		evolution (%) FuturiXX [a]	evolution (%) Seiddi [a]
SUGARS METABOLISM [b]			
Starch+sucrose :			
	Maltose	8,6±5,7	-18±5
	Sucrose	-9,8±22,9	-3,4±21,2
	Trehalose, alpha,alpha'-	10±8,8	-14,2±8,2
	Xylose	7,1±5	0,8±5,3
	Maltotriose	14,2±10,7	-27,3±9,3
Sugar dimers :			
	Sophorose	1,1±5,5	-15,6±5
	Gentiobiose	1,8±10,7	-13±9,5
Fructose+mannose :			
	Mannose	-31,3±18,2	-13±11,3
	Fructose	4,3±8	-10,6±7
	Rhamnose	-0,1±7,5	-11,5±3,8
Galactose :			
	Galactinol	-30,1±12,4	-0,9±13,2
	Galactonic acid	-9,6±12,1	18,6±17,8
	Galactose	1,4±4,6	-13,3±9,1
	Raffinose	-43,9±20	14,4±14,9
Pentose phosphate :			
	Gluconic acid	-13,1±20,7	32,6±14
	Glycolic acid	0,8±3,7	-8,7±4,4
	Ribose	10,1±6,8	-4,3±7
	Glycolic acid-2-phosphate	33,9±5,9	16,1±7,8
	Arabinose	4,3±6,1	-3,8±5,7
Glycolysis +neoglucogenesis :			
	Lactic acid	-16,7±9,5	2,9±5,6
	Glucose	-1,7±5,9	2,2±4,3
ASCORBATE AND ALDARATE METABOLISM [b]			
	Threonic acid	-1,6±7,1	-5,3±8,2
	Galactaric acid	20,4±6	-11,2±9,3
	Lyxonic acid	-36,8±16,4	34,1±18,4
TCA CYCLE [b]			
	Malic acid	0,6±1,5	5,5±1,7
	Itaconic acid	-49,8±17,2	-30,6±18,6
	Aconitic acid, cis-	-20,6±10,4	-15,9±13,7
	Citric acid	-4,7±6,4	-1,5±7
	Fumaric acid	-21,6±7,7	-29,7±12,1
	Malic acid, 2-methyl-	7,3±10,5	-16,2±8,2
	Fumaric acid, 2-methyl-	-45,6±14,5	-35,9±13
	Glutaric acid, 2-hydroxy-	-21,5±11,1	-33,2±10,1
	Glutaric acid, 2-oxo-	-2,1±25	-33,7±22,9
AMINO ACIDS METABOLISM [b]			
Alanine, aspartic acid and glutamate :			
	Butanoic acid, 4-amino-	17,9±10,8	-24,9±8,7
	Aspartic acid	58,1±25,3	31,3±20
	Alanine	19±8,9	-28,4±12,5
	Glutamic acid	27,5±11,7	35,5±13,9
	Asparagine	NA	-10±13,2
	Alanine, beta-	-11,6±11,7	28,3±9,2
	Glutamine	45,7±11,9	-48,7±19,1
	Pyroglutamic acid+Glutami	15,9±6,8	9,7±7,9
Histidine :			
	Histidine	37,4±8,1	-1,5±5,8
Cysteine, Methionine :			
	Methionine	87,9±17,5	-76,2±19,5
	Homoserine	-18,3±23,7	-51,7±20,8
	Alanine, 3-cyano-	19,4±18,8	20,6±7,2
Arginine, Proline :			
	Proline	22,9±13,3	-48,8±20,6
	Putrescine	15,3±9,7	-33,1±12,8
	Agmatine	3,1±7,9	-28,3±9,9
	Glycyl-proline (L-Proline)	22,2±10,1	-47,8±18,5
Glycine, Serine, Threonine :			
	Glycine	9,5±10,1	-19,3±9,7
	Serine	19,6±8,1	-36,9±12,7
	Threonine	17,2±8,4	-23,5±7,9
	Tryptophan	12,5±13,6	-44,3±16
	Propane, diamino-	44,1±9	-18,6±8,9
	Glycine,dimethyl-	16,5±6,6	9,6±6,2
Valine, Leucine, Ile :			
	Valine	25,1±11,6	-11,2±12,6
	Leucine	16,5±7,3	-35,4±13,7
	Isoleucine	32,5±10,1	-47,2±15
	Isocaproic acid, 2-oxo-	5±11,1	-48,4±12,8
Aromatic amino acids :			
	Shikimic acid	-2,6±6,6	-2,5±5,1
	Quinic acid	12,3±10,8	12,8±6,9
	Phenylalanine	28,7±14,9	-29,9±17,7
	Quinic acid, 5-caffeoyl-, tra	5,5±8,5	-18,8±9,7
	Tyrosine	26±8,9	-32,3±12,7
POLYOLS [b]			
	Inositol, myo-	-1±1,2	0,6±2,2
	Glycerol-2-phosphate	44,6±14,4	-17,4±10,1
	Arabitol	8,5±9,1	-16,1±6
	Erythritol	-16,6±7,7	-10±8,1
	myo-Inositol-phosphate	25,4±7,8	34,4±11,7
	Glycerol	0,5±1,6	7,1±2,5
	Benzene-1,2,4-triol	-9±15,8	13,6±10,6
PHENOLIC COMPOUNDS [b]			
	Ferulic acid, cis-	-20,3±8,3	1,8±6,4
	Ferulic acid, trans-	-24,4±6,5	-23,5±8,7
	Cinnamic acid, 4-hydroxy-,	-12,2±6,3	-1,8±7
	Cinnamic acid, 4-hydroxy-,	-17±5,7	-22,3±9,3
	Caffeic acid, cis-	-21,1±14	-6,7±10,7
	Acenaphthenequinone	-4,9±7,1	-3,3±4,2
	Phenethylamine	11,8±7,3	8,3±11,5
	Phenol, 2-amino-	-17,5±14	-23,2±9,2
	Caffeic acid, trans-	-13,9±4,5	-14,8±8
PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM [b]			
	4-Methylbenzoic acid	16,8±3	0,8±4,2
	Cytidine	7,5±11,5	-44,8±16,9
	Uracil	-21,5±15,5	-6,3±9,3
	Adenine	8±6,1	10,9±4
	Allantoin	-2,9±4,5	-1,3±3,9
	Guanine	10,1±7	-16,5±7
	Guanosine	6,3±6,8	-20,9±6,6
	Guanosine, 2'-deoxy-	-4,2±7,1	-21,5±10,1
	Thymine	-34,6±13,7	-14,1±11,3
	Uridine	11,2±11,1	-41,8±17
	Cytosine, 5-methyl-	-15,8±13	27,2±16,6
	Adenosine, alpha-	NA	-20,4±10,2
	Inosine	-0,7±10,5	-7,7±9,1
	Malonic acid	21,9±12,8	-5,4±13,7
AMINOBENZOATE DEGRADATION b			
	Vanillic acid	-0,9±10	14,2±4,3
	Catechol	-11,7±8,1	-9,9±5
	Vanillyl alcohol	11±10,4	21,9±7,3
	4-Hydroxybenzaldehyde	-12,9±8,5	51,1±17,6
OTHER PATHWAY METABOLITES b			
	Isopentylamine	0,4±10,6	-8±9,7
	Butanoic acid, 2,4-dihydrox	-2,3±7	-21,5±7,1
	Glyceric acid	-26,7±9,4	-7,6±7,7
	Glucose, 1,6-anhydro-, beta	13,1±6,8	-19,7±7
	Phosphoric acid	10,8±3,4	0,1±3
	Glucosamine, N-acetyl-	6,6±6,8	-17,8±7,4
	Nigerose	17,3±7,6	-24,7±8,2
	Kestose, 1-	-55,4±18,5	-14,6±22,1
	Palatinose	5,7±6,6	-20,2±8,4
	Ribofuranose, 2-deoxy-	-7,2±4,7	1,8±7
	Levulinic acid	-6,1±3,6	3,3±4
	Ethanolamine	8,7±2,3	5,1±2,1
UNKNOWN COMPOUNDS b			
	A214003-101	-11,9±7,5	-19,6±5,1
	NA213001	-11,6±7,4	-18,6±5
	A252002-101	27,7±10,1	5,9±10
	A217004-101	127,2±25,8	-0,6±33,2
	NA170001	6,9±5	-14,7±3,4
	Unknown#bth-pae-013	-3,5±7,6	-20,6±7,9
	similar to Fructose Derivate	33,5±25,6	106,1±12,4
	similar to Fructose Derivate	-9,5±21,7	-4±10,3
	similar to Fructose Derivate	-15,5±33,3	62,3±13,6
	similar to Asparagine -H2O	NA	0±1,7
	similar to Glycerolaldopyra	-0,2±1,4	6,7±2,5
	NA180001	3,3±5	-20,1±7,4
	A249001-101	35,2±10,6	-0,7±10,9
	A167003-101	-2,3±11,7	-44,8±16,4
	A311002-101	-0,6±1,5	5,6±1,8
	A250001-101	-14±8,2	15,1±12
	A254002-101	-12,7±4,2	1,4±4,2
	A216002-101	18,9±10,9	-14,3±12,1
	A140003-101	-4,3±5,4	2±12,4
	A141003-101	32,2±12,8	-28,8±9,1
	A145008-101	1,5±10	-26,1±11,4
	A148006-101	240±14,4	-100±14,3
	A159002-101	-52,4±19,1	-41,1±16,5
	A182007-101	-3,8±5,9	1,7±4,4
	A203003-101	-17,7±10,2	-2,7±9,2
	A216003-101	-12,7±16,6	-41,2±12,1
	A230002-101	31,4±8,9	1,3±7,1
	A234001-101	16,2±7,3	-30,1±13,1
	A263002-101	-41,1±20,3	70,8±14,4
	A273003-101	-67,1±17,7	14,3±9,3
	A275003-101	25,3±10,9	16,6±11,2
	D292711	-6,9±8,4	-12,6±7
	D304560	-22,3±12,2	-0,4±13,5
	NA147011	6,5±8,1	18,2±4,1
	NA161010	28,3±11,8	14,3±7,9
	NA165004	15,1±7,8	20,6±6,6
	NA170011	34,2±16,5	-6,3±14,6
	NA174031	-19,9±10,4	12,2±11,6
	NA176001	-19,9±10,2	10,6±10,3
	NA176004	-6,6±6	-14,9±5,4
	NA181001	-2±5,3	5,3±4,7
	A144005-101	17,2±17,5	-25,4±16

[a]*Les ratios des valeurs moyennes des plantules inoculées sur les plantules non-inoculées sont exprimés en pourcentage ± l'erreur standard relative. Des tests non-paramétriques de Wilcoxon ont été réalisés pour chaque métabolites pour comparer les valeurs des inoculés et non-inoculés chez chaque cultivar. Ils sont exprimés par des nuances de gris du fond (gris foncé, $p<0.05$; gris clair, $p<0.1$; et blanc, $p>0.1$). Les NA indiquent que le métabolite a été détecté dans moins de 2 échantillons d'un réplicat biologique.*

[b]*Les métabolites ont été classes selon les bases de données de voies métaboliques de KEGG. Les métabolites pas encore identifiés sont notés selon les codes de la Golm Metabolome Database.*


MAJOR CHO METABOLISM
MINOR CHO METABOLISM
PHENYLPROPANOID BIOSYNTHESIS
Sophorose
Gentiobiose
Sucrose
Saccharic acid
Gluconic acid
Glucose
Arabinose
Ribulose
Ribulose-5-phosphate
Arabinonic acid-1,4-lactone
Arabinonic acid
Ribose
Ribose-5-phosphate
Sorbitol
STARCH
Maltose
Isomaltose
Fructose
Melibiose
+ Fructose
Raffinose
Threonic acid
Galactonic acid
Glucose-6-phosphate
Maltitol
Glucose-1-phosphate
myo-Inositol-phosphate
Inositol, myo-
Glucuronic acid
UDP-Glucose
Trehalose, alpha,alpha-
- Sucrose / + inositol, myo-
Galactinol
Ascorbic acid
Gulonic acid
Gulose
Erythrose-5-phosphate
Erythrose
Erythronic acid
Mannitol
Fructose-6-phosphate
Glucosamine, N-acetyl-
Quinic acid
Rhamnose
Xylose
Arabitol
Tagatose
- inositol, myo-
Galactose
Mannose-6-phosphate
Fucose
Mannose
DHAP
3-PGA
Calvin-Cycle
Glycolic acid
Glycolic acid-2-phosphate
Glycine,dimethyl-
Glyoxylic acid
Glycine
Glycerol-2-phosphate
Glycerol
Glycerol-3-phosphate
Gluconeogenesis
TAG Degradation
Glyceric acid
Serine
Serine, O-acetyl-
Cysteine
Caffeic acid, trans-
Ferulic acid, trans-
Sinapic acid, cis-
Sinapic acid, trans-
Quinic acid, 5-caffeoyl-, trans-
Ferulic acid, cis-
Caffeic acid, cis-
Cinnamic acid, 4-hydroxy-, cis-
no unit set


PEP
Pyruvic acid
Isopentylamine
Leucine
Valine
Shikimic acid
Aromatic comp Bios
Chorismate
Arogenate
PHOTORESPIRATION
Phenylalanine
Cinnamic acid, 4-hydroxy-, trans-
Dihydrocoumarin
Tryptophan
Nicotinic acid
Tyrosine
Glycyl-phenylalanine
4-Methylbenzoic acid
Benzoic acid
Salicylic acid
Benzoic acid, 3,4-dihydroxy-
AMINO ACIDS BIOSYNTHESIS
Asparagine Derivate_A157012
Asparagine
Lactic acid
Alanine
Acetic acid
Methionine
Pantothenic acid
Acetyl-CoA
Oxalacetate
Citric acid
Aspartic acid
Malic acid
Itaconic acid
Histidine
FATTY ACIDS BIOSYNTHESIS
Octadecanoic acid
Tetradecanoic acid
Hexanoic acid
Dodecanoic acid
Heptadecanoic acid
Hexadecanoic acid
Hexanoic acid, 2-ethyl-
Malonate
Lysine
Cadaverine
TCA-Cycle
Aconitic acid, cis-
Homoserine
Fumaric acid
Pyroglutamic acid+Glutamic acid+Glutamine
Glutamine
Galactaric acid
Isocitric acid
Uracil
Succinic acid
Glutaric acid, 2-oxo-
Glutamic acid
Proline
Glycyl-proline (L-Proline)
Threonine
Malonic acid
Ornithine-1,5-lactam
Arginine+Citruline+Ornithine
Alanine, beta-
Butanoic acid, 4-amino-
Agmatine
Allantoin
Urea
Urea-Cycle
Isoleucine
Putrescine
DAP
Pirroline
Spermine
Spermidine
AMINES AND POLYAMINES BIOSYNTHESIS
no unit set

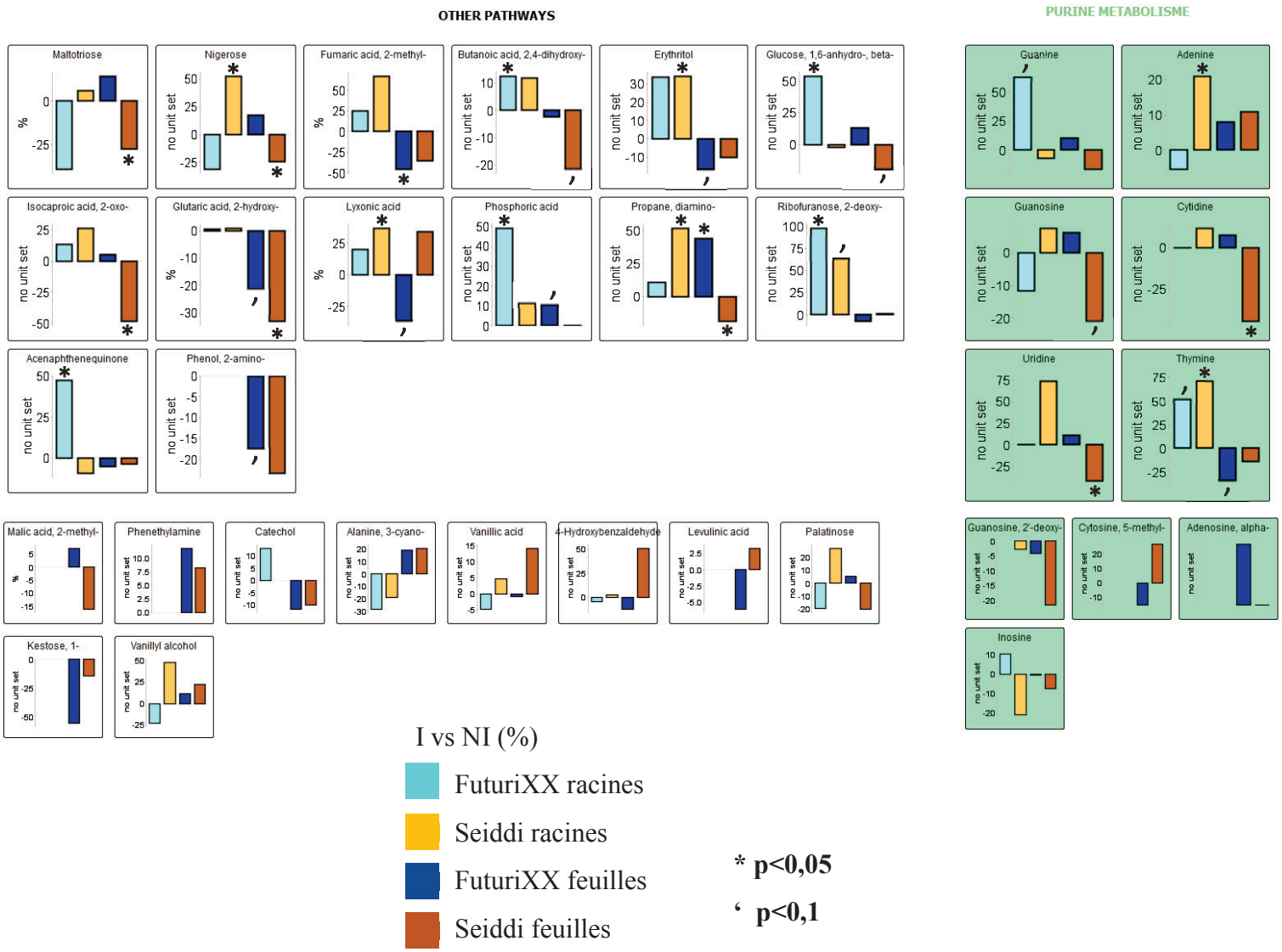


Figure 3.2 : Carte des voies métaboliques affectées par l’inoculation des 2 cultivars de maïs.

*Au niveau des histogrammes, le cultivar Seiddi apparaît dans les tons orange et FuturiXX en bleu, le compartiment racinaire étant d'une teinte claire et le compartiment foliaire d'une teinte foncée. Les différentes voies métaboliques sont différenciées par la couleur des cadres contenant les histogrammes. L’insertion des métabolites dans les voies a été réalisée à partir de KEGG (http://www.genome.jp/kegg/). Les métabolites discriminants pour au moins une condition sont illustrés dans des grands cadres et les non-significatifs dans des cadres plus petits. Les données sont montrées sous la forme de pourcentage du contenu pour la condition inoculée avec A. lipoferum CRT1 par rapport à la condition non-inoculée. Des tests non-paramétriques de Wilcoxon ont été réalisés (*p<0,05 et ‘p<0,1).*

Les teneurs d'un nombre plus important de métabolites s'avère donc être modifiées dans les racines du cultivar FuturiXX que chez Seiddi après inoculation par *A. lipoferum* CRT1 malgré son absence de réponse morphologique et photosynthétique à l'agent bactérien. Néanmoins, les jeux de métabolites affectés par l'inoculation sont majoritairement différents chez les deux cultivars. Notamment, chez le cultivar Seiddi, une augmentation spécifique des teneurs de différents sucres comme le maltose et le sophorose est observée. Dans le métabolisme de la purine et de la pyrimidine, la concentration en adénine et en thymine est de même augmentée lors de l'inoculation du cultivar Seiddi avec la PGPR. Chez FuturiXX, nous pouvons noter une diminution importante des teneurs des composés du cycle de Krebs comme les acides malique et citrique et ainsi que de l'homosérine et de la putrescine. Dans les racines des deux cultivars, nous observons néanmoins certaines modifications communes qui sont donc plus associés à un mécanisme général d'interaction entre le maïs et la bactérie qu'à l'impact de la bactérie sur la morphologie et la photosynthèse de son hôte. Il s'agit de composés phénoliques (acides férulique, caféique et une tendance pour l'acide 4-hydroxycinnamique) dont la concentration augmente dans les racines des plantules inoculées. Un autre composé, le galactinol, est intéressant car sa concentration augmente significativement dans les racines du cultivar Seiddi inoculé (180,3±19,2%) alors qu'elle diminue dans celles du cultivar FuturiXX inoculé (-74,9±18,6%).

A l'inverse un nombre beaucoup plus important de métabolites voit sa teneur modifiée par l'inoculation dans les feuilles du cultivar Seiddi que du cultivar FuturiXX, indiquant un effet systémique plus marqué. Spécifiquement dans les feuilles de Seiddi, nous observons notamment une diminution des concentrations de certains sucres (*i.e* maltose et maltotriose) mais aussi d'acides aminés, ou affiliés, comme la proline, l'agmatine, la L-proline, la sérine, la leucine, l'isoleucine et l'acide 2-oxoisocaproique. De même, des diminutions significatives des teneurs en cytidine, uridine et en nigérose sont à noter pour ce cultivar lorsqu'il est inoculé. Chez le cultivar FuturiXX, une diminution spécifique de la concentration en galactinol est observée chez les plantules inoculées de même que plusieurs composés du cycle de Krebbs (acides itaconique, *cis*-aconitique, et 2-méthylfumarique). De même, le métabolisme des composés phénoliques est touché par l'inoculation chez le cultivar FuturiXX avec une diminution significative de l'acide férulique, et une tendance à la diminution pour l'acide 4-hydroxycinnamique, l'acide caféique et le 2-aminophénol. Les teneurs en acide fumarique réagissent similairement chez les 2 cultivars avec une diminution de concentration dans les feuilles des plantules inoculées. Les teneurs en glutamine quant à elles varient à l'opposé chez

les 2 cultivars avec une augmentation de concentration chez le cultivar FuturiXX inoculé (45,7±11,9%) et une diminution chez le cultivar Seiddi (-48,7±19,1%).

Différents métabolites se sont avérés discriminer les plantules inoculées et non-inoculées à la fois dans les racines et dans les feuilles. Chez le cultivar Seiddi, tous ces composés ont une concentration qui augmente dans les racines et diminue dans les feuilles des plantules inoculées. C'est le cas pour le maltose (55,5±8% dans les racines et -18±5% dans les feuilles), le sophorose, la proline, l'acide férulique, et le nigérose. Chez le cultivar FuturiXX, les composés dont les teneurs sont modifiées par l'inoculation dans les 2 compartiments le sont dans le même sens. Les concentrations du galactinol et du raffinose diminuent dans les racines et les feuilles des plantules inoculées (-74,9±18,6% et -70,7±17,8% dans les racines et -30,1±12,4% et -43,9±20% dans les feuilles, respectivement), alors qu'elles augmentent pour le diaminopropane, l'acide méthylbenzoique, l'acide phosphorique et l'éthanolamine. Pour les deux composés phénoliques suivants, acides férulique et caféique, des modifications des teneurs similaires à celles observées dans le cultivar Seiddi ont été observées avec une augmentation dans les racines des plantules inoculées (64,6±3,6% et 118,1±7,8%, respectivement) et une diminution dans les feuilles (-24,4±6,5% et -13,9±4,5%).

3.2 Modifications globales des transcriptomes racinaire et foliaire

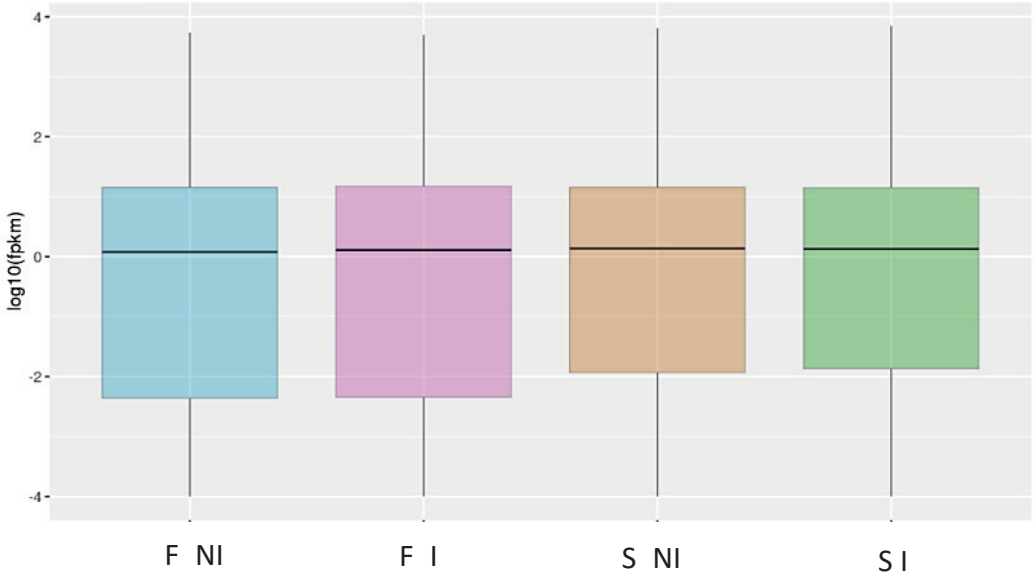
Une vérification initiale de quantité (par dosage au Qubit) et qualité des extraits d'ARN réalisés (QC) a été menée dans un premier temps. Les ratios d'ARNr 28S/18S, l'aire du 5S et un score de la qualité des ARN ont notamment été déterminés (Tableau 3.2). 2 µL de chaque échantillon a été chargé sur une LabChip GX et leur concentration, pureté et dispersion par rapport à la moyenne ont été évaluées (Figure 3.3, A-F). Tous ces tests révèlent que les qualités et concentrations des 40 extraits d'ARN sont homogènes. Leur séquençage a donc été réalisé.

L'identification des transcrits dont les séquences ont été obtenues a été réalisée sur la base de la version AGPv4 du génome du maïs. La qualité du séquençage et des données obtenues a pu être vérifiée par le pourcentage de séquences présentant un match et le pourcentage de couverture du génome. Pour tous nos extraits, le pourcentage de séquences présentant un match était compris entre 82.2 et 89.3 % (Tableau 3.3). Ceci est en accord avec la qualité de nos extraits et permet d'envisager les analyses statistiques sans risques de biais préliminaires de manipulation.

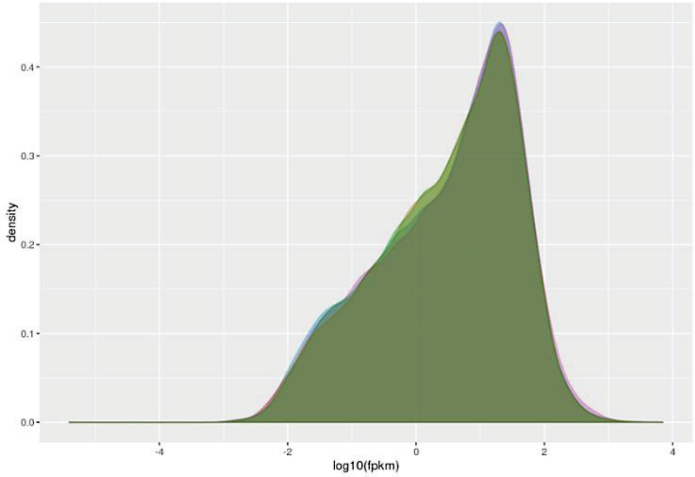
Tableau 3.2 : Initial quality check des extraits d'ARN (JEQ1 à JQ40)

Plate Name	Well Label	Sample Name	Peak Count	Total Conc. (ng/ul)	RNA Area	rRNA Area Ratio [28S/18S]	rRNA Height Ratio [28S/18S]	rRNA Fast Area Ratio	RNA Quality Score	5S Area	5S % Total	18S Area	18S % Total	28S Area	28S % Total
JEQ-1-40	Ladder01	Ladder1		83.30	203.90										
JEQ-1-40	A13	JEQ-1	13	43.63	108.62	2.10	1.54	0.30	7.9	2.41	2.2%	16.40	15.1%	34.39	31.7%
JEQ-1-40	C13	JEQ-2	3	4.55	11.33	2.14	1.44	0.29	7.9	0.31	2.8%	2.00	17.7%	4.28	37.8%
JEQ-1-40	E13	JEQ-3	3	3.83	9.57	1.93	1.60	0.22	9.3	0.12	1.3%	2.50	26.1%	4.83	50.5%
JEQ-1-40	G13	JEQ-4	4	5.51	13.71	1.63	1.13	0.45	6.7	0.29	2.1%	2.22	16.2%	3.62	26.4%
JEQ-1-40	I13	JEQ-5	4	11.22	27.25	2.18	1.59	0.29	7.9	0.41	1.5%	3.91	14.3%	8.51	31.2%
JEQ-1-40	K13	JEQ-6	10	47.14	117.71	2.26	1.74	0.18	8.8	2.97	2.5%	20.32	17.3%	45.93	39.0%
JEQ-1-40	M13	JEQ-7	12	49.72	109.66	1.69	1.06	0.44	6.3	3.07	2.8%	12.18	11.1%	20.58	18.8%
JEQ-1-40	O13	JEQ-8	11	38.76	85.15	1.81	1.15	0.44	6.4	1.97	2.3%	9.38	11.0%	16.95	19.9%
JEQ-1-40	B13	JEQ-9	12	29.50	74.66	1.19	0.70	0.63	4.5	1.47	2.0%	4.99	6.7%	5.95	8.0%
JEQ-1-40	D13	JEQ-10	12	32.35	82.07	1.14	0.69	0.64	4.5	1.69	2.1%	5.74	7.0%	6.54	8.0%
JEQ-1-40	F13	JEQ-11	5	14.95	36.92	1.92	1.46	0.28	7.9	1.36	3.7%	6.57	17.8%	12.64	34.2%
JEQ-1-40	H13	JEQ-12	12	50.26	126.05	2.17	1.61	0.25	8.4	2.77	2.2%	20.60	16.3%	44.78	35.5%
JEQ-1-40	J13	JEQ-13	11	46.14	115.65	1.92	1.27	0.43	6.8	2.68	2.3%	14.33	12.4%	27.49	23.8%
JEQ-1-40	L13	JEQ-14	16	74.08	182.02	2.05	1.47	0.35	7.3	3.81	2.1%	24.24	13.3%	49.59	27.2%
JEQ-1-40	N13	JEQ-15	7	39.91	87.99	2.10	1.75	0.23	8.5	1.94	2.2%	14.82	16.8%	31.08	35.3%
JEQ-1-40	P13	JEQ-16	9	44.59	98.45	2.23	1.59	0.23	8.4	2.66	2.7%	16.11	16.4%	35.94	36.5%
JEQ-1-40	A14	JEQ-17	14	72.55	159.81	2.20	1.62	0.22	8.7	3.62	2.3%	28.37	17.8%	62.36	39.0%
JEQ-1-40	C14	JEQ-18	10	37.44	82.75	2.14	1.58	0.22	8.5	2.26	2.7%	14.40	17.4%	30.84	37.3%
JEQ-1-40	E14	JEQ-19	11	42.23	92.06	2.32	1.68	0.29	8.0	2.31	2.5%	13.26	14.4%	30.77	33.4%
JEQ-1-40	G14	JEQ-20	11	56.35	121.55	2.06	1.15	0.42	6.7	2.62	2.2%	13.84	11.4%	28.45	23.4%
JEQ-1-40	I14	JEQ-21	9	51.05	117.74	1.25	0.96	0.30	7.9	2.51	2.1%	26.75	22.7%	33.45	28.4%
JEQ-1-40	K14	JEQ-22	8	27.74	64.71	1.22	0.94	0.30	7.7	1.17	1.8%	14.17	21.9%	17.26	26.7%
JEQ-1-40	M14	JEQ-23	9	56.31	129.79	1.23	0.94	0.28	7.9	4.27	3.3%	29.68	22.9%	36.57	28.2%
JEQ-1-40	O14	JEQ-24	9	52.94	123.34	1.02	0.90	0.40	6.7	3.92	3.2%	21.77	17.7%	22.20	18.0%
JEQ-1-40	B14	JEQ-25	9	86.28	187.69	1.21	0.99	0.28	8.0	5.74	3.1%	44.02	23.5%	53.42	28.5%
JEQ-1-40	D14	JEQ-26	6	54.22	119.01	1.19	0.89	0.34	7.4	2.68	2.3%	24.94	21.0%	29.66	24.9%
JEQ-1-40	F14	JEQ-27	10	51.48	114.64	1.09	0.94	0.45	6.5	2.33	2.0%	18.74	16.3%	20.36	17.8%
JEQ-1-40	H14	JEQ-28	9	52.16	113.42	1.17	0.88	0.34	7.4	2.70	2.4%	24.16	21.3%	28.18	24.8%
JEQ-1-40	J14	JEQ-29	10	47.24	108.03	1.07	0.92	0.43	6.5	2.81	2.6%	17.31	16.0%	18.44	17.1%
JEQ-1-40	L14	JEQ-30	8	43.83	100.46	1.13	0.95	0.34	7.3	2.45	2.4%	20.08	20.0%	22.79	22.7%
JEQ-1-40	N14	JEQ-31	9	50.12	113.81	1.28	1.02	0.29	8.0	2.52	2.2%	26.77	23.5%	34.16	30.0%
JEQ-1-40	P14	JEQ-32	10	55.59	127.23	1.16	1.03	0.29	7.9	2.46	1.9%	29.54	23.2%	34.38	27.0%
JEQ-1-40	A15	JEQ-33	8	35.56	79.87	1.22	0.98	0.29	7.9	1.70	2.1%	18.33	23.0%	22.30	27.9%
JEQ-1-40	C15	JEQ-34	8	39.90	91.53	1.15	1.00	0.28	8.0	1.93	2.1%	22.25	24.3%	25.63	28.0%
JEQ-1-40	E15	JEQ-35	9	51.47	118.77	1.23	1.07	0.27	8.0	2.67	2.2%	26.74	22.5%	32.80	27.6%
JEQ-1-40	G15	JEQ-36	7	48.15	112.00	1.24	0.97	0.31	7.7	3.20	2.9%	24.47	21.9%	30.29	27.0%
JEQ-1-40	I15	JEQ-37	9	42.10	102.45	1.10	0.88	0.30	7.8	1.97	1.9%	24.27	23.7%	26.60	26.0%
JEQ-1-40	K15	JEQ-38	8	54.04	131.68	1.11	0.90	0.30	7.8	3.14	2.4%	31.41	23.9%	34.71	26.4%
JEQ-1-40	M15	JEQ-39	9	50.66	122.73	1.15	0.96	0.32	7.6	2.34	1.9%	27.22	22.2%	31.35	25.5%
JEQ-1-40	O15	JEQ-40	12	56.89	141.44	1.17	0.95	0.28	7.8	3.19	2.3%	32.50	23.0%	37.88	26.8%
JEQ-1-40	Ladder04	Ladder4		83.30	198.86										

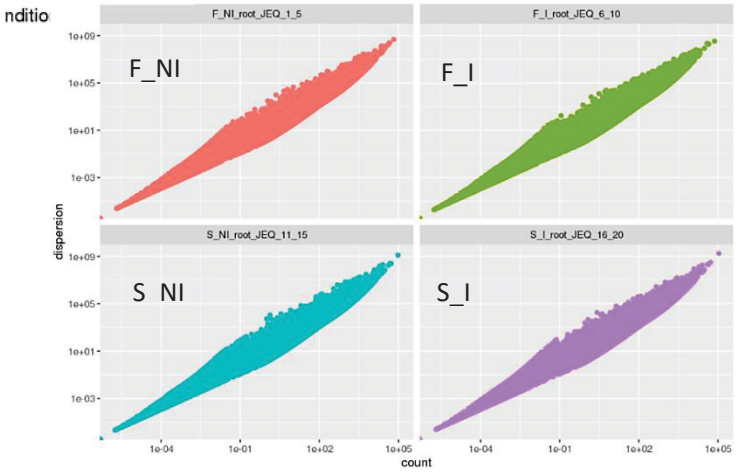
(A)


log10(fpkm)
4
2
0
-2
-4
F NI
F I
S NI
S I

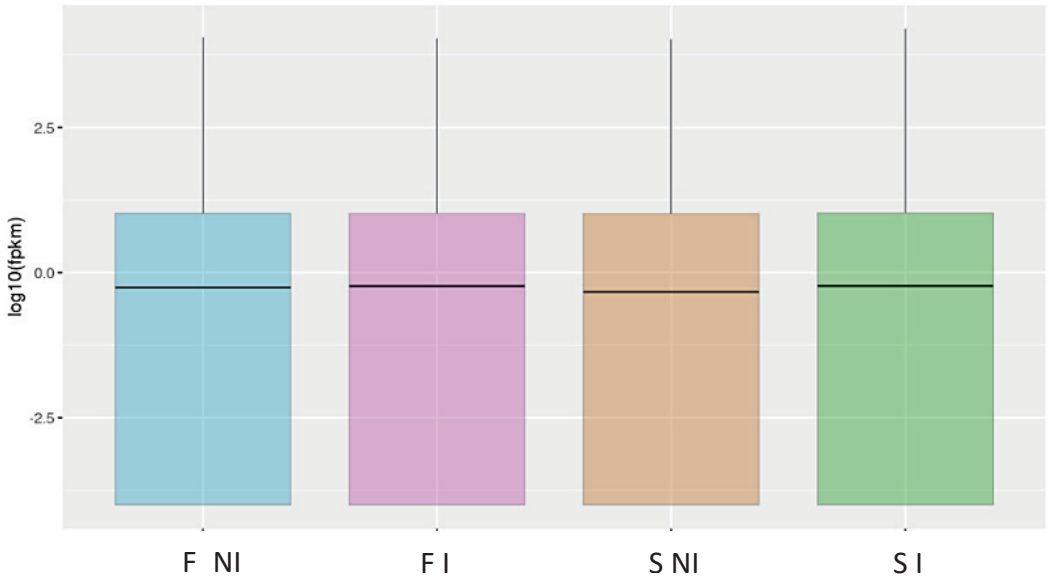
(B)


density
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-4
-2
0
2
4
log10(fpkm)

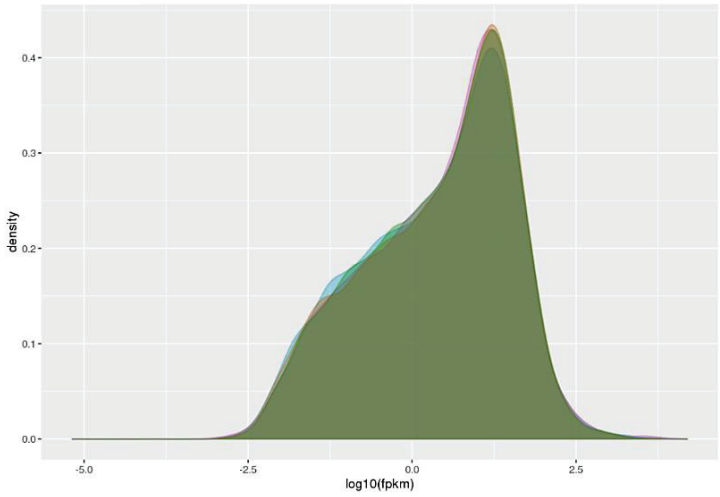
(C)


nditio
F_NI_root_JEQ_1_5
F_I_root_JEQ_6_10
S_NI_root_JEQ_11_15
S_I_root_JEQ_16_20
F_NI
F_I
S NI
S_I
dispersion
1e+09
1e+05
1e+01
1e-03
1e-04
1e-01
1e+02
1e+05
count

(E)



(F)



(G)

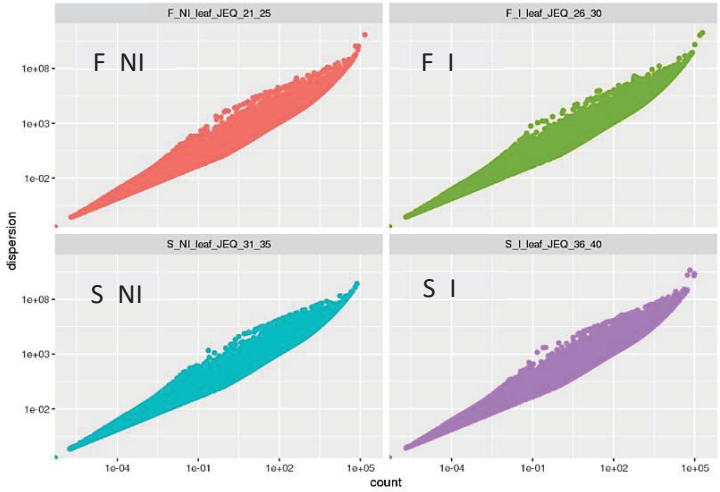


Figure 3.3 : Distribution sous forme de boite à moustache (A, D), courbe de distribution (B, E) et quartile contre quartile (C, F) des abondances des transcrits des racines (A, B, C) et feuilles (D, E, F).

Tableau 3.3 : Pourcentage de séquences présentant un match pour chaque échantillon par rapport à la séquence AGPv4 du génome du maïs.

read set	# PE reads	# reads	# mapped (primary)	% mapped	# secondary mappings
JEQ-1	23'825'300	47'650'600	41'813'683	87.75%	13'428'264
JEQ-2	28'805'245	57'610'490	49'448'960	85.83%	11'431'817
JEQ-3	24'771'166	49'542'332	43'201'762	87.20%	12'199'189
JEQ-4	25'208'613	50'417'226	43'592'270	86.46%	11'191'227
JEQ-5	25'585'872	51'171'744	44'620'770	87.20%	11'075'594
JEQ-6	32'290'774	64'581'548	56'236'140	87.08%	14'540'005
JEQ-7	26'698'092	53'396'184	46'708'286	87.47%	10'678'467
JEQ-8	25'809'547	51'619'094	43'908'299	85.06%	9'566'981
JEQ-9	24'092'725	48'185'450	39'959'412	82.93%	10'638'404
JEQ-10	31'056'115	62'112'230	51'055'638	82.20%	16'794'323
JEQ-11	29'841'668	59'683'336	51'320'042	85.99%	14'003'785
JEQ-12	29'971'907	59'943'814	51'962'395	86.69%	16'529'061
JEQ-13	27'242'588	54'485'176	45'522'455	83.55%	18'358'852
JEQ-14	28'247'744	56'495'488	48'142'606	85.21%	14'024'501
JEQ-15	30'045'596	60'091'192	51'234'713	85.26%	17'649'815
JEQ-16	26'283'686	52'567'372	45'072'919	85.74%	12'175'135
JEQ-17	29'068'417	58'136'834	49'484'898	85.12%	14'308'440
JEQ-18	24'298'675	48'597'350	41'420'571	85.23%	11'906'249
JEQ-19	30'501'368	61'002'736	52'479'173	86.03%	19'574'896
JEQ-20	27'200'048	54'400'096	45'178'453	83.05%	11'561'535
JEQ-21	26'215'234	52'430'468	45'300'460	86.40%	29'714'222
JEQ-22	27'563'341	55'126'682	49'171'652	89.20%	30'163'926
JEQ-23	32'750'834	65'501'668	58'139'259	88.76%	34'108'399
JEQ-24	29'975'311	59'950'622	52'787'999	88.05%	30'904'331
JEQ-25	25'603'257	51'206'514	45'645'607	89.14%	21'525'765
JEQ-26	29'777'599	59'555'198	52'799'612	88.66%	31'605'354
JEQ-27	24'182'394	48'364'788	42'842'563	88.58%	23'100'821
JEQ-28	25'114'802	50'229'604	44'855'717	89.30%	22'530'873
JEQ-29	24'725'034	49'450'068	43'844'813	88.66%	23'691'606
JEQ-30	28'188'841	56'377'682	49'676'403	88.11%	26'634'257
JEQ-31	24'649'967	49'299'934	43'198'242	87.62%	22'610'198
JEQ-32	24'232'929	48'465'858	42'296'953	87.27%	21'593'152
JEQ-33	23'768'894	47'537'788	41'478'324	87.25%	21'733'022
JEQ-34	28'996'492	57'992'984	50'837'163	87.66%	25'536'950
JEQ-35	27'027'001	54'054'002	47'093'285	87.12%	23'464'369
JEQ-36	27'880'265	55'760'530	48'659'128	87.26%	27'824'580
JEQ-37	24'330'030	48'660'060	42'079'288	86.48%	26'093'279
JEQ-38	27'503'856	55'007'712	49'038'745	89.15%	24'660'768
JEQ-39	25'346'698	50'693'396	43'607'320	86.02%	26'657'341
JEQ-40	25'190'646	50'381'292	43'975'128	87.28%	28'366'421

Toutes conditions confondues, 32637 et 27022 transcrits ont été respectivement annotés dans les racines et feuilles. Chez Seiddi, 91 et 678 avaient des teneurs significativement différentes une fois les plantules inoculées (Figure 3.4, A et B). Les proportions de transcrits présentant des abondances différentes après inoculation bactérienne étaient respectivement de 672 et 892 chez FuturiXX. Il est très intéressant de noter que les expressions de 2639 gènes dans les racines

et 2459 gènes dans les feuilles sont significativement différentes entre les deux cultivars dans des états non-inoculés (p<0,05 - ANOVA non-paramétrique) soit plus de 8% et 9,1% des transcrits totaux des racines et des feuilles, respectivement. Des différences plus importantes que celles induites par l'agent bactérien.

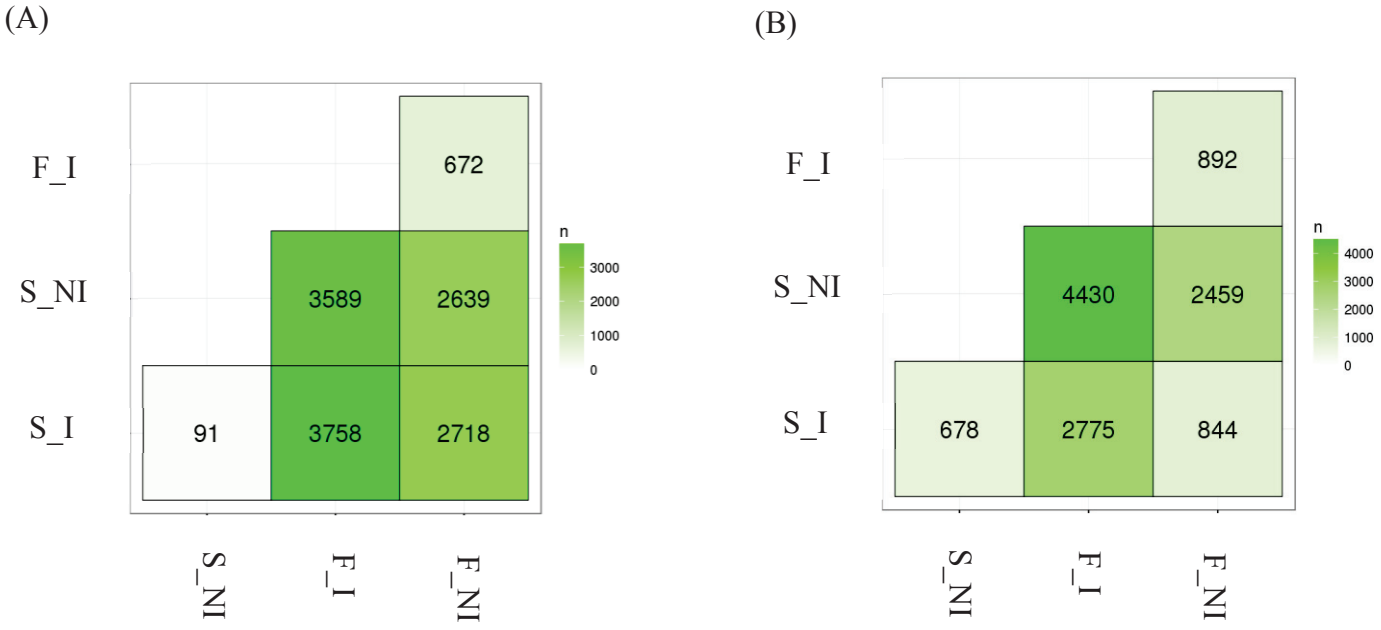


Figure 3.4 : Visualisation de la répartition des transcrits dont les teneurs sont significativement différentes entre deux conditions.

Les conditions comparées correspondent aux compartiments racinaires (A) et foliaires (B) des plantules de 12 jours de deux cultivars de maïs, FuturiXX (F) et Seiddi (S), non-inoculées (NI) ou inoculées (I) avec A. lipoferum CRT1. La significativité des teneurs des transcrits a été testé par ANOVA non-paramétrique puis par des tests 2x2 de Wilcoxon et établie à p<0,05.

Pour limiter le nombre de faux-positifs dans les analyses ultérieures, un seuillage supplémentaire des transcrits présentant une valeur de *p* inférieure à 0,05 a été réalisé en sous-sélectionnant ceux ayant un facteur de changement supérieur à 2 (FC>2) après inoculation avec *A. lipoferum* CRT1 (Tableau 3.4). Cette sous-sélection présente désormais des p<0,005 (Wilcoxon test). Au niveau du compartiment foliaire, 99 et 69 transcrits sont sur-régulés et 9 et 58 sous-régulés lors de l'inoculation de Seiddi et FuturiXX, respectivement. Au niveau des racines, l'expression de 5 et 7 transcrits est significativement augmentée et celle de 6 et 4 transcrits diminuée lors de l'inoculation de Seiddi et FuturiXX, respectivement.

Tableau 3.4 : Modifications significatives (p<0,05, FC>2) d'abondance de transcrits au niveau du compartiment foliaire (A) et racinaire (B) chez les cultivars Seiddi (fond en orange sur la colonne de gauche) et FuturiXX (fond en gris sur la colonne de gauche).

(A)

I vs NI [a]	Ensembl id [b]	Uniprot [b]	locus	fold-change	p-value	Fontion du gène [b]
Seiddi	Zm00001d004279_T001	A0A1D6EEQ1	2:99777894-99783642	4.59219	5,00E-05	1,8-cineole synthase 1 chloroplastic
Seiddi	Zm00001d043571_T001	A0A1D6NDD0	3:204234232-204243376	4.37033	5,00E-05	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
Seiddi	Zm00001d020867_T001	A0A1D6I6P5	7:135064148-135071720	3.433	5,00E-05	Subtilisin-like protease SBT5.3
Seiddi	Zm00001d044426_T001	B6U5G7	3:227713189-227714813	2.69521	5,00E-05	DnaJ-like protein
Seiddi	Zm00001d029028_T001	C0P445	1:55246804-55247371	2.51038	5,00E-05	Calcium-binding protein CML42
Seiddi	Zm00001d038751_T001	B4FLU2	6:163857512-163860102	2.39065	5,00E-05	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
Seiddi	Zm00001d037872_T001	C0HFS2	6:140520703-140530189	2.12747	5,00E-05	Protein BONZAI 3
Seiddi	Zm00001d027929_T001	C0PJT2	1:17839867-17840788	2.08005	5,00E-05	AP2-EREBP transcription factor
Seiddi	Zm00001d007865_T001	A0A1D6F9C8	2:241256309-241261093	2.05777	5,00E-05	CSC1-like protein ERD4
Seiddi	Zm00001d012585_T001	K7W3W6	8:176892932-176893658	2.07038	5,00E-05	Putative AP2/EREBP transcription factor superfamily protein
Seiddi	Zm00001d041788_T001	A0A1D6MY81	3:138093725-138100085	-2.18093	5,00E-05	Protein SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3
Seiddi	Zm00001d023759_T001	A0A1D6IVF6	10:19056768-19063074	6.31981	5,00E-05	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO4
Seiddi	Zm00001d003750_T001	A0A1D6EBE4	2:57475946-57481107	2.49258	5,00E-05	Digalactosyldiacylglycerol synthase 1 chloroplastic
Seiddi	Zm00001d002550_T001	A0A1D6E1W5	2:15225587-15227399	2.39728	5,00E-05	Pentatricopeptide repeat-containing protein chloroplastic
Seiddi	Zm00001d033316_T001	C0PGH5	1:258846262-258847552	2.22537	5,00E-05	Non-specific serine/threonine protein kinase
Seiddi	Zm00001d035767_T001	A0A1D6LIQ1	6:46577783-46579578	2.27667	5,00E-05	Jasmonate O-methyltransferase
Seiddi	Zm00001d025401_T001	A8IK79	10:117126776-117127673	2.06642	5,00E-05	Abscisic acid stress ripening5
Seiddi	Zm00001d035409_T001	A0A1D6LGB1	6:24606672-24607624	5.42998	5,00E-05	Abscisic stress-ripening protein 2
Seiddi	Zm00001d052827_T001	B4FVQ7	4:202042492-202044024	3.16559	5,00E-05	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
Seiddi	Zm00001d041418_T001	B4FD48	3:118360549-118362225	2.92201	5,00E-05	Auxin-responsive protein
Seiddi	Zm00001d017766_T001	A0A1D6HHH7	5:206199092-206201012	2.65428	5,00E-05	Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase8
Seiddi	Zm00001d017762_T004	C0PID5	5:206138067-206140902	2.6404	5,00E-05	Abscisic acid 8'-hydroxylase1
Seiddi	Zm00001d028793_T001	A0A075T3F1	1:46498732-46499395	2.38067	5,00E-05	Abscisic acid receptor PYL5
Seiddi	Zm00001d026191_T001	B4G0P7	10:140619550-140620363	2.16814	5,00E-05	AP2-EREBP transcription factor
Seiddi	Zm00001d043205_T001	A0A1D6N9I7	3:191580134-191580848	2.11885	5,00E-05	Ethylene-responsive transcription factor 4
Seiddi	Zm00001d020852_T001	C0PCY6	7:134723868-134728829	3.29138	5,00E-05	Cellulose synthase-like protein E1
Seiddi	Zm00001d043047_T001	Q94KT7	3:187342505-187347984	2.99931	5,00E-05	Alpha-expansin 1
Seiddi	Zm00001d029307_T001	A0A1D6K471	1:65560690-65565363	5.4981	5,00E-05	Triosephosphate isomerase cytosolic
Seiddi	Zm00001d032187_T001	B4FG53	1:216170770-216171955	2.38861	5,00E-05	Malate dehydrogenase
Seiddi	Zm00001d032870_T001	A0A1D6KUL0	1:240941210-240943277	2.01768	5,00E-05	L-type lectin-domain containing receptor kinase V.9
Seiddi	Zm00001d041777_T001	A0A1D6MY43	3:137266060-137269605	-2.2623	5,00E-05	Beta-glucosidase 17
Seiddi	Zm00001d048907_T001	A0A1D6PR44	4:7659034-7664153	-2.01385	5,00E-05	Mannose-6-phosphate isomerase
Seiddi	Zm00001d048021_T001	C0P4G2	9:148185905-148187354	2.3245	5,00E-05	Putative cytochrome P450 superfamily protein
Seiddi	Zm00001d041672_T001	B4FBW9	3:132881407-132881963	2.32445	5,00E-05	Histone H3.2
Seiddi	Zm00001d042649_T001	A0A1D6N5S0	3:175280640-175287040	7.80251	5,00E-05	Protein kinase-related
Seiddi	Zm00001d035390_T001	B6SRE1	6:24034206-24035363	6.58647	5,00E-05	Thioredoxin H-type
Seiddi	Zm00001d011515_T001	B6SZZ3	8:153108097-153110782	4.50767	5,00E-05	MYB-related transcription factor
Seiddi	Zm00001d033066_T001	A0A1D6KW53	1:249337696-249342245	4.45222	5,00E-05	Potassium transporter 5
Seiddi	Zm00001d047584_T001	A0A1D6PBP0	9:136373484-136374831	4.40055	5,00E-05	Eukaryotic aspartyl protease family protein
Seiddi	Zm00001d003530_T001	A0A1D6E9P4	2:46804410-46806881	3.85419	5,00E-05	Serine carboxypeptidase-like 19
Seiddi	Zm00001d004866_T001	A0A1D6EHV8	2:145444787-145448501	3.61198	5,00E-05	Protein kinase family protein
Seiddi	Zm00001d018106_T001	A0A1D6HKS2	5:214437485-214442320	3.58647	5,00E-05	Protein EXORDIUM
Seiddi	Zm00001d021226_T001	B4FR42	7:146556757-146557628	3.4124	5,00E-05	Anther-specific protein 3
Seiddi	Zm00001d035659_T001	B6T303	6:39829332-39830358	3.32836	5,00E-05	Metallothionein-like protein 2C
Seiddi	Zm00001d031819_T001	A0A1D6KLE9	1:202907477-202908879	3.1071	5,00E-05	Zinc finger (MYND type) family protein
Seiddi	Zm00001d007901_T001	A0A1D6F9P3	2:242052644-242054040	2.94653	5,00E-05	Cylicin-1
Seiddi	Zm00001d007807_T021	A0A1D6F912	2:240011427-240022438	2.86198	5,00E-05	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70
Seiddi	Zm00001d004102_T001	A0A1D6EDG3	2:82839362-82842765	2.65376	5,00E-05	OSJNBa0020I02.16-like protein
Seiddi	Zm00001d038699_T001	A0A1D6M9X1	6:162814645-162816895	2.56337	5,00E-05	O-methyltransferase ZRP4
Seiddi	Zm00001d019613_T001	A0A1D6HZ97	7:46353758-46366865	2.48385	5,00E-05	Putative O-methyltransferase 2
Seiddi	Zm00001d022569_T001	A0A1D6IP49	7:180129804-180131184	2.17121	5,00E-05	Senescence associated gene 20
Seiddi	Zm00001d008285_T006	A0A1D6FBF7	8:4076175-4083815	-3.03517	5,00E-05	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein
Seiddi	Zm00001d008285_T001	B4FWT3	8:4076175-4083815	-3.03274	5,00E-05	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein
Seiddi	Zm00001d048709_T002	C0P7Z2	4:3833329-3835353	2.69275	5,00E-05	Benzoxazinless1
Seiddi	Zm00001d005978_T001	A0A1D6ERW1	2:194543936-194544415	2.15941	5,00E-05	RING-H2 finger protein
Seiddi	Zm00001d016441_T005	A0A1D6H7L9	5:162429369-162433900	-2.53942	5,00E-05	Tyrosine aminotransferase
Seiddi	Zm00001d021208_T001	A0A060CXG3	7:146038524-146039307	2.34756	0.0001	AP2-EREBP transcription factor
Seiddi	Zm00001d002106_T001	A0A1D6DWM0	2:6005692-6006923	7.52299	0.00015	Protein kinase family protein
Seiddi	Zm00001d028400_T002	B6TRQ1	1:33597141-33600523	2.88302	0.00025	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
Seiddi	Zm00001d044535_T001	A0A1D6NMX8	3:231196111-231198778	2.15765	0.0003	WAT1-related protein
Seiddi	Zm00001d008634_T001	B4FJV4	8:15371586-15372582	3.08872	0.00035	Putative carboxylesterase 15
Seiddi	Zm00001d030995_T007	B6SRP9	1:172452607-172457478	2.47362	0.0004	Basic leucine zipper 25
Seiddi	Zm00001d050106_T001	K7UDG8	4:65967343-65976964	2.67724	0.00045	Ferredoxin-related
Seiddi	Zm00001d022163_T001	Q5GAT1	7:171487409-171488453	2.18065	0.00045	Pheromone receptor
Seiddi	Zm00001d001857_T001	B4FXB0	2:2015252-2016537	3.74962	0.0005	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
Seiddi	Zm00001d034807_T006	B4F9K0	1:302526882-302530155	2.15381	0.00065	Late embryogenesis abundant protein group 2
Seiddi	Zm00001d052902_T001	A0A1D6QKT2	4:204185324-204195660	2.71145	0.0009	Chaperone protein dnaJ 6
Seiddi	Zm00001d026623_T001	A0A1D6JI52	10:149113705-149116474	2.88737	0.0009	Tubulin beta-7 chain
Seiddi	Zm00001d025814_T001	K7UK40	10:130349447-130350572	2.85517	0.00095	Beta-16-galactosyltransferase GALT29A
Seiddi	Zm00001d037023_T001	A0A1D6LTD4	6:109436099-109436648	2.79921	0.00095	Putative RING zinc finger domain superfamily protein
Seiddi	Zm00001d004531_T001	A0A1D6EFX5	2:116800853-116802446	2.78564	0.001	Chlorophyllide a oxygenase chloroplastic
Seiddi	Zm00001d024372_T001	A0A1D6IYZ0	10:67598557-67599387	2.24949	0.001	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic

Seiddi	Zm00001d041951_T001	A0A096Q0D7	3:144984921-144986824	2.0169	0.001	Ring zinc finger protein
Seiddi	Zm00001d014730_T001	A0A1D6GVV5	5:60933270-60951744	3.82976	0.00105	Retrotransposon-like protein
Seiddi	Zm00001d036262_T001	C0PMI3	6:80670943-80672955	2.62187	0.00115	Protein kinase superfamily protein
Seiddi	Zm00001d023273_T001	K7TI69	10:1811071-1815334	5.65836	0.0013	Disease resistance protein-like
Seiddi	Zm00001d006170_T001	B6UHM5	2:200403152-200403895	3.43554	0.0013	AP2-EREBP transcription factor
Seiddi	Zm00001d034651_T001	B6SV34	1:298855808-298858616	2.39943	0.0013	Dof zinc finger protein DOF3.6
Seiddi	Zm00001d020614_T001	C0PFI1	7:125133739-125135827	2.62577	0.00145	TIFY25
Seiddi	Zm00001d023856_T001	B6SJC1	10:25214018-25214375	2.31615	0.00155	RALF
Seiddi	Zm00001d002564_T001	A0A1D6E1X8	2:15538201-15540469	2.53951	0.0017	Protein DMR6-LIKE OXYGENASE 2
Seiddi	Zm00001d025735_T001	K7U4L9	10:127934024-127936164	2.0399	0.00185	Serine/threonine-protein kinase OXI1
Seiddi	Zm00001d045296_T001	K7V6R8	9:18165497-18165851	2.20404	0.00185	DUF1674 family protein
Seiddi	Zm00001d006539_T001	C0P5G0	2:210700846-210703733	3.35739	0.0019	Beta-amylase
Seiddi	Zm00001d039135_T001	B8XIB0	6:170789130-170789949	2.57854	0.00195	Tie-dyed 1
Seiddi	Zm00001d042127_T001	B6SV05	3:152192575-152193919	2.2856	0.002	GRAS family transcription factor containing protein
FuturiXX	Zm00001d042214_T001	A0A1D6N276	3:156317220-156318186	2.30572	5,00E-05	Protein SRC2-like protein
FuturiXX	Zm00001d052206_T001	K7UA00	4:183208272-183209323	2.18818	5,00E-05	Protein EXORDIUM
FuturiXX	Zm00001d010798_T001	C0HGS8	8:128194127-128195278	2.09577	5,00E-05	Oxidative stress 3 ;
FuturiXX	Zm00001d008573_T001	K7UU06	8:13343615-13344233	2.7572	5,00E-05	Calmodulin protein 2, touch-induced
FuturiXX	Zm00001d012321_T001	K7VNA8	8:172400470-172401895	3.32677	5,00E-05	Nematode resistance protein-like HSPRO2
FuturiXX	Zm00001d022416_T001	B6SIV0	7:177131071-177131503	2.7116	5,00E-05	Early response to dehydration 15-like protein
FuturiXX	Zm00001d028752_T001	A3F4K2	1:45537883-45539961	2.97263	5,00E-05	2C-type protein phosphatase protein
FuturiXX	Zm00001d046069_T001	A0A1D6P0U3	9:61153376-61158758	-2.71957	5,00E-05	Uncharacterized protein
FuturiXX	Zm00001d029096_T007	A0A1D6K2K4	1:57821696-57828028	-2.68918	5,00E-05	Uncharacterized protein
FuturiXX	Zm00001d021781_T001	B4FWK6	7:162910506-162912123	-2.05314	5,00E-05	Organic cation/carnitine transporter 3
FuturiXX	Zm00001d026223_T001	B6TIB8	10:141450911-141452580	-2.17629	5,00E-05	Hydrogen peroxide-induced 1
FuturiXX	Zm00001d048949_T001	B4F9D6	4:10536337-10537204	-2.00486	5,00E-05	Hevein-like preproprotein
FuturiXX	Zm00001d003689_T001	A0A1D6EAY6	2:54514568-54515201	-2.05615	5,00E-05	Hypersensitive-induced response protein 2
FuturiXX	Zm00001d020780_T001	A0A1R3QP52	7:132447941-132449006	-2.18334	5,00E-05	Glutathione transferase GST 23
FuturiXX	Zm00001d047532_T001	B4FRJ4	9:134019943-134020447	2.08957	5,00E-05	Photosystem II 11 kD protein
FuturiXX	Zm00001d009589_T001	B4FUA1	8:71899225-71900023	2.07958	5,00E-05	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
FuturiXX	Zm00001d036046_T001	A0A1D6LKG8	6:68433794-68434769	2.04839	5,00E-05	Magnesium protoporphyrin IX methyltransferase chloroplastic
FuturiXX	Zm00001d013766_T001	A0A1D6GLZ4	5:19722697-19723327	2.89537	5,00E-05	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
FuturiXX	Zm00001d044396_T001	A0A1D6NLF1	3:227100367-227101162	-4.282	5,00E-05	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
FuturiXX	Zm00001d044327_T002	C0PKF9	3:225304005-225308415	2.31612	5,00E-05	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase
FuturiXX	Zm00001d052827_T001	B4FVQ7	4:202042492-202044024	2.26374	5,00E-05	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
FuturiXX	Zm00001d022327_T001	B6TKK2	7:175527740-175528814	2.10632	5,00E-05	Gibberellin receptor GID1L2
FuturiXX	Zm00001d026017_T001	B4FVU9	10:136072032-136075724	-2.32271	5,00E-05	Protein REVEILLE 1
FuturiXX	Zm00001d012335_T001	A0A1Q1CDR6	8:172652748-172654298	-2.14805	5,00E-05	Cis-zeatin O-glucosyltransferase 2
FuturiXX	Zm00001d044954_T001	A0A1D6NSE7	9:8156786-8158359	-3.50018	5,00E-05	Putative 2-oxoacid dependent dioxygenase
FuturiXX	Zm00001d015224_T001	A0A1D6H078	5:80045133-80047032	-5.78232	5,00E-05	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
FuturiXX	Zm00001d026662_T001	B4FTY8	10:149592542-149593163	2.11542	5,00E-05	Harpin inducing protein ; integral component of membrane
FuturiXX	Zm00001d044291_T001	A0A1D6NKH3	3:224387799-224393287	-2.05982	5,00E-05	Actin binding protein family
FuturiXX	Zm00001d003784_T001	A0A1D6EBJ2	2:59226303-59229740	2.23217	5,00E-05	Glucan endo-13-beta-glucosidase 14
FuturiXX	Zm00001d007896_T001	B4FB19	2:241903614-241906193	2.18776	5,00E-05	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 5
FuturiXX	Zm00001d021026_T001	B6SPN6	7:140795171-140796635	2.01294	5,00E-05	Protein capl
FuturiXX	Zm00001d052793_T001	A0A1D6QK01	4:201137073-201141210	-2.77569	5,00E-05	Putative O-Glycosyl hydrolase superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d039833_T001	B8A146	3:16203109-16205064	2.43147	5,00E-05	Spermidine hydroxycinnamoyl transferase
FuturiXX	Zm00001d022451_T001	B6SPQ5	7:177999484-178000798	2.98497	5,00E-05	Non-specific serine/threonine protein kinase
FuturiXX	Zm00001d052962_T001	K7U4U8	4:206380173-206382649	2.67242	5,00E-05	Putative RING zinc finger domain superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d049643_T005	A0A1D6PWT2	4:38578938-38584438	2.57817	5,00E-05	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
FuturiXX	Zm00001d027291_T001	B6UAC7	1:1942160-1942595	2.49075	5,00E-05	Cortical cell-delineating protein
FuturiXX	Zm00001d012415_T001	K7VB93	8:174152243-174153551	2.44371	5,00E-05	Putative aspartic protease family protein
FuturiXX	Zm00001d051532_T002	A0A1D6Q7M7	4:161648709-161651033	2.39535	5,00E-05	Pentatricopeptide repeat-containing protein
FuturiXX	Zm00001d020137_T001	K7UVX8	7:95348910-95350784	2.29132	5,00E-05	Putative WRKY transcription factor 30
FuturiXX	Zm00001d015025_T001	B6ST13	5:72691876-72694189	2.26699	5,00E-05	AMP binding protein
FuturiXX	Zm00001d032495_T001	A0A1D6KR50	1:228404753-228405413	2.24011	5,00E-05	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d009939_T001	C0P838	8:90768543-90769854	2.22202	5,00E-05	Putative WRKY transcription factor 50
FuturiXX	Zm00001d021208_T001	A0A060CXG3	7:146038524-146039307	2.205	5,00E-05	AP2-EREBP transcription factor
FuturiXX	Zm00001d022597_T001	B6TYR6	7:180745297-180746615	2.16328	5,00E-05	NEP1-interacting protein-like 1
FuturiXX	Zm00001d034540_T001	A0A1D6L8H5	1:295909540-295911250	2.15627	5,00E-05	Rubredoxin-like superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d032344_T001	A0A1D6KQ58	1:223288105-223291611	-5.0197	5,00E-05	Receptor-like protein kinase HSL1
FuturiXX	Zm00001d041746_T001	A0A1D6MXY7	3:135772966-135790864	-3.47008	5,00E-05	Pinoresinol reductase 2
FuturiXX	Zm00001d054043_T003	B4FWJ8	4:245469382-245473221	-2.38901	5,00E-05	Binding protein homolog2
FuturiXX	Zm00001d035590_T001	A0A1D6LHH8	6:35399136-35405862	-2.30283	5,00E-05	DUF1639 family protein
FuturiXX	Zm00001d037487_T001	A0A1D6LY74	6:127027497-127028615	-2.27445	5,00E-05	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d030851_T001	B6SZ21	1:163238998-163241090	-3.03035	5,00E-05	Cytochrome P450 CYP81N5
FuturiXX	Zm00001d033152_T001	B6SZ78	1:252201786-252203758	-2.86584	5,00E-05	Cytochrome P450 CYP71W7
FuturiXX	Zm00001d007180_T001	A0A1D6F4G3	2:223921920-223925520	-2.37882	5,00E-05	Cytochrome P450 714A1
FuturiXX	Zm00001d036792_T001	A0A1D6LR86	6:101120030-101120600	-2.32489	0.0001	VQ motif family protein
FuturiXX	Zm00001d009512_T002	A0A1D6FJT8	8:68438315-68444733	-2.52284	0.0001	Polyadenylate-binding protein RBP45C
FuturiXX	Zm00001d021207_T001	A0A1D6I936	7:146034692-146035409	2.5362	0.0001	DRE-binding protein 3
FuturiXX	Zm00001d017706_T002	A0A1D6HGR0	5:204700263-204702470	2.03815	0.0001	Pentatricopeptide repeat-containing protein
FuturiXX	Zm00001d026010_T002	A0A1D6JBM8	10:135896387-135908452	-2.50539	0.0001	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein

FuturiXX	Zm00001d043485_T001	B4FSZ0	3:201652628-201655048	-2.40714	0.0001	Transposon protein Pong sub-class
FuturiXX	Zm00001d015743_T001	B6UEP1	5:115451295-115456402	2.30395	0.00015	BZIP transcription factor
FuturiXX	Zm00001d036401_T001	A0A1D6LMW9	6:86902775-86908235	-2.26618	0.00015	Endoplasmin-like protein
FuturiXX	Zm00001d020470_T001	A0A1D6I4A3	7:116925168-116926434	3.08195	0.00015	DUF868 family protein
FuturiXX	Zm00001d041681_T001	A0A1D6MXM0	3:133073300-133074972	-3.25144	0.00015	HAT transposon superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d039241_T001	A0A1D6MEP6	3:393258-395283	2.20978	0.0002	S-type anion channel SLAH1
FuturiXX	Zm00001d024386_T002	C0P6G9	10:68324450-68325959	2.32667	0.0002	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
FuturiXX	Zm00001d009328_T001	K7VCJ3	8:56604997-56606581	2.02063	0.0002	Glycosyltransferase
FuturiXX	Zm00001d024783_T001	K7TIH0	10:87873242-87875642	2.2768	0.0002	Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d006705_T001	A0A1D6EZQ7	2:214797522-214800816	-2.5724	0.0002	ARM repeat superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d029913_T001	Q94KS8	1:93847217-93848525	2.0954	0.00025	Beta-expansin 1a
FuturiXX	Zm00001d020673_T001	B4FW35	7:127586706-127588589	-2.00981	0.00025	Cytochrome P450 family 76 subfamily C polypeptide 7
FuturiXX	Zm00001d022101_T001	A0A1D6IJ70	7:170336651-170337581	2.96447	0.00035	Putative carboxylesterase 18
FuturiXX	Zm00001d002589_T001	E9JE14	2:16287468-16289962	2.36049	0.0004	Beta-carotene hydroxylase
FuturiXX	Zm00001d032051_T001	A0A1D6KNA6	1:210825160-210825686	2.86262	0.00045	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
FuturiXX	Zm00001d039524_T001	A0A1D6MHZ5	3:7085191-7086610	2.68774	0.00045	Transposon protein CACTA, En/Spm sub-class
FuturiXX	Zm00001d048313_T001	B6SR38	9:154440220-154440775	2.43362	0.00045	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d021879_T001	B4G0L1	7:165315433-165319355	2.24522	0.00045	NEP-interacting protein 1
FuturiXX	Zm00001d027601_T001	A0A1D6JN99	1:8774247-8775855	-3.23344	0.0005	Cytochrome P450 family 96 subfamily A polypeptide 1
FuturiXX	Zm00001d022342_T001	A0A1D6IL85	7:175846506-175850538	3.10263	0.00055	DNAse I-like superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d031152_T001	B4FV56	1:179774356-179774872	-2.60157	0.0006	Osmotin-like protein OSM34
FuturiXX	Zm00001d016435_T001	A0A1D6H7K5	5:162238298-162239129	2.65317	0.0006	UDP-glycosyltransferase 73D1
FuturiXX	Zm00001d001771_T001	A0A1D6DSN9	2:473338-474814	3.33018	0.00065	Eukaryotic aspartyl protease family protein
FuturiXX	Zm00001d028621_T002	A0A1D6JY52	1:41091130-41112110	-2.48756	0.0007	HAT dimerization domain-containing protein / transposase-related
FuturiXX	Zm00001d020996_T001	A0A1D6I7N1	7:139823518-139828471	-2.28117	0.0007	Cyclin-B1-4
FuturiXX	Zm00001d048710_T001	C0PGU0	4:3837796-3839930	2.11539	0.0008	Benzoxazinone synthesis2
FuturiXX	Zm00001d053965_T001	K7UST5	4:244409107-244409662	2.03008	0.0009	22.0 kDa heat shock protein
FuturiXX	Zm00001d015217_T001	A0A1D6H073	5:79954320-79956357	-2.05831	0.0009	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
FuturiXX	Zm00001d008746_T001	A0A1D6FF59	8:18873329-18874899	-3.60198	0.0009	Actin-7 ;
FuturiXX	Zm00001d020383_T001	A0A1D6I3X1	7:110507408-110508756	2.60928	0.00095	Aquaporin PIP1-6
FuturiXX	Zm00001d049157_T001	K7UQN1	4:18295245-18296266	2.06689	0.00095	Octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein
FuturiXX	Zm00001d031392_T001	A0A1D6KII1	1:188711967-188717046	-3.35706	0.001	Embryo sac development arrest 7
FuturiXX	Zm00001d017531_T001	B4FJ20	5:198880653-198882279	2.66249	0.00105	Purine-uracil permease NCS1
FuturiXX	Zm00001d018857_T001	A0A1D6HSR3	7:7501792-7502779	-3.58759	0.00105	Putative carboxylesterase 15
FuturiXX	Zm00001d020033_T001	A0A1D6I1P2	7:87290867-87295819	-2.5313	0.00105	Cyclin-B1-4
FuturiXX	Zm00001d029955_T001	B7ZYD0	1:96293446-96295018	2.84374	0.00105	Phospholipase A1-Ibeta2 chloroplastic
FuturiXX	Zm00001d011639_T001	A0A1D6G2Q7	8:157135996-157137214	-2.21961	0.00115	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor TEM1
FuturiXX	Zm00001d039944_T001	A0A1D6MLW6	3:20126202-20126790	2.98792	0.0012	Putative calcium-binding protein CML27
FuturiXX	Zm00001d050320_T001	B4F9C4	4:81159443-81162911	2.0232	0.0012	HXXXD-type acyl-transferase family protein
FuturiXX	Zm00001d003091_T001	A0A1D6E6H8	2:31872014-31873109	-2.40137	0.0013	Beta-16-galactosyltransferase GALT29A
FuturiXX	Zm00001d031164_T001	A0A1D6KGR7	1:180369692-180371167	2.02226	0.00135	Transcription factor JUNGBRUNNEN 1
FuturiXX	Zm00001d025221_T001	A0A1D6J5K4	10:109828650-109831426	2.77419	0.0014	Putative inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
FuturiXX	Zm00001d026574_T001	A0A1D6JHK8	10:148210411-148216298	-2.75753	0.00145	Uncharacterized protein
FuturiXX	Zm00001d034844_T001	B4F9D8	1:303656952-303658077	2.82878	0.0015	Nucleotide-diphospho-sugar transferase family protein
FuturiXX	Zm00001d005804_T001	A0A1D6EQX0	2:189269171-189279764	2.46532	0.00155	Auxin-repressed protein
FuturiXX	Zm00001d038476_T001	A0A1D6M6L1	6:158313984-158316132	2.42189	0.00165	Alpha expansin5
FuturiXX	Zm00001d023225_T001	B4FQY2	10:826371-828398	2.16935	0.00165	Protein trichome birefringence-like 34
FuturiXX	Zm00001d046411_T001	A0A1D6P2J6	9:88017893-88019348	2.03068	0.00165	Uncharacterized protein
FuturiXX	Zm00001d012351_T001	A0A1D6G899	8:172912445-172913614	-2.84652	0.00165	Chromatin assembly factor 1 subunit FAS1
FuturiXX	Zm00001d035558_T006	A0A1D6LH65	6:33061938-33063666	-4.70554	0.00185	Dirigent protein
FuturiXX	Zm00001d031893_T001	B4F922	1:205617822-205620362	-2.02337	0.00195	Acyltransferase

(B)

I vs NI[a]	Ensembl id[b]	Uniprot[b]	locus	fold-change	p-value	Fontion du gène[b]
Seiddi	Zm00001d037894_T001	A3KLI1	6:141324494-141325549	2.29455	5,00E-05	Dehydrin DHN1
Seiddi	Zm00001d041788_T001	A0A1D6MY81	3:138093725-138100085	-2.88199	5,00E-05	Protein SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3
Seiddi	Zm00001d040405_T001	A0A1R3PDY7	3:41585555-41587602	5.44596	5,00E-05	Protein kinase family protein
Seiddi	Zm00001d042649_T001	A0A1D6N5S0	3:175280640-175287040	6.0858	5,00E-05	Protein kinase-related
Seiddi	Zm00001d004558_T001	A0A1D6EG61	2:117928032-117929554	-2.32528	5,00E-05	Leucine-rich repeat protein kinase family protein ;
Seiddi	Zm00001d005842_T001	A0A1D6ER74	2:190584580-190597067	-2.20591	5,00E-05	Saposin B domain-containing protein
Seiddi	Zm00001d044762_T001	C4J4Q4	9:1714013-1716063	-2.81744	0.0001	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
Seiddi	Zm00001d018352_T001	A0A1D6HN10	5:219060175-219065523	-2.16576	0.0001	Protein kinase superfamily protein
Seiddi	Zm00001d010064_T001	A0A1D6FP28	8:98038265-98039602	4.30528	0.00045	Peroxidase
Seiddi	Zm00001d019364_T001	A0A1D6HX47	7:29878044-29878560	-2.07053	0.0005	Pathogenesis-related protein 1
Seiddi	Zm00001d004042_T003	A0A1D6ED39	2:78528268-78549917	2.27716	0.00065	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase chloroplastic
FuturiXX	Zm00001d025707_T001	A0A1D6J8S6	10:126903969-126905896	-2.08962	5,00E-05	BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 2
FuturiXX	Zm00001d044762_T001	C4J4Q4	9:1714013-1716063	-2.4989	5,00E-05	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
FuturiXX	Zm00001d011734_T001	B4F825	8:160235114-160235972	2.86279	5,00E-05	Inorganic pyrophosphatase 1
FuturiXX	Zm00001d025873_T001	K7TQS7	10:132238490-132239276	3.0086	5,00E-05	Low-molecular-weight cysteine-rich protein LCR70
FuturiXX	Zm00001d041681_T001	A0A1D6MXM0	3:133073300-133074972	-2.6957	5,00E-05	HAT transposon superfamily protein
FuturiXX	Zm00001d053304_T001	A0A1D6QNS0	4:225165333-225167784	2.40627	5,00E-05	Cysteine proteinase inhibitor
FuturiXX	Zm00001d011679_T001	K7W0N0	8:158415719-158417282	2.29594	0.00025	High affinity nitrate transporter 2.5
FuturiXX	Zm00001d017292_T003	B6SXF2	5:192003417-192011428	2.06462	0.0011	Defensin-like protein 6
FuturiXX	Zm00001d048712_T001	A0A1D6PP77	4:3847633-3850842	-3.41832	0.0011	Coatomer subunit beta'-3
FuturiXX	Zm00001d022390_T001	B4F8P0	7:176616852-176618205	2.18467	0.0015	Eukaryotic aspartyl protease family protein
FuturiXX	Zm00001d048192_T001	K7VGM8	9:152165377-152166028	2.02929	0.0017	AIR12

[a] Les transcrits sont classés par cultivar et par valeur de p croissante. [b] La fonction du gène a été extraite des sites Ensembl et UNIPROT. La fonction est surlignée en vert si elle a été caractérisée chez le maïs ou en blanc si elle a été étudiée sur un gène orthologue d'une autre espèce.

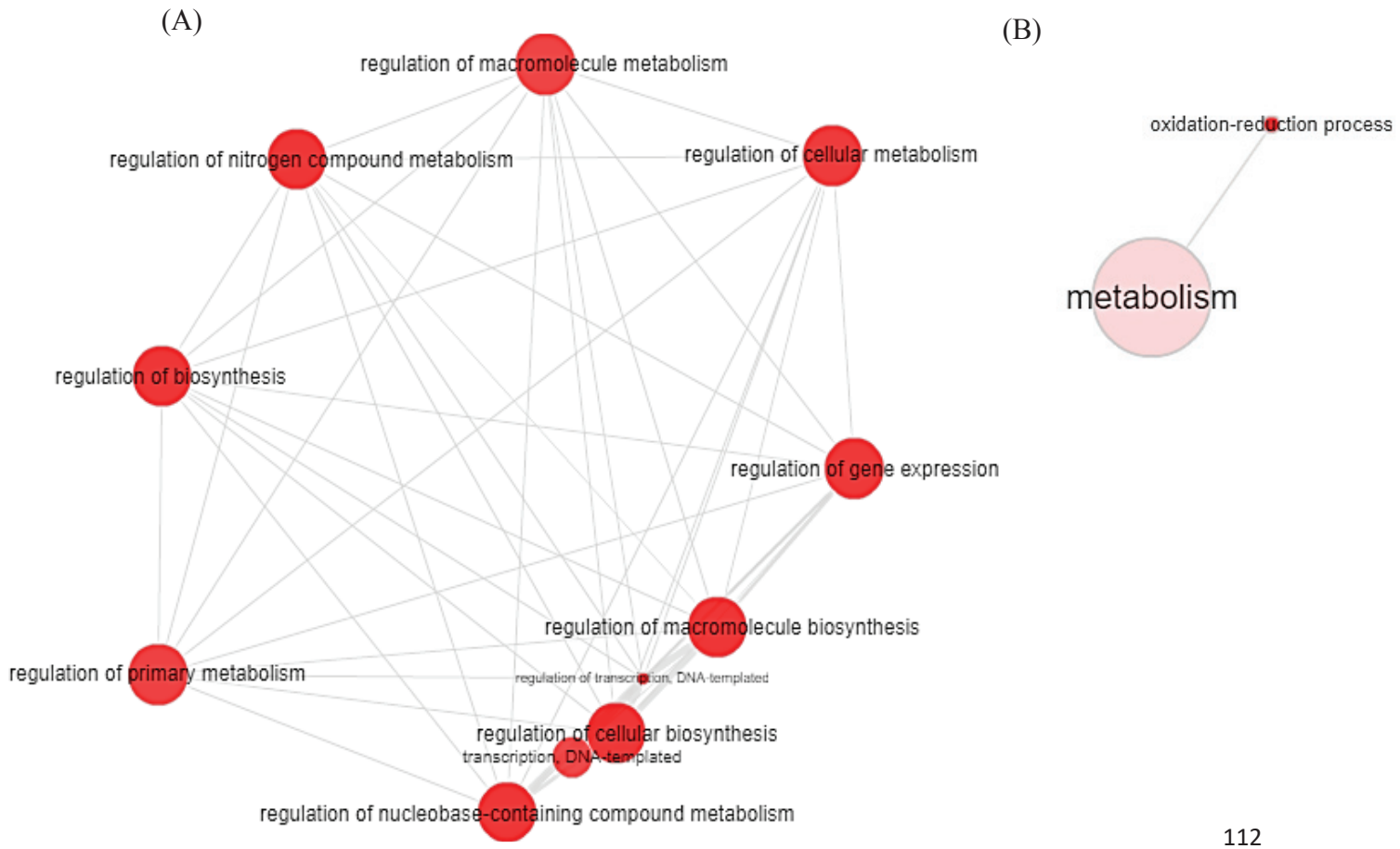
3.3 Enrichissement des termes GO

Parmi l'ensemble des gènes différentiellement exprimés (p<0,05 et FC>2) lors de l'inoculation par *A. lipoferum* CRT1, une recherche d'enrichissement de terme GO (Gene Ontology) a été effectuée sur l'ensemble de leurs trois composants : processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires. Au niveau des racines, aucun terme GO n'a montré un enrichissement. Ceci est vraisemblablement lié aux petits nombres de transcrits significativement modifiés dans ce compartiment car l'analyse statistique conduite nécessite la présence d'au moins 5 transcrits différents partageant un terme GO pour définir un enrichissement. Pour en augmenter le nombre, les tests ont été également réalisés avec une liste étendue à ceux présentant un facteur de changement de FC>1,5 (et non FC>2). Néanmoins, aucun enrichissement significatif d'un terme GO n'a pu être établi.

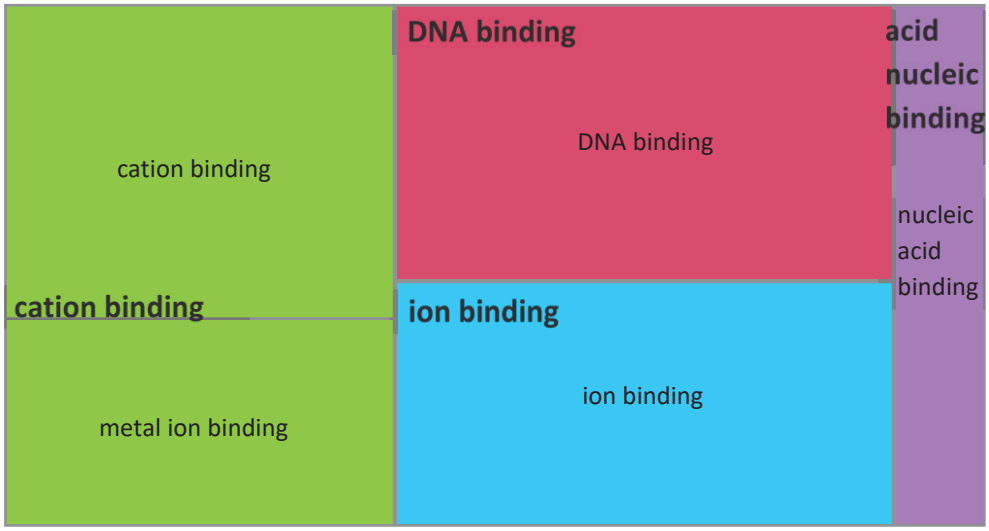
Au niveau des feuilles du cultivar Seiddi, les transcrits dont l'expression est modifiée par l'inoculation sont enrichis pour un grand nombre de termes GO (Tableau 3.4A; Figure 3.5A). Ceux liés aux processus biologiques sont les plus représentés (près de 2/3 des affiliations de termes GO). Ils comprennent toute une série de processus biologiques régulateurs d'expression

des gènes ou du métabolisme. Ces processus biologiques sont reliés entre eux comme la régulation du métabolisme primaire, la régulation de la biosynthèse de composés azotés ou encore la régulation de la biosynthèse de macromolécules. Les transcrits discriminants codent principalement pour des protéines situées dans le noyau et dans des organites liés aux endomembranes (données non-montrées). En accord, ils présentent un enrichissement dans les fonctions moléculaires liées aux liaisons de cations, d'ions en général, d'ADN, et en plus faibles proportions, d'acides nucléiques (Figure 3.5C).

Alors que de nombreux processus biologiques semblent être affectés dans le compartiment 'feuilles' du cultivar Seiddi par *A. lipoferum* CRT1, cette observation n'est pas vraie chez le cultivar FuturiXX. En effet, seuls 2 processus biologiques sont affectés chez ce cultivar, dont l'un, peu significatif mais présentant un fort enrichissement, correspond à des modifications du métabolisme en général et le second, beaucoup plus significatif mais moins enrichi, correspond à des processus d'oxido-réduction (Figure 3.5B). Aucune affiliation spécifique à un composant cellulaire n'a pu être proposée. Néanmoins, la figure 3.5D nous confirme que l'inoculation a eu un impact sur la fonction d'oxido-réduction. Elle révèle aussi que diverses activités métaboliques sont affectées (activités catalytiques, de liaison des cations et ions) en plus d'activités cataboliques d'hydrolases et de transférase.



(C)



(D)

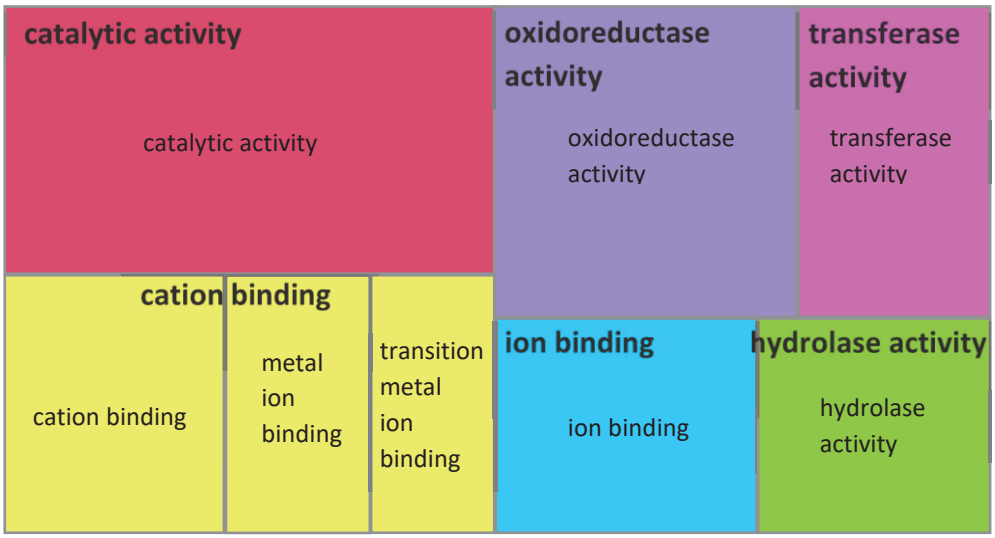


Figure 3.5 : Affiliation des termes GO des transcrits dont l'abondance est modifiée dans les feuilles des plantules de maïs par *A. lipoferum* CRT1. Les processus biologiques et les fonctions moléculaires des cultivars Seiddi (A) et (C) et FuturiXX (B) et (D) sont représentés.

Les GO des transcrits discriminants entre plantules non-inoculées et inoculées avec la PGPR (p<0,05 et FC>2) ont été défini avec le logiciel AgriGo sur la base d'une p-value d'enrichissement. Les termes parents des termes GO sont indiqués avec une police à grandes lettres grises sur un fond de couleur commun et les termes fils avec une police de petites lettres noires sur fond de couleur commun. Sur (A) et (B), l'intensité des colorations et le diamètre des cercles correspondent respectivement à la p-value et à la fréquence des termes GO. Les termes GO présentant des relations de similitude sont reliés entre eux par des traits et leur distance atteste de leur différence. Sur (C) et (D), la couleur des boîtes représente les différents super-clusters, et donc la filiation des termes GO. La taille des boites est inversement proportionnelle aux p-values.

4. Discussion et conclusion

Cette étude conforte les conclusions d'études antérieures sur les interactions entre plantes et PGPR concernant les modulations des métabolismes primaire et secondaire et des mécanismes de défense des végétaux contre les stress biotiques et abiotiques. Cependant, l'usage en parallèle d'une variété de maïs témoin ne présentant pas de réponse morphologique ou photosynthétique à la PGPR a permis à cette étude de mieux comprendre la spécificité de la relation entre le maïs et *A. lipoferum* CRT1 et de définir plus finement les évènements biochimiques et transcriptionnels qui corrèlent aux réponses physiologiques. Elle montre aussi pour la première fois des corrélations entre une modulation de l'abondance de transcrits impliqués dans les activités de photosynthèse et de croissance, et une modification de ces activités par la PGPR. Enfin, cette étude constitue la première analyse combinée et parallèle des métabolomes et transcriptomes foliaires et racinaires d'une plante en interaction avec une PGPR. De même, elle fournit les premières informations sur la coordination des activités biochimiques au sein de la plante pour l'élaboration d'une réponse globale à la PGPR. Tous ces points sont à présent discutés ci-dessous.

Modulation du métabolisme primaire

Tout d'abord, concernant le métabolisme primaire, des modifications des concentrations en sucres et acides aminés ont été observées lors des interactions entre *Paenibacillus polymyxa* RC14 et le choux (Dursun *et al.* 2017), *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens* et le radis (Mohamed et Gomaa 2012), *P. putida* AKMP7 et le blé (Ali *et al.* 2011) et *Burkholderia phytofirmans* PsJN et la vigne (Fernandez *et al.* 2012). Des évolutions du transcriptome similaires à celles induites par un appauvrissement en sucres ont également été observées dans ce dernier système (Schwachtje *et al.* 2011). La lecture plus en profondeur du métabolome, et surtout l'usage en parallèle d'une variété de maïs témoin ne présentant pas de réponse morphologique ou photosynthétique à la PGPR, ont permis à cette étude de montrer que des processus anaboliques sont affectés en parallèle de ces modifications physiologiques alors que ce sont plutôt des processus cataboliques qui sont affectés quand ces modifications physiologiques ne sont pas induites. Ainsi, ce sont les concentrations des petits métabolites les plus élaborés comme le maltose, le sophorose, le maltotriose, l'adénine et la thymine qui sont affectées (dont augmentation de la concentration dans les feuilles) lors de l'induction d'une réponse physiologique. Ceci est confirmé par une modification parallèle de l'abondance de transcrits impliqués dans la régulation du métabolisme et de la biosynthèse de composants cellulaires. Inversement, c'est dans le cultivar ne présentant pas de réponse morphologique à l'inoculation

que l'abondance de transcrits impliqués directement dans les voies métaboliques dont les hydrolases est affectée, en parallèle d'une baisse des concentrations des intermédiaires du métabolisme énergétique comme les membres du cycle de Krebs.

Modulation de l'activité photosynthétique

Un des effets phytobénéfiques d'*A. lipoferum* CRT1 est d'augmenter les rendements quantiques maximum et réels de conversion photochimique du photosystème II (Fv/Fm et Ft/Fm'). Ceux-ci étaient significativement augmentés chez le cultivar Seiddi mais non-affectés chez le cultivar FuturiXX (Chapitre 2). Cette observation est confortée par les résultats des analyses métabolomiques et transcriptomiques de cette étude.

Au niveau des feuilles du cultivar Seiddi, les abondances de nombreux transcrits indirectements impliqués dans le fonctionnement des photosystèmes sont augmentées. Cela inclut des transcrits pour la biosynthèse des pigments chlorophylliens comme la chlorophyllide *a* oxygenase (A0A1D6EFX5), l'assemblage des chlorophylles comme la chlorophyll *a-b* binding protein (B4FXB0 et A0A1D6IYZ0) et des activités métaboliques post-photoconversion comme la ferredoxin-related (K7UDG8) et la peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO4 (A0A1D6IVF6) à $p<0,005$ et FC=2,8; 3,7; 2,2; 2,8 et 6,3, respectivement (Tableau 3.4A). La chlorophyllidine *a* oxygenase catalyse la conversion de la chlorophylle *a* en chlorophylle *b* et stabilise la protéine Lhcb1 (Reinbothe *et al.* 2006), une chlorophyll *a-b* binding protein. Ces protéines appartiennent à la grande famille des CAB et jouent un rôle clé dans la régulation du rendement quantique de conversion photochimique du photosystème II en réalisant le couplage entre les chlorophylles *a* et *b* (Bassi *et al.* 1987; Green *et al.* 1991).

Inversement, dans les feuilles de FuturiXX, une chlorophyll *a-b* binding protein (A0A1D6NLF1) est fortement sous-exprimée (p=0,00005 ; FC=-4.3), de même que le transcrit A0A1D6KII1 (Embryo sac development arrest 7), responsable du développement des chloroplastes (p=0,001 ; FC=-3,4) (Bassi *et al.* 1987; Fristedt *et al.* 2014; Wang *et al.* 2016). De manière peut-être compensatoire pour maintenir une activité photosynthétique constante, d'autres transcrits reliés à la photosynthèse sont sur-exprimés dans les feuilles de FuturiXX tels que la photosystem II 11 kD protein (B4FRJ4) et trois chlorophyll *a-b* binding protein (B4FUA1, A0A1D6GLZ4 et A0A1D6KNA6).

L'analyse des transcrits directement impliqués dans le fonctionnement du photosystème II confirme également la différence de comportement des deux cultivars de maïs face à *A. lipoferum* CRT1 (Figure 3.6). Ainsi, le transcrit B4FXB0 dont l'abondance est accrue chez

Seiddi inoculé intervient au début de la chaine photosynthétique du photosystème II (p= 0,0005 ; FC=3,7) et le transcrit A0A1D6NLF1 dont l'expression est diminuée dans les feuilles du cultivar FuturiXX, intervient à la fin de la chaîne (p= 0,0005 ; FC=-4,3). La régulation négative de ce second gène par *A. lipoferum* CRT1 chez FuturiXX ne semble pas affecter le potentiel de conversion photochimique du photosystème II alors que la régulation positive du premier chez Seiddi corrèle effectivement avec une augmentation du potentiel de conversion photochimique du photosystème II.

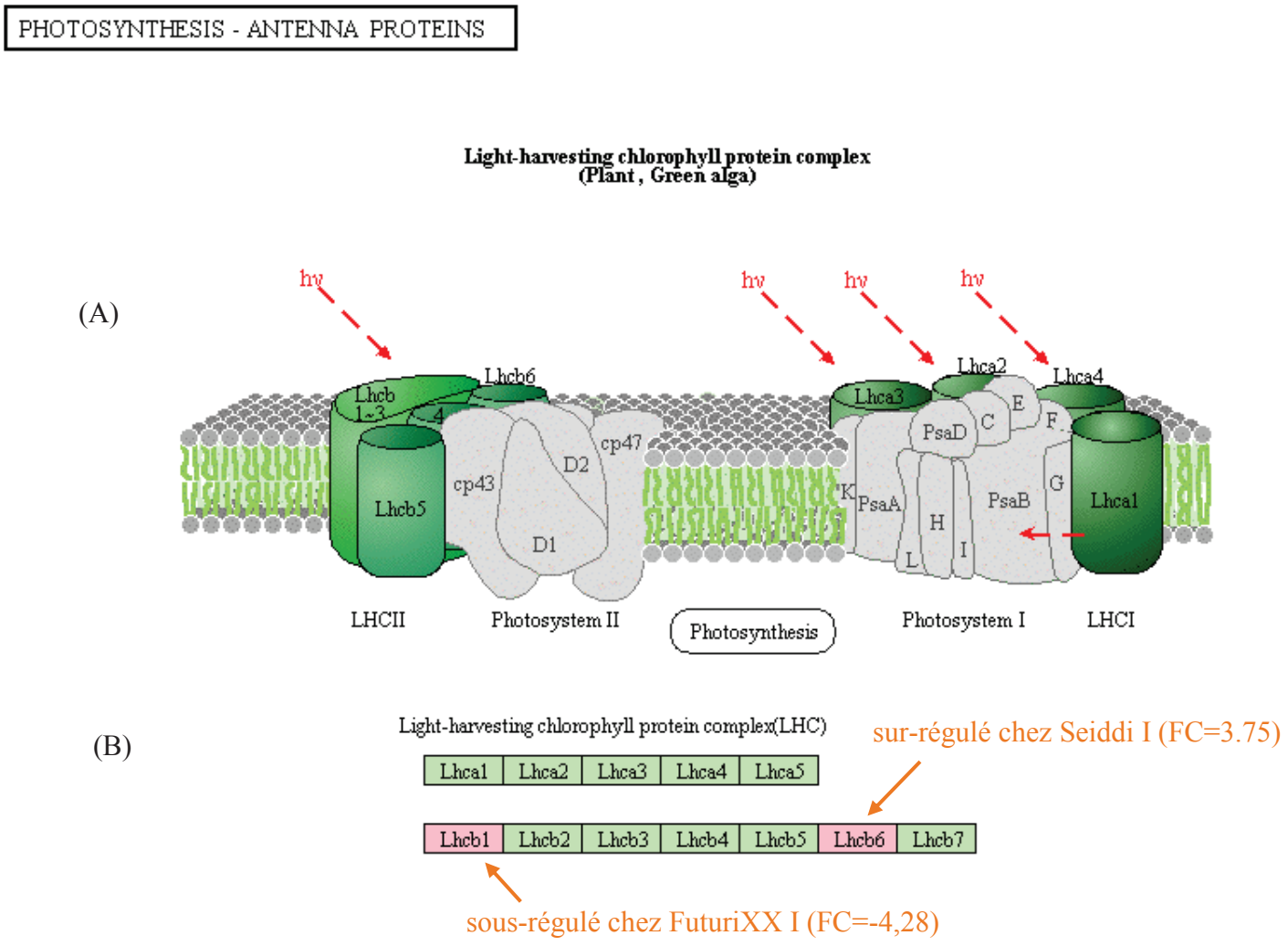


Figure 3.6 : Modification de la régulation de 2 gènes clé du photosystème II.

Le retraitement a été réalisé à l'aide du site KEGG avec une représentation 3D (A) des photosystèmes I et II ou fonctionnelle (B) des light harvesting complexes (Lhc) I et II.

Le transcrit B8XIB0 correspondant au gène *Tie-dyed 1* a peut-être une action indirecte sur le fonctionnement des photosystèmes. En effet, il participe à la régulation du chargement du phloème en carbohydrates (Braun *et al.* 2006; Ma *et al.* 2009) et il voit son abondance spécifiquement augmentée après inoculation du cultivar Seiddi par *A. lipoferum* CRT1 ($p<0,00195$; FC=2,6). Les variations de son niveau d'expression corrèlent également avec les données de métabolomique de cette étude qui montrent une baisse des concentrations en sucres (maltose, sophorose) spécifiquement dans les feuilles du cultivar Seiddi.

Considérées ensemble, ces données suggèrent qu'en plus d'augmenter le fonctionnement du photosystème II chez Seiddi, *A. lipoferum* CRT1 stimule le chargement dans le phloème de la plus grande quantité de photosynthétats produite. Ceci aura probablement pour conséquence de diminuer leur rétrocontrôle négatif sur la photosynthèse et de soutenir l'augmentation de croissance de la plante hôte.

Dans le chapitre précédent (Chapitre 2), il avait été émis l'hypothèse qu'une baisse de la teneur en glucose dans la sève ascendante induite chez Seiddi par *A. lipoferum* CRT1 soit à l'origine d'une régulation positive du fonctionnement du photosystème II. En effet, cette substance exerce une régulation feedback négative sur l'activité photosynthétique globale, jouant ainsi un rôle clé dans l'allocation des ressources carbonées dans la plante (Figure 3.7 - Paul *et al.* 2001). Une diminution de la concentration en glucose, ou substances conduisant à sa biosynthèse comme le tréhalose et tréhalose-6-P, n'a cependant pas été observée dans les feuilles de Seiddi. Ceci est probablement lié à la présence de ces substances dans de nombreux compartiments cellulaires et tissulaires qui ne sont pas toujours impliqués dans l'activité de régulation jouée par le glucose (Paul *et al.* 2001). Il serait maintenant intéressant de tester expérimentalement s'il existe un lien causal direct entre la baisse de la teneur en glucose induite par *A. lipoferum* CRT1 dans la sève ascendante de son hôte et une plus grande expression observée dans cette étude de gènes impliqués directement et indirectement dans le processus photosynthétique.

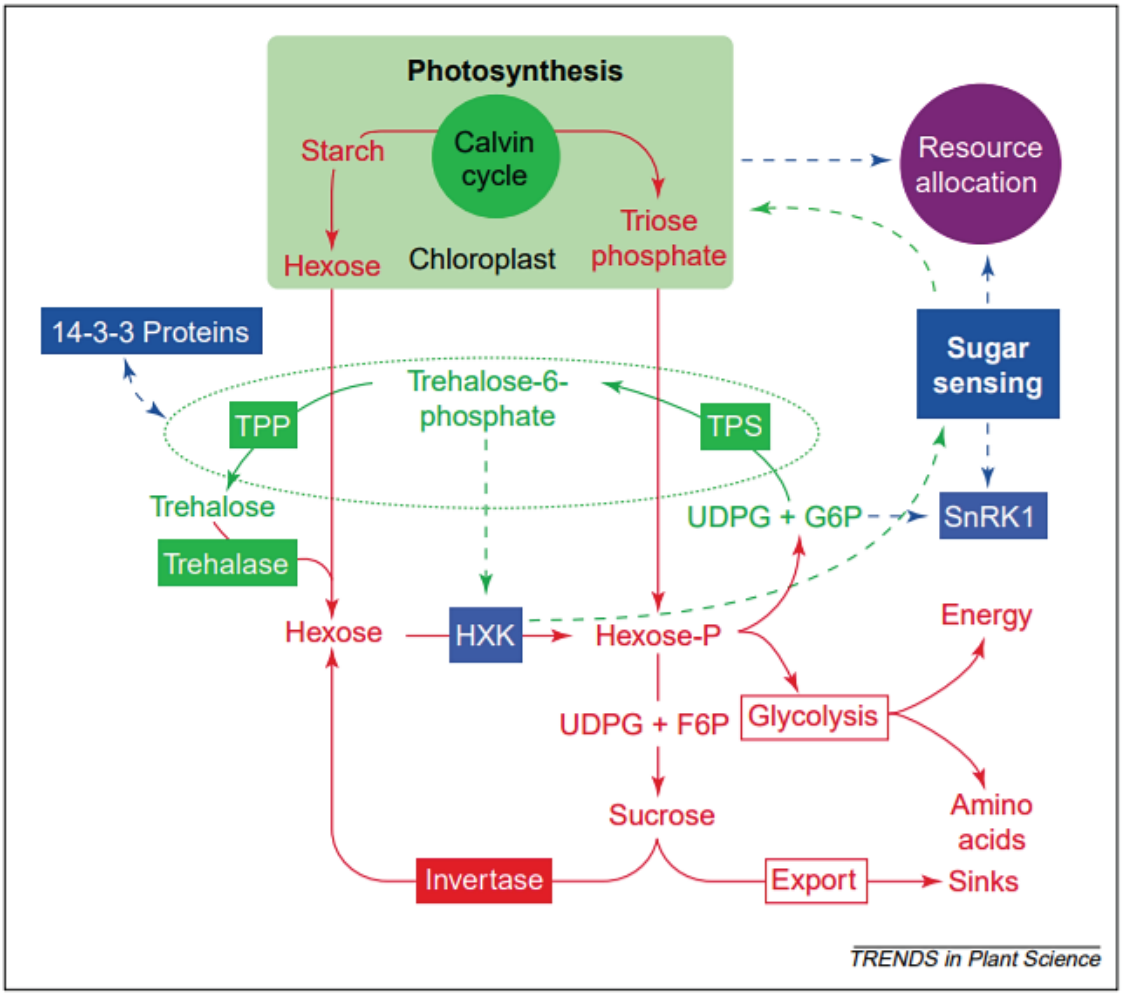


Figure 3.7 : Interaction entre le trehalose-6-phosphate (T6P), les hexokinases et les signaux de sucres (Paul *et al.* 2001).

Le T6P est synthétisé à partir de l'uridine-5-diphosphoglucose (UDPG) et le G6P, et catalysé par la trehalose phosphate synthase (TPS). Le groupement phosphate est enlevé au TP6 par la trehalose phosphate phosphatase (TPP). Les flèches en pointillés indiquent les liens entre les hexokinases (HXK), les signaux de sucres et la photosynthèse.

Modulation du métabolisme secondaire et de la défense aux stress

Les souches de PGPR du genre *Azospirillum* ne sont pas connues pour avoir des propriétés de biocontrôle qui permettraient à leur hôte de mieux tolérer les attaques d'organismes pathogènes. Plusieurs apportent cependant à leur hôte une meilleure tolérance au manque d'eau et teneurs élevées en sel. Même si cette propriété peut être liée à une induction d'une plus grande surface du système racinaire et non à l'activation de mécanismes biochimiques de tolérance uniquement, une étude transcriptomique conduite sur le riz en interaction avec *Azospirillum* a révélé que la plante hôte peut développer une réaction d'incompatibilité face à certaines souches

(Drogue *et al.* 2014). Lors de cette étude, deux souches de PGPR ont été mises en contact avec leur hôte variétal d'origine ou avec une autre variété de riz non-hôte. Les deux combinaisons non-hôte ont alors été les seules où le végétal ait développé un stress oxydatif. En complément, des études métabolomiques conduites sur riz et maïs en interaction avec *Azospirillum* ont révélé que les profils de métabolites secondaires phénoliques de défense des feuilles et racines étaient spécifiques de la variété de plante et de la souche utilisées (Chamam *et al.* 2013; Drogue *et al.* 2014).

En révélant des modifications des concentrations des phényl propanoides dans les feuilles et racines du maïs suite à un contact avec *A. lipoferum* CRT1, cette étude confirme la capacité d'*Azospirillum* à moduler l'augmentation des teneurs de composés phénoliques chez les céréales. Cependant, les phénylpropanoïdes sont très en amont de la voie de synthèse des composés anti-microbiens analysés dans les autres études et que notre approche méthodologique ne nous a pas permis de quantifier. Des modifications de leurs concentrations peuvent donc satisfaire les besoins métaboliques d'autres processus comme la synthèse d'acides aminés aromatiques et la déposition du polymère de défense lignine. L'analyse métabolomique a de plus révélé que les teneurs en phénylpropanoïdes diminuent dans les feuilles pour augmenter dans les racines, et ce de manière similaire chez les deux cultivars. L'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur cette famille de composés n'est donc pas liée à la spécificité de la relation PGPR-hôte. Comme aucun transcrit impliqué dans la biosynthèse des composés phénoliques n'étaient affectés par *A. lipoferum* CRT1, les variations de teneurs observées peuvent résulter d'une modulation de leur transport à travers la plante. Le rôle joué par les composés phénoliques dans l'interaction avec *Azospirillum* reste à déterminer.

Toute une série de réponses métaboliques et transcriptomiques observées dans cette étude suggèrent cependant qu'une induction de tolérance aux stress environnementaux est induite en parallèle à une réponse morphologique à l'inoculation avec *A. lipoferum* CRT1 alors qu'une manifestation d'un stress biotique se développe en parallèle d'une absence de réponse morphologique. L'élément le plus frappant de cette différence de comportement vient de la régulation différente des voies de signalisation des deux hormones, les acide abscissique (ABA) et acide jasmonique (JA) classiquement impliquées dans une gestion différentielle, voire opposée, des interactions entre les plantes et leur environnement (Puga-Freitas et Blouin 2015; Thaler et Bostock 2004). L'expression du transcrit A3F4K2, correspondant à la protéine JAZ 2C-type protein phosphatase, un élément clé de la cascade de signalisation de l'acide jasmonique (JA) contrôlant la production de molécules de défense, est en effet spécifiquement

augmentée dans les feuilles du cultivar FuturiXX inoculé avec *A. lipoferum* CRT1 (p=0,00005 ; FC=3,0) (Figure 3.8A). Inversement, ce sont deux transcrits impliqués dans la cascade de signalisation de l'ABA (contrôlant la tolérance à sécheresse par fermeture des stomates notamment) dont l'abondance est spécifiquement augmentée dans les feuilles du cultivar Seiddi : le transcrit de l'abscisic acid receptor PYL5 (A0A075T3F1) et celui du facteur de transcription TIFY25 (C0PFI1) (Figure 3.8B). Bien que les cascades de signalisation de ces deux hormones soient activées dans les feuilles, l'analyse de la composition de la sève ascendante dans le chapitre précédent (Chapitre 2) n'a pas réussi à y détecter leur présence du fait probablement de limitations technologiques qu'il serait donc intéressant de lever.

Une augmentation de tolérance aux stress environnementaux de Seiddi par *A. lipoferum* CRT1 est aussi suggérée par l'analyse des teneurs en galactinol et en proline. Le galactinol est une molécule signale connue pour induire l'ISR (Induced Systemic Resistance) lors de stress environnementaux ou d'infection bactérienne (Cho *et al.* 2010; Kim *et al.* 2008). La proline voit quant à elle sa teneur augmenter dans de nombreux végétaux suite à un stress salin, de fortes températures ou un déficit en nutriments (Hare et Cress 1997; Verbruggen et Hermans 2008) pour apporter son effet protecteur sur l'intégrité membranaire et les ajustements osmotiques (Ashraf et Foolad 2007). L'idée d'une application exogène de proline a même été envisagée en agriculture afin d'aider la culture de certaines plantes en condition de stress environnementaux (Heuer 2003). Dans cette étude, la teneur en galactinol était augmentée dans les racines de Seiddi et diminuée dans celles de FuturiXX suite à une inoculation par *A. lipoferum* CRT1. Celles de la proline n'étaient pas affectées chez FuturiXX alors qu'elles étaient augmentées dans les racines, et diminuées dans les feuilles, de Seiddi inoculé suggérant une modification de sa répartition pour une augmentation ciblée de tolérance au niveau des racines.

De nombreux transcrits impliqués dans des actions de tolérance aux stress ont une abondance accrue chez Seiddi suite à une stimulation par *A. lipoferum* CRT1 comme ceux codant pour les protéines CSC1-like protein ERD4 (A0A1D6F9C8), AP2-EREBP transcription factor (K7W3W6 et C0PJT2), protein BONZAI 3 (C0HFS2) ou plusieurs DNAJ heat shock N-terminal domain-containing proteins (B4FLU2, B6U5G7 et A0A1D6NDD0).

Un épaississement des parois semble aussi induit chez Seiddi par *A. lipoferum* CRT1 pour accroitre la tolérance aux pathogènes (Hématy *et al.* 2009; Underwood 2012) et aux pertes en eau par déshydratation (Caffall et Mohnen 2009). Les transcrits correspondant à cette fonction biologique sont en effet tous spécifiquement augmentés dans les feuilles du cultivar Seiddi après inoculation en parallèle d'un enrichissement fort du terme GO correspondant à la

régulation de la synthèse de macromolécules. Ces transcrits sont issus des gènes de la cellulose synthase-like protein E1 (C0PCY6), de l'alpha-expansin 1 (Q94KT7) et de la tubulin beta-7 chain (A0A1D6JI52). Cette conclusion corrobore des observations antérieures montrant une augmentation de diamètre des tiges de maïs (données non-montrées ; El Zemrany *et al.* 2007) et de la composition chimique de leurs parois cellulaires (El Zemrany *et al.* 2007) suite à une inoculation par *A. lipoferum* CRT1 ou d'autres PGPR (Jha 2017).

Une réponse aussi tranchée sur le développement pariétal n'a pas été vue avec le cultivar FuturiXX. Au contraire, les analyses transcriptomiques conduites sur ce cultivar suggèrent une réponse de type burst oxydatif suite au contact avec *A. lipoferum* CRT1, avec un enrichissement très significatif du terme GO sur les processus biologiques oxydo-réducteurs et une modulation de l'expression de gènes tels que l'oxidative stress 3 (C0HGS8), l'hydrogen peroxide-induced 1 (B6TIB8) et la glutathione transferase GST 23 (A0A1R3QP52). Contrairement à Seiddi, FuturiXX subit des baisses d'expression de gènes impliqués dans la tolérance aux stress comme l'hypersensitive-induced response protein 2 (A0A1D6EAY6) et l'osmotin-like protein OSM34 (B4FV56).

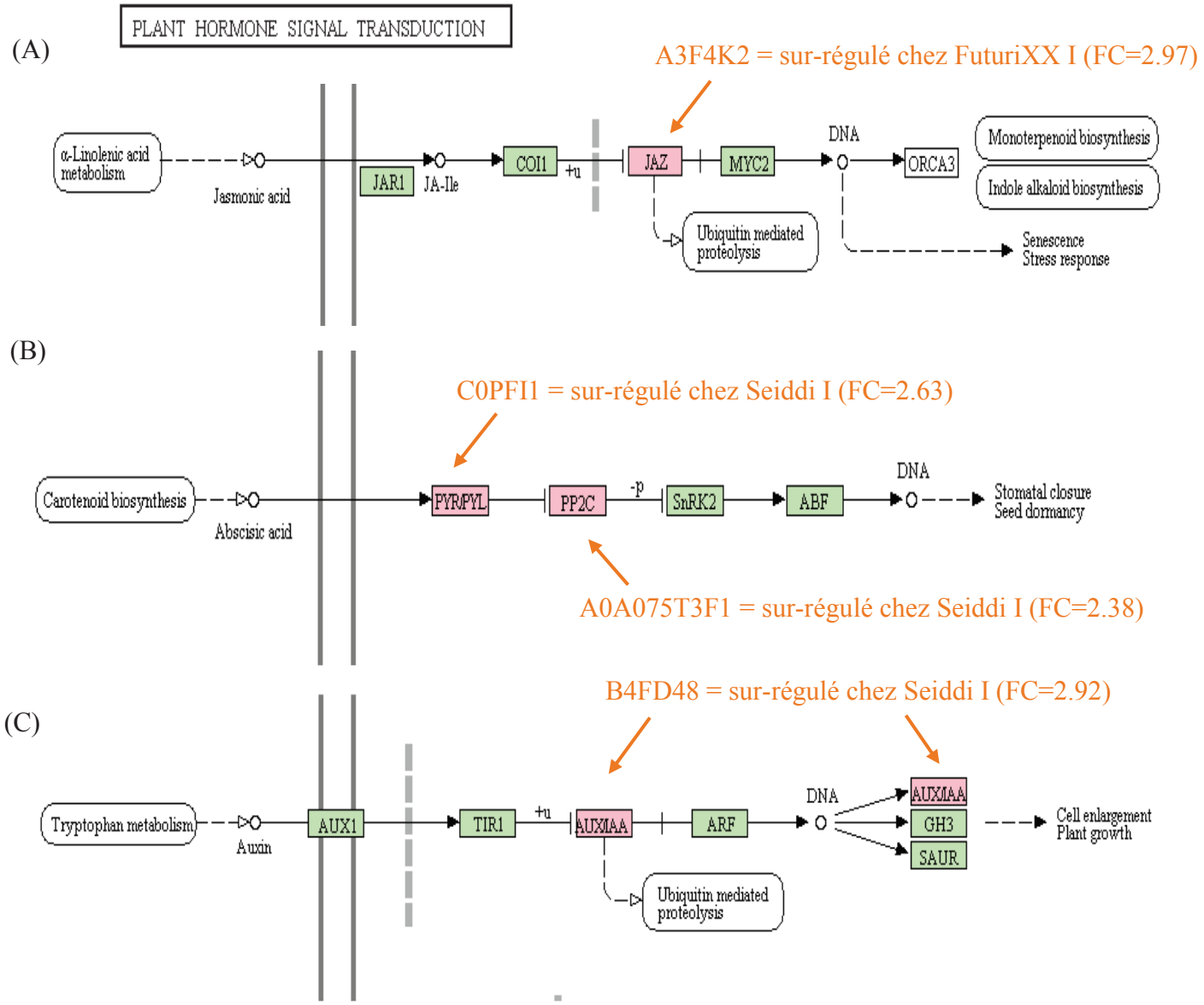


Figure 3.8 : Modification de la régulation de différents gènes intervenant dans les voies de signalisation cellulaire des hormones JA (A), ABA (B) et auxines (C) au niveau des compartiments foliaires des deux cultivars.

Le retraitement a été réalisé à l'aide du site KEGG.

Modulation de la croissance

Le transcrit B4FD48 (auxin-responsive protein), qui intervient dans la voie de signalisation cellulaire des auxines, principaux régulateurs hormonaux du développement et de la croissance des plantes (p=0,0005 ; FC=2,9) et un transcrit codant pour une WAT1-related protein, un transporteur vacuolaire d'auxine (p=0,0003 ; FC=2,2), étaient spécifiquement plus abondants dans les feuilles du cultivar Seiddi (Figure 3.8C). Au moment où les analyses ont été effectuées, aucune augmentation de masse des parties aériennes n'était visible chez Seiddi (Chapitre 2). Mais une analyse des surfaces des feuilles en croissance (3ème feuille en partant du bas) a montré qu'elles ont une surface supérieure chez les pieds inoculés avec *A. lipoferum* CRT1 (donnée non-montrée). Les analyses de morphologie foliaire réalisées en champ sur ce cultivar au stade 4-6 feuilles ont également révélé une surface plus importante des feuilles après inoculation (Chapitre 4). La croissance des parties aériennes est donc spécifiquement activée dans les pieds de Seiddi analysés dans cette étude, même si encore peu flagrante, et corrèle donc avec l'activation de l'action d'auxines révélée par les analyses transcriptomiques. La médiation par les auxines de l'induction de croissance végétale est un concept important pour expliquer l'interaction entre *Azospirillum* et ses hôtes végétaux (Cassán *et al.* 2013; Okon 1993). Il est basé sur l'observation que de nombreuses souches d'*Azospirillum* sont capables de produire des auxines et notamment de l'IAA, et que les modifications de morphologie induites par *Azospirillum* ressemblent à celles induites par les auxines. La présence d'auxines microbiennes dans une plante ou l'activation de la cascade de signalisation des auxines n'ont cependant encore jamais été observées. Dans le chapitre précédent, la présence d'auxines n'a pas été détectée dans la sève ascendante. Le séquençage complet du génome *d'A. lipoferum* CRT1 n'a pas mis en évidence les gènes comme *ipdC* (C. Prigent-Combaret, communication personnelle) classiquement impliqués dans la synthèse d'auxines par les bactéries (Malhotra et Srivastava 2008). Il est donc probable que la cascade auxinique régulatrice de croissance soit activée par un autre signal chimique que des auxines lors d'une interaction avec *A. lipoferum* CRT1. Un modulateur possible est le glucose car il est connu pour avoir une action (généralement négative) sur la cascade de signalisation des auxines (Mishra *et al.* 2009; Moore *et al.* 2003b) et car sa concentration est diminuée dans la sève ascendante lors d'un contact avec *A. lipoferum* CRT1 (Rozier *et al.* 2016; Chapitre 2).

En dehors de la cascade auxinique, d'autres transcrits dont l'expression est spécifiquement augmentée par *A. lipoferum* CRT1 chez Seiddi suggèrent une augmentation de croissance. L'expression du transcrit codant pour la protéine RALF (B6SJC1) est par exemple plus

importante dans les feuilles des plantules inoculées (p=0,00155; FC=2,3). Cette protéine est connue pour induire croissance et développement chez le maïs (Sharma *et al.* 2016). Le gène codant pour la protéine EXORDIUM (A0A1D6HKS2), qui intervient dans l'allongement cellulaire et en tant que signal de développement, est de même spécifiquement fortement sur-exprimé chez Seiddi (p=0,00005; FC=3,6) (Coll-Garcia *et al.* 2004; Schröder *et al.* 2009).

L'augmentation par *A. lipoferum* CRT1 de l'expression de la protéine BONZAI 3 notée dans la section ci-dessus pour induire chez Seiddi une meilleure tolérance aux stress peut également concourir à accroitre la croissance durant un stress du fait de son action double sur ces deux phénomènes (Hua *et al.* 2001; Yang *et al.* 2006). Pareillement, l'augmentation de la synthèse de paroi également notée dans la section ci-dessus pour son action protectrice peut aussi être la conséquence d'une croissance accrue. Des augmentations sont observées spécifiquement chez Seiddi des teneurs en métabolites et transcrits liés à la synthèse de matériel génétique (adénine, thymine et transcrits partageant les fonctions cellulaires de régulation du métabolisme des composés contenant des nucléobases et de la biosynthèse cellulaire). Cette augmentation de la synthèse de matériel génétique s'accompagne d'une augmentation conjointe, toujours spécifiquement chez Seiddi, d'une myriade d'activités métaboliques énergétiques et anaboliques qui, conjointement, peuvent être les signes d'une croissance accrue (enrichissement de termes GO d'activité cellulaire de régulation du métabolisme primaire, du métabolisme des composés azotés, du métabolisme cellulaire, de la biosynthèse et du métabolisme des macromolécules et de l'expression de gènes).

Spécificité de l'interaction maïs-A. lipoferum CRT1

Un des constats importants de cette étude est que les deux cultivars utilisés lors de cette étude se sont révélés avoir des métabolomes et transcriptomes très différents même avant inoculation avec *A. lipoferum* CRT1. Des différences aussi marquées entre cultivars au sein d'une même espèce ont également été décrites dans d'autres espèces tels que l'orge (Kogel *et al.* 2010) et le ginseng (Lee *et al.* 2017). Elles expliquent probablement les réponses différentes à *A. lipoferum* CRT1 observées au niveau des métabolomes, transcriptomes, de la morphologie et du potentiel photosynthétique. Des spécificités de relation aussi strictes ont déjà été observées entre des souches d'*Azospirillum* et des céréales avec des réponses tout aussi différentes des hôtes végétaux en termes de métabolomes et transcriptomes (Chamam *et al.* 2013; Drogue *et al.* 2014; Walker *et al.* 2011a). Aucun indice ne permet cependant de suggérer laquelle des différences entre cultivars peut être la cause de réponses biologiques aussi contrastées. Des études sur le dialogue chimique entre les deux partenaires n'ont pas encore été réalisées.

Que ce soit au niveau métabolomique ou transcriptomique, les modifications induites par *A. lipoferum* CRT1 étaient toujours bien inférieures en ampleur aux différences inter-cultivars. A part si *Azospirillum* apporte à son hôte des compétences génétiques nouvelles lui permettant d'acquérir de nouvelles fonctions cellulaires ou biochimiques, cette observation suggère que la sélection variétale a la marge nécessaire pour compenser les gains de fonctionnement que peut lui apporter un ajout d'*Azospirillum*.

<u>*Coordination des activités racinaires et foliaires*</u>

Dans le cas du cultivar de maïs FuturiXX, qui ne présente pas de réponse morphologique et photosynthétique à *A. lipoferum* CRT1, une baisse de concentration des intermédiaires du cycle de Krebs est observée dans les racines. Cette baisse, qui concerne aussi quelques autres métabolites primaires (hors composés phénoliques), se répercute au niveau des feuilles. Il semble donc qu'elle résulte d'une consommation accrue de substances carbonées, probablement par la bactérie au niveau des exsudats racinaires. Les analyses transcriptomiques ont révélé une modulation des activités métaboliques globales et non leur régulation coordonnée. Ceci a probablement pour objectif d'éviter qu'une plus grande consommation racinaire n'impacte le développement/fonctionnement de la plante.

La situation est différente au niveau du cultivar Seiddi qui présente des modifications morphologiques en réponse à *A. lipoferum* CRT1. Les concentrations de nombreux sucres (maltose, sophorose) ou acides aminés (proline) augmentent dans les racines pour conjointement diminuer dans les feuilles. Les analyses transcriptomiques suggèrent également un certain niveau de coordination dans la réponse végétale avec la modulation de groupes de transcrits conjointement impliqués dans des fonctions régulatrices de voies métaboliques. Les analyses de la sève ascendante dans le chapitre précédent (Chapitre 2) confirment cet effet de séquestration de nombreux métabolites énergétiques dans les racines au détriment des parties aériennes car leur teneur baissait dans la sève ascendante. Les conséquences paraissent positives pour l'agent bactérien car les racines apparaissent alors comme un meilleur 'puits' à carbone pour les activités 'sources' des feuilles. Au stade de jeunes plantules, les racines et jeunes feuilles en croissance sont des 'puits' naturels aux photosynthétats élaborés par les chloroplastes (Lemoine *et al.* 2013; Wardlaw 1990). L'augmentation de la force 'puits' des racines après inoculation bactérienne va aider les chloroplastes à se vider de leurs production et donc à fonctionner plus efficacement, un phénomène que nous avons observé (Chapitre 2). Une quantité plus importante de sucres et acides aminés au niveau des racines va aussi soutenir leur croissance accrue et la nutrition du symbiote bactérien. Les mécanismes mis en œuvre pour

modifier la répartition des sucres entre les compartiments racinaire et foliaire restent cependant obscures. Cette étude a uniquement mis en évidence la sur-expression du gène *tie-dyed 1* dont la fonction est d'aider au chargement des carbohydrates dans le phloème. Aucun autre transporteur de sucres n'a été sur- ou sous-régulé par l'inoculation avec *A. lipoferum* CRT1. Ces protéines font partie de familles multigéniques et ont un fonctionnement complexe qui n'est pas uniquement régulé au niveau de la transcription. L'étude de l'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur leur fonctionnement parait cependant intéressante pour mieux comprendre les mécanismes d'induction d'une augmentation de croissance végétale par *A. lipoferum* CRT1. L'analyse de la composition chimique de la sève élaborée et transitant dans le phloème serait également intéressante.

Conclusion

En conclusion, cette étude met en lumière la complexité de la relation entre *A. lipoferum* CRT1 et le maïs avec des impacts multiples sur l'hôte végétal tant au niveau de sa morphologie, son activité photosynthétique, son métabolome et son transcriptome. Comment tous ces effets sont coordonnés reste un mystère même si un faisceau indirect suggère que les sucres simples jouent un rôle important de régulateur transcriptionnel et de modulateur du fonctionnement de la photosynthèse et de la croissance. Cette étude caractérise plus en profondeur l'impact systémique de la bactérie sur son hôte et visualise pour la première fois des preuves moléculaires de l'augmentation de croissance avec un rôle prépondérant suggéré de la cascade de signalisation des auxines. Comme aucune production d'auxine par *A. lipoferum* CRT1 ni aucun mouvement systémique d'auxine n'ont été mis en évidence, il est possible que cette cascade de signalisation modulée notamment au niveau des feuilles soit activée par un autre signal qui reste à déterminer.

Cette étude confirme également que l'application d'une souche d'*Azospirillum* à un cultivar de céréale non-compatible avec la symbiose s'accompagne d'une réponse de défense de type incompatible de la part de la plante, notamment oxydo-réductives, et une modulation de la voie de signalisation intrancellulaire de JA. Par contre, elle montre pour la première fois que la mise en contact avec un cultivar compatible avec la symbiose (développant une morphologie et photosynthèse accrue) s'accompagne d'un gain de tolérance aux stress et active les cascades de signalisation de l'ABA et des auxines.

CHAPITRE 4 : Analyse en champ des mécanismes physiologiques et métaboliques de modification du rendement en grain du maïs par la PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1

1. Introduction

1.1 Contexte

L'utilisation de bactéries induisant des effets phytobénéfiques variés sur leur plante hôte, les PGPR, a très vite été établie comme une de ces nouvelles technologies non polluantes permettant d'augmenter le rendement des cultures (Fan *et al.* 2017). L'augmentation du rendement en champ par les PGPR peut être la résultante des différents mécanismes d'action de ces bactéries phytobénéfiques sur la plante, que ce soient des effets physiologiques et morphologiques (modifications de l'architecture racinaire, solubilisation du phosphate, fixation de l'azote atmosphérique *ect*…) mais aussi en aidant la plante dans sa résistance contre des stress biotiques et abiotiques (compétition avec des pathogènes, synthèse de composés antimicrobiens et antifongiques, stimulation des mécanismes de défense de la plante tels que l'ISR) (Choudhary *et al.* 2007; Bhattacharyya et Jha 2011; Heidari *et al.* 2011; Orhan *et al.* 2006). Le screening de souches de PGPR a donc été intensifié afin de trouver des souches agissant comme des biostimulants et une augmentation des rendements lors de l'inoculation avec ces souches de 13 à 65% a été observée (Laudick 2017). Néanmoins, un grand nombre d'études a mis en évidence la variabilité de l'efficacité des PGPR en comparant des essais en champ et en conditions contrôlées mais aussi des essais avec le même couple plante/PGPR mais sur différentes parcelles (Díaz-Zorita et Fernández-Canigia 2009).

1.2 Objectifs

Même si les analyses métabolomiques et transcriptomiques des deux chapitres précédents (Chapitre 2 et 3) ont permis de construire des hypothèses sur la nature des modifications biochimiques induites par *A. lipoferum* CRT1 chez son hôte, le maïs, pour en modifier la morphologie et l'activité photosynthétique, elles ont aussi révélé la complexité de l'interaction entre les deux partenaires. La présence d'*A. lipoferum* CRT1 sur les racines de son hôte affecte la transcription de gènes aux ontologies très différentes et le contenu de substances appartenant à des voies métaboliques variées. Ce niveau de complexité de l'interaction plante-PGPR avait été suggéré par de très nombreuses études portant sur le séquençage complet des génomes des PGPR et l'analyse fonctionnelle de gènes cible. Il a ainsi été montré que les souches analysées produisent de manière concomitante de nombreuses hormones végétales et une variété de substances élicitrices ou antibiotiques ayant le pouvoir d'agir sur la plante hôte et son microbiome racinaire. S'ajoutent à cela des capacités à améliorer la nutrition de la plantes en éléments clés comme l'azote, le phosphore et le fer. Ces diverses sollicitations sont alors intégrées par la plante en conjonction avec d'autres sollicitations abiotiques (température, nature

du sol, lumière, sécheresse) et biotiques (pathogènes, ravageurs) pour développer une réponse morphologique et physiologique. La réponse de la plante aux diverses sollicitations de la PGPR est donc intrinsèquement dépendante des conditions de culture, expliquant peut-être ainsi la forte variabilité des augmentations de rendement observée dans diverses études. Comme de très nombreuses autres équipes de recherche, nous avons conduit nos travaux dans des conditions de culture contrôlées. Cela a eu l'avantage de nous fournir une grande reproductibilité dans nos mesures. Mais rien ne nous dit que les réponses morphologiques, physiologiques, métabolomiques et transcriptomiques que nous avons observées sur jeunes plantules de maïs après une inoculation par la PGPR *A. lipoferum* CRT1 ne sont pas strictement dépendantes des conditions de cultures que nous avons utilisées. Il est également impossible de savoir lesquelles des modifications conduisent à une augmentation de rendement en champ. L'objectif de cette étude a donc été de déterminer quelles modifications précoces (métaboliques, morphologiques, physiologiques ou de tolérance à un pathogène) du maïs par *A. lipoferum* CRT1 peuvent expliquer une augmentation ultérieure de rendement.

1.3 Démarche expérimentale

L'approche utilisée a été une approche statistique exploitant ce qui est la plus grande faiblesse de l'usage des PGPR comme forme d'ingénierie agroécologique, c'est à dire l'incapacité à reproduire entre sites et années des augmentations de rendement (Díaz-Zorita et Fernández-Canigia 2009). Cet aspect qui a été observé dans de nombreux pays dont la France est revu plus en détail dans la section 2 ci-dessous. Le set-up expérimental a donc eu pour objectifs 1/ de maximiser les différences entre les conditions de culture dans l'espoir d'obtenir des impacts aussi différents que possible sur le rendement par *A. lipoferum* CRT1, 2/ de multiplier les essais pour améliorer la résolution statistique des résultats et 3/ de doser un grand nombre, et une grande diversité, de marqueurs précoces d'effets d'*A. lipoferum* CRT1 sur son hôte.

En pratique, trois sites aux situations pédologiques contrastées ont été sélectionnés dans la même zone climatique (Isère, 38, France). Tous étaient conduits en agriculture conventionnelle dont l'un en non-labour. L'un des sites a été répliqué localement sous conduite d'agriculture biologique générant ainsi 4 parcelles expérimentales nommées FC, L, C et Corg. Le même cultivar de maïs, Seiddi (Caussade Semences), que celui utilisé dans les Chapitres 2 et 3 a été pelliculé avec *A. lipoferum* CRT1 par le groupe Lesaffre (filiale Agrauxine) juste avant d'être semé sur les 4 sites. Chaque parcelle a été divisée en cinq blocs où des conditions de semis sans inoculation, avec inoculation et sous des doses croissantes d'apport d'engrais azoté ont été

semées de manière aléatoire sur chaque bloc (modèle statistique du split-plot). Les métabolomes, caractéristiques morphologiques et potentiel photosynthétique de plantules aux stades 4-6 feuilles ont été mesurés sur chaque placette ainsi que le rendement en grain de chaque placette. L'expérience a été répétée deux années consécutives selon le même schéma et le jeu de données analysé statistiquement par des statistiques descriptives puis inférentielles.

2. Résultats

Rozier, C., Hamzaoui, J., Lemoine, D., Czarnes, S. and Legendre, L. (2017).
Field-based assessment of the mechanism of maize yield enhancement by *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Scientific Reports*, 7(1):7416. doi: 10.1038/s41598-017-07929-8

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Field-based assessment of the mechanism of maize yield enhancement by *Azospirillum lipoferum* CRT1

Received: 24 March 2017

Accepted: 3 July 2017

Published: xx xx xxxx

Camille Rozier[1], Jihane Hamzaoui[1], Damien Lemoine[2], Sonia Czarnes[1] & Laurent Legendre[1]

Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) of the genus *Azospirillum* are known to enhance root growth and yield in many plant species including cereals. To probe the underlying mechanisms, correlations between modifications of yield and 6-leaf plantlet characteristics were estimated on maize in four fields with contrasting soil properties over two consecutive years using the commercial isolate *A. lipoferum* CRT1. In both years, plantlet metabolome, photosynthetic potential and organ morphology were found to display field- and inoculation-specific signatures. Metabolomic analyses revealed that *A. lipoferum CRT1* mostly affected sugar metabolism with no suggested impact on N and P assimilation. Mineral nitrogen feeding increased yield but did not affect yield enhancement by the bacterial partner. However, greater improvements of leaf photosynthetic potential correlated with yield diminutions and larger plantlets in all of their proportions correlated with yield enhancements. Bacterial inoculation restored proper seed-to-adult plant ratio when it accidentally dropped below 80%. Only in these cases did it raise yield. All in all, securing mature plant density is hypothesized as being the primary driver of *A. lipoferum* CRT1-mediated yield enhancement in maize fields.

Over the past decades, conventional agriculture has become highly dependent on mineral nitrogen, phosphorus and potassium fertilization to increase production and meet world demand[1]. However, these mineral nutrients originate from limited resources and mineral nitrogen

[1] Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne, France; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, INRA, UMR 1418, Villeurbanne, France. [2]Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, CNRS, UMR 5023 - LEHNA, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R. (email: camille.rozier@univ-lyon1. fr)

lixiviation into fresh water systems is a serious hazard[2]. Despite improvements in plant selection, soil structure and nutrient formulations, current levels of mineral fertilization remain unsustainable[3–5].

Since their early description in 1978 by Kloepper and Schroth[6], Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) represent an attractive source of technologies to maintain yields while reducing mineral nutrition with additional benefits in plant protection against pests and abiotic stresses[7–10]. The majority of PGPB comes from the Firmicutes and Proteobacteria. They engage in associative symbioses on plant root surfaces, or as root endophytes, without the development of specialized structures such as nodules[11–13]. Among PGPB, members of the genus *Azospirillum* have attracted particular attention since they are innocuous and are able to increase yields of many crop species including cereals[14]. A meta-analysis of field trials conducted between 1981 and 2008 notably revealed average enhancements of grain and forage yields of 15 and 27% (n = 91) after wheat inoculation with *Azospirillum* in the absence of nitrogen fertilization[15]. Nevertheless, despite some usage of *Azospirillum*-based commercial products in Latin America[16], wider usage has been impaired by the variability of the effects as revealed, for example, by the comparative analysis of shoot biomass and grain yield increases in *A. brasilense*-inoculated wheat at 297 locations from 2002 to 2006[17]. A review of field assays conducted worldwide[18] found that all reports of assays conducted in Brazil and Mexico described positive yield-enhancements by *Azospirillum*. However, up to as low as 60% of field assays conducted in Egypt, India and Uruguay concluded to yield-enhancements while only 5 such cases were seen out of 6 years of experimentations in 12 locations in France. Positive effects on yield were even considered as 'erratic' in field assays conducted in the USA where no correlation was found with host plant, soil type and N fertilization.

Functional and full genome sequencing studies have attempted to unveil the molecular basis for plant growth-promotion by *Azospirillum*. They have led to the elaboration of several elegant concepts that involve direct or indirect improvements of plant nutrition by *Azospirillum* (reviewed in refs 19 and 20). Several isolates indeed have the genetic ability to transform nitrogen gas into the water-soluble and plant-absorbable form, ammonium[21], solubilize soil phosphorus[22] and chelate ferric iron with siderophores[23]. Inoculation of maize seeds with *A. lipoferum* leads to a reduction of ascending sap glucose content to lift its feedback down-regulatory inhibition of leaf photosynthetic potential[24] while wheat plants inoculated with *A. brasilense* accumulate higher quantities of photosynthetic pigments[25]. Both activities foster C fixation to sustain increased plant growth. All analyzed *Azospirillum* strains have the potential to alter the hormonal balance of their host by secreting plant hormones such as auxins and cytokinins and by expressing enzymes capable of metabolizing the precursor of ethylene[15, 26]. In support of these concepts, maize plantlets artificially-inoculated with *A. lipoferum* display an altered root system phenotype with more numerous, longer

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

lateral roots under field and greenhouse conditions[27]. This allows roots to explore a larger volume of soil in search for nutrients and water. However, the contribution of enhanced mineral nutrient access (especially nitrogen-based) to the final crop yield in a field context is currently a subject of debate[28] and the potential contributions of *Azospirillum*-induced modifications of photosynthesis and root system architecture to crop yield have also not yet been probed. Because an exogenously added *Azospirillum* strain will only remain on its host root system for up to 57 days[29], it is hypothesized that early impacts of these bacteria on one, or several, physiological parameters of the host plant such as on root or shoot morphology, leaf photosynthesis or organ metabolite contents (as a result of improved nutrient access for example) are key determinants of bacterial impact on late yields.

In this study, maize seeds were coated with *A. lipoferum* CRT1, a commercial *Azospirillum* strain that was originally isolated from the maize rhizosphere[30] and found to stimulate maize yield and plantlet growth under field[29] and greenhouse[27, 31] conditions. Inoculated seeds were sown in 4 different agronomic sites that were close geographically but differed in their soil qualities or agronomic practices. Early responses to *Azospirillum* inoculation on seedling morphology, metabolite content, and photosynthetic potential were measured during two successive years. These were compared to late-occurring measures of yield, such as plant density and grain yield at harvest.

Materials and Methods

Bacterial culture and coating on seeds. Organic grade seeds of the maize (*Zea mays* subsp. *mays* L.) genotype Seiddi (Caussade Semences, Caussade, France) were coated by Lesaffre (Agrauxine branch, Beaucouzé, France) with a peat slurry containing *A. lipoferum* CRT1 according to previous protocols[29]. Basically, single colonies of pure plate cultures were grown in liquid culture until they accumulated 2–4 poly-*β*-hydroxybutyrate (PHB) bodies. These can be seen under the light microscope and their chemical composition was confirmed by staining with Nil red[32]. These bodies provide food to the bacteria until roots have emerged and can supply exudates. They also help the bacteria stand adverse conditions such as drought and oxidative stress while on the seeds[33]. As bacteria reach this physiological state, proper mobility was checked microscopically and the absence of contaminants determined by plating on Congo red medium according to[34]. The adequacy of the bacterial agent was also assessed by PCR according to[24]. In total, 10^{12} bacteria were harvested by centrifugation (4 000 g, 10 min) resuspended in 200 mL of PCB^{+} medium (tryptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, glucose 20 g/L, pH 7.0), 400 g dry peat (LegumeFix; Legume Technology Ltd, Epperstone, UK) and wetted with 778 mL UP water to yield a bacterial density of $9.7*10^{7}$ CFU/mL peat slurry. Two mL of bacterial peat slurry were mixed with 50 g of seeds. Since the average seed weight was 0.37 g, it yielded a final bacterial density of $1.4*10^{6}$ CFU/seed. A parallel batch of seeds was similarly inoculated at a final density of 10^{7} CFU/seed by

starting with 10 times more bacteria. Finally, equivalent lots of seeds were similarly mock-coated with a peat slurry that did not contain the bacterium. Each year, a single batch of an appropriate quantity of seeds sufficient for all field trials was coated, dried in ambient air for a few minutes and stored in the dark at room temperature in paper bags for ca. 3 days until sowing. For germination assays in growth chambers, inoculated seeds were used immediately. In a previous study conducted in the same geographic region with the same coating procedure[29], the presence of the bacteria was attested on the plant roots, and its tightly adhering soil, after seed germination. Bacteria viability and density were shown to be unchanged for 30 days post-sowing to then sharply decline and be negligible 57 days post-sowing.

Two days old seedling morphology. Maize seeds that had similar mass (between 0.3609 g and 0.3780 g) and shape were selected in order to reduce germination time heterogeneity. They were inoculated with the bacteria at a final density of $1.4*10^6$ CFU/mL or mock-inoculated as described in the above section on 'Bacterial culture and coating on seeds'. Seeds were laid on a damp filter paper within closed Petri dishes. Bacteria-inoculated and mock-inoculated seeds were placed in separate Petri dishes. Petri dishes were kept in the dark for 48 h at room temperature before being photographed and the length of the radicles measured.

Field characteristics and sowing. Commercial fields run according to local agronomic practices were selected because of their geographic proximity (within a 20 km distance) and their differing soil characteristics. One was a fluvic cambisol (called FC - Sérézin-de-la-Tour, France), one was a luvisol (called L - Chatonnay, France) and one was a calcisol (called C - Saint Savin, France). A field neighboring field C (called Corg) and run under organic practices was also selected. The main characteristics of the surface soil (top 5–30 cm) were measured by CESAR Laboratory (Ceyzériat, France) and are summarized in Table 1. All fields had a crop rotation of wheat the year that preceded the assays of this study.

Flat sections of the fields were divided into 5 replicate blocs that were subdivided into 10 (FC), 8 (L and C) or 4 (Corg) plots of 115 m^2 (FC, C and Corg) or 77 m^2 (L) according to a split-plot design. Treatments were applied

Field	Soil type	GPS coordinates	Altitude (m)	Texture (%)			pH		$CaCO_3$ ($g.Kg^{-1}$)	$C_{organic}$ ($g.Kg^{-1}$)	N_{total} ($g.Kg^{-1}$)	C/N	Phosphorus ($g.Kg^{-1}$)	Cation exchange ($cmol.Kg^{-1}$)			
				sand	loam	clay	H_2O	KCl						CEC	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+
FC	Fluvic Cambisol	N45°28′42.25″ E05°14′53.24″	279	26.9	38.3	34.7	7.1	6.3	4	31.6	3.4	8	0.153	22.8	10.6	0.34	0.38
L	Luvisol	N45°34′01.11″ E05°16′32.62″	535	42.9	42.9	14.2	7.3	6.7	2	21.5	1.6	12	0.171	9.3	5.25	0.17	0.43
C	Calcisol	N45°37′46.77″ E05°16′32.62″	217	15.6	74.1	10.3	8.2	7.7	840	25.9	3.1	8	0.132	9.7	18.05	0.12	0.29

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

Corg	Calcisol	N45°38′20.82″ E05°16′22.00″	215	27.4	62.5	10.2	8.4	7.9	773	20	2.1	9	0.134	6.5	21.30	0.22	0.31

Table 1. Field characteristics of the top (5–30 cm) soil layer. CEC: cation exchange capacity.

in plots once per bloc (i.e. n = 5 for each treatment in all field) and were randomized in a different manner within each bloc. Fields were sown 3–4 cm below ground at a similar soil temperature on 04/18/2014 (FC), 04/23/2014 (L and C), 04/30/2015 (C, Corg) and on 05/11/2015 (FC and L). Based on soil characteristics, they were sown at densities of 98 000 seeds/ha (FC in 2014 and 2015), 90 000 seeds/ha (C in 2014), 94 000 (C in 2015), 89 000 seeds/ ha (L in 2014 and 2015) and 94 000 seeds/ha (Corg in 2015) with an 80 cm spacing between each row (12 rows for FC, C and Corg and 8 rows for L).

Fields L and C received a yearly P-K fertilization (in Kg/ha: 30–60, field C in 2014; 57.25–101.83, field L in 2014; 45–60, field L in 2015) at sowing. Field FC received no P-K fertilization during the assays. At sowing, field L was weeded with Adengo (Bayer, Lyon, France) at 1.5 L/ha in 2014 and Elumis (1.2 L/ha; Syngenta, Bâle, Switzerland) and Bavel 4 S (0.4 L/ha; Syngenta, Bâle, Switzerland) in 2015. It was protected against slugs with Extralugec (Phytoeurop, Levallois-Perret, France) at 4 Kg/ha. Field FC was weeded with Laudis (0.3 Kg/ha; Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, Germany), Pampa (0.8 L/ha; Belchim Crop Protection, Lissieu, France), Actirob b (0.8 L/ha; Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, Germany) and Banvel 4 S (0.3 L/ha; Syngenta, Bâle, Switzerland) in 2014 and Pampa (1 L/ha; Belchim Crop Protection, Lissieu, France), Callisto (0.8 L/ha; Syngenta, Bâle, Switzerland) and Casper (180 g/ha; Syngenta, Bâle, Switzerland) in 2015. It was protected against slugs with Extralugec (Phytoeurop, Levallois-Perret, France) at 9 Kg/ha in 2014 and 6 Kg/ha in 2015. Field C was weeded with Camix (3.7 L/ha; Syngenta, Bâle, Switzerland) and Emblem Flo (0.8 L/ha; Nufarm, Melbourne, Australia) in 2014 and received no treatment against slugs. Individual plots of fields FC, L and C received either no N fertilization or were fertilized with ammonium nitrate (33.5% N) at maximum levels (120 Kg N/ha for FC and C in 2014, 180 Kg N/ha for L in 2014, 100 Kg N/ha for C in 2015, 160 Kg N/ha for L in 2015, 120 Kg N/ha for FC in 2015 based on soil characteristics at sowing) or intermediate levels as indicated in the result section and in the figure legends. N fertilization was added at the 6-leaf stage unless otherwise stated in the result section and in the figure legends. Field Corg was fertilized with meat flour (120 Kg N/ha) on 04/15/2015 and weeded mechanically with no pesticide added.

Six-leaf stage physiological measurements. All plots were divided into two equal halves, with the divider perpendicular to the rows. In one half, plants of the central rows were randomly chosen for photosynthetic efficiency, leaf and root architectures, and metabolite analyses. These plants were harvested at the 6-leaf stage a few days prior to N fertilization if applicable on 05/14/2014 (FC), 05/16/2014 (L), 05/22/2014 (C), 06/08/2015 (FC and L) and 05/27/2015 (C and Corg). The maximum quantum efficiency of PSII primary photochemical conversion

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

(Fv/Fm with Fv = Fm-F0) and the efficiency of the overall reaction centers of PSII under light (Ft/ Fm') of the youngest mature leaf (forth from the bottom of the plant) were measured according to Rozier *et al.*[24] on four randomly-selected plants per plot with a portable photosynthesis yield analyzer (Mini-PAM-II, Walz, Germany) equipped with the clip holder 2035-B. Root and shoot system architectures were respectively recorded on four randomly selected plants per plot with a scanner equipped with WinRhizo and WinFolia softwares (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada) according to Rozier *et al.*[24].

Stem diameter was measured with a hand-held digital caliper at the base of the plants (c.a. 5 mm above the seed). Roots and shoots of four randomly selected plants per plot were oven-dried (24 h, 60 °C) and weighted to estimate their dry weight.

Roots and the most recent mature leaf (forth leaf from the seed) of four randomly-selected plants per plot were sampled and dipped in liquid nitrogen at harvest to inactivate enzymatic reactions. They were lyophilized and the soil attached to the roots carefully removed with a soft brush. Cleaned roots and leaves were cut into 1 mm pieces and ball-milled for 8 min at 30 Hz (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Germany). Metabolites were extracted from 7 mg dry powder with a biphasic water/chloroform/methanol solvent system using ribitol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) as a standard according to Rozier *et al.*[24]. Metabolites were silylated, analyzed by GC-MS (Agilent 7890 A and 7000 A, Santa Clara, USA), annotated using MetAlign and TagFinder softwares and their content estimated with MassHunter software (Agilent, Santa Clara, USA) according to Rozier *et al.*[24].

Yield measurements. For each plot, central portions (5 m long) of two central rows of the part not used for 6-leaf stage physiological measurements (section 'Six-leaf stage physiological measurements' above) were harvested at the end of the growth cycle on 10/08/2014 (FC and C), 10/16/2014 (L), 10/26/2015 (L) and 10/05/2015 (FC, C, Corg). The grains of all cobs were detached mechanically, weighted and oven-dried until constant weight to estimate the harvested grain yield (dry weight). Harvested plants were also counted to generate an estimate of plant density at harvest.

	FC		L		C		Corg	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
2014	96.5 ± 3.1[a]	104.1 ± 4,5[b]	89.5 ± 13.9[a]	91.0 ± 8.7[a]	87 ± 8[a]	77.6 ± 6.6[b]	—	—
2015	62.9 ± 8.5[a]	56.6 ± 7,1[b]	75.6 ± 5.3[a]	84.1 ± 6.7[b]	69.0 ± 5.6[a]	79.7 ± 4.2[a]	77.5 ± 4.3[a]	79.8 ± 3.4[a]

Table 2. Maize grain yields (q/ha) after inoculation (I) and no inoculation (NI) of seeds *with A. lipoferum* CRT1. Sub-plots received no nitrogen fertilization in the four fields (FC, L, C, Corg) during the two years of the study. Grain yields are expressed in q/ha. Letters a/b above numbers refer to significance classes at $p < 0.05$ after two-by-two comparisons between PGPR-inoculated and mock-inoculated conditions (n = 5). Non-parametric Wilcoxon tests were run using blocs as a random variable.

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

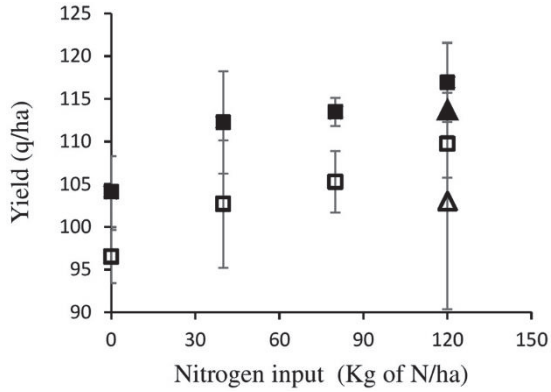


Figure 1. Impact of nitrogen fertilization on maize grain yield. *A. lipoferum* CRT1-coated (full symbols) and mock-coated (open symbols) maize seeds were sown in 2014 in field A. Nitrogen was added as ammonium nitrate (33.5% nitrogen N). Nitrogen fertilization was either added once at the 6-leaf stage for all doses (squares) or in two equal amounts at sowing and the 6-leaf stage (triangles) at a total of 120 Kg of N/ha (i.e. 358.2 Kg ammonium nitrate/ha). Means +/− SE are shown (n = 5 blocs in randomized split-plot design).

Statistical analyses. Unlike otherwise stated, non-parametric Wilcoxon (comparison of two means) or ANOVA (comparison of more than two means) mean comparison tests were conducted with significance and high significance thresholds respectively set at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**). Trends at $p < 0.1$ (‘) were also recorded during metabolite content comparisons. Monovariate mean comparison tests and multivariate Principal Components Analysis (PCA) or Partial Least Squares-Discriminant analysis (PLS-DA) were carried out with the open source software R[35] with the RVAidememoire, mixOmics and ade4 packages (downloaded on march 2016).

Results

Impact of *A. lipoferum* CRT1 on grain yield. Under no-nitrogen input, seed coating with the PGPB *A. lipoferum* CRT1 affected grain yields in discrete instances in four geographically close fields contrasted in soil quality and other parameters, over two consecutive years (Table 2). Grain yields increased in field FC in 2014 (+7.9%) and in field L in 2015 (+11.2%). They decreased in field C in 2014 (−10.8%) and field FC in 2015 (−10.0%). There was no significant impact on yield in all other instances.

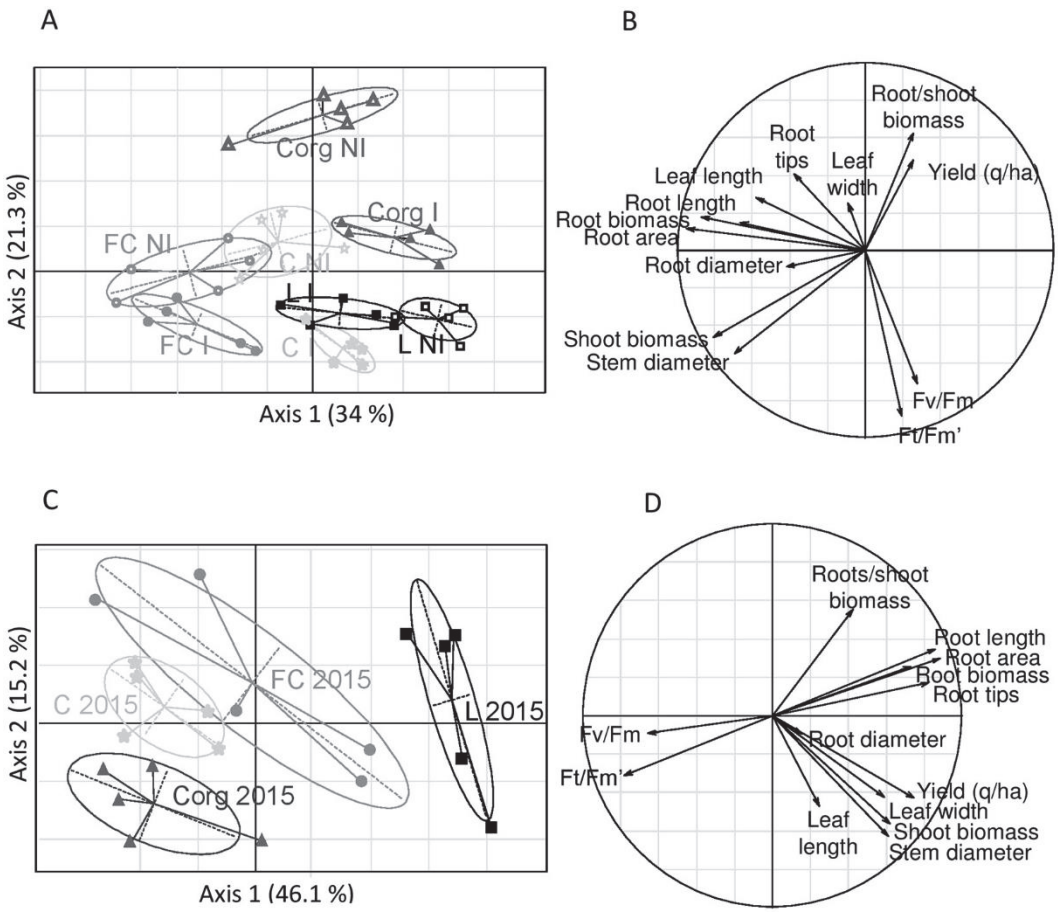
Excess nitrogen carried over from the previous growing season probably did not cause the lack of yield induction by *A. lipoferum* CRT1 in some fields, despite its potential to jeopardize the proper functioning of the interaction between maize and *Azospirillum*. The absence of nitrogen fertilization in some plots of all fields during two consecutive years systematically lowered yields (Table 2) unlike in parallel plots that received full yearly fertilization (data not shown). However, if yield enhancement by *A. lipoferum* CRT1 was observed in field L in 2015, unlike

in 2014, such an effect was lost in field FC over the same period and never occurred in field C (Table 2). As an additional piece of evidence, serial additions of nitrogen fertilization in field FC in 2014 (40–120 Kg of N/ha) at the 6-leaf stage proportionally increased yield but left the yield-enhancing effect by *A. lipoferum* CRT1 unaltered (Fig. 1). Spreading nitrogen input over time (half at sowing and half at the 6-leaf stage) lowered yields slightly compared to a single input at the 6-leaf stage but also did not affect the yield enhancing effect of *A. lipoferum*

CRT1.

Since yield-enhancement by *Azospirillum* also requires sufficient bacterial coating[36], a parallel assay was conducted in 2015 in all fields with seeds coated with a 10 times higher bacterial dose (10^7 CFU/seed instead of $1.4*10^6$ CFU/seed). Not only did such bacterial dose not enhance yields in fields FC, C and Corg, but it suppressed yield enhancement in field L (data not shown) in agreement with previous estimates of the optimum working bacterial dose[36].

Impact of *A. lipoferum* CRT1 on maize morphology and photosynthetic potential. Because *A. lipoferum* CRT1 is known to only remain detectable on maize roots up to 57 days post-sowing[29, 31], ten root and shoot morphological parameters and two photosynthetic potential estimates were recorded at an early seedling



Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

Figure 2. Principal component analysis (PCA) of morphological, photosynthetic and yield characteristics

(**A**,**B**) or percent modification of these characteristics by *A. lipoferum* CRT1 seed coating within blocs (**C**,**D**). Plants of the 2015 experimental setup (field LC, circles; L, squares; C, stars and Corg, triangles also distinguished by different shades of grey) originating from PGPR-coated (I) or mock-coated (NI) seeds were assessed at the 6-leaf stage except for yield was estimated at the end of the growing season. Four plants were randomly analyzed in each bloc for their morphological and photosynthetic characteristics and the values averaged to yield a single input bloc value for PCA computation. Yields were measured once per bloc. A different shade of grey is given for each experimental condition.

stage (6 leaf-stage plantlets) grown under zero-nitrogen fertilization during the 2014 and 2015 field trials for which grain yields are shown in Table 2. A multivariate Principal Component Analysis (PCA) of the 2015 data revealed that mock-inoculated plantlets exhibited a morphological/physiological signature that was unique to each field (Fig. 2A). Organically-grown plants (Corg) were most different in having a higher root-to-shoot biomass ratio and a lower photosynthetic efficiency (Fig. 2B). Plants from field FC differed from the others by having a larger stem diameter and a higher shoot biomass. In all fields, *A. lipoferum* CRT1-coated seeds yielded plants with different morphologies than those originating from mock-coated seeds. Their morphological and photosynthetic characteristics remained, nevertheless, field-specific (Fig. 2A,B). Higher yields paralleled higher root-to-shoot biomass ratios, a condition that was most marked in non-inoculated plants of field Corg. Similar conclusions were also drawn with the 2014 dataset (data not shown). A PCA of the plant morphological and physiological characteristics also grouped samples according to their field and inoculation status. Higher yields were also associated with a lower photosynthetic potential and a higher root-to-shoot biomass ratio despite the fact that field Corg was not part of the analysis and that field FC had the highest yield in 2014 unlike in 2015.

To focus on the impact of inoculation on plant morphology, physiology and yield, and to diminish the impact of inter-bloc differences within fields, a similar PCA analysis was conducted on a dataset containing the percentage values of the modification of the plant parameters by *A. lipoferum* CRT1 seed coating on each bloc (five blocks per field). It separated the plants of field L from the others on the first axis (Fig. 2C) in parallel with the yield enhancements due to *A. lipoferum* CRT1 in this field in 2015 (Table 2). With this representation, modifications of the morphological parameters correlated with each other according to the organ type and negatively correlated with the modifications of the photosynthetic potential (Fig. 2D). Surprisingly, yield increase with *A. lipoferum* CRT1 did not associate with a bacterium-induced modification of the root-to-shoot biomass ratio. On the contrary, yield enhancement

was associated with a coordinated increase in all of the root and shoot morphological parameters. Inversely, increases of leaf photosynthetic efficiency by *A. lipoferum* CRT1 negatively correlated with

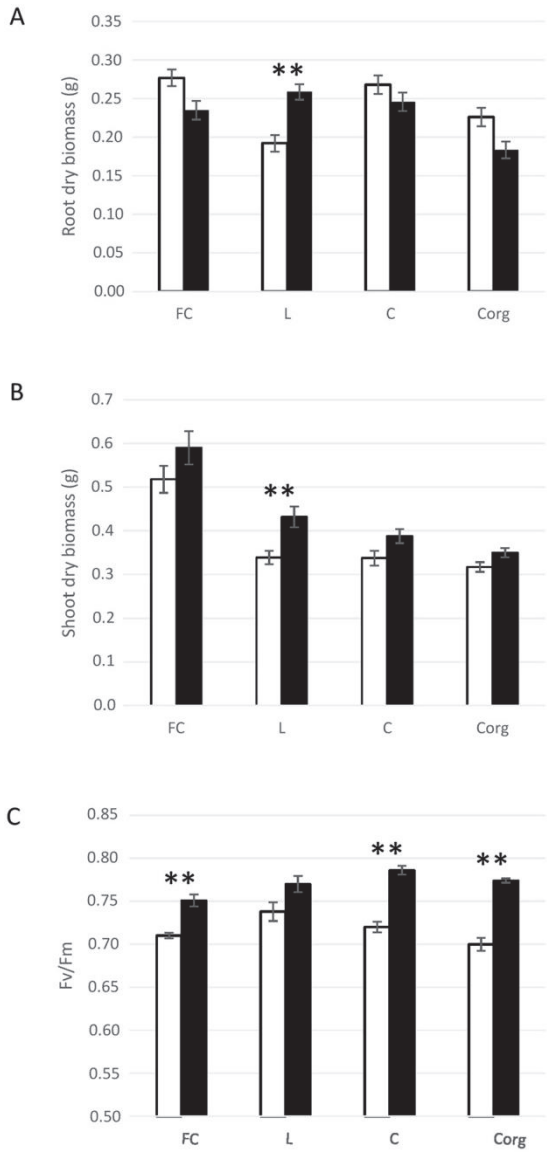


Figure 3. Roots (**A**), shoot (**B**) dry biomass and photosynthesis efficiency (**C**) under differing field and bacterial seed-coating conditions. Measurements were made on mock-inoculated (white bars - NI) or *A. lipoferum* CRT1-inoculated (black bars - I) 6-leaf stage plants of all fields (FC, L, C and Corg). Results are expressed as mean ± SE (n = 20). Statistical tests (two-by-two Wilcoxon tests) were conducted to determine significant differences among the 2 conditions (NI and I) and are indicated with stars: *p < 0.05, **p < 0.01.

yield enhancements. Similar conclusions were reached with the 2014 dataset despite plants of field FC (and not L) displaying a yield increase after *A. lipoferum* CRT1 seed coating. Plants of this field were indeed separated from the others on the first axis of the PCA plot in 2014 when percent values of the modifications of the plant parameters (and not

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

their absolute values) by *A. lipoferum* CRT1 were used for the computation (data not shown). Yield enhancement positively correlated with a coordinated increase of size and weight of all plant parts (roots and shoots) and negatively correlated with a photosynthetic potential increase.

Plotting the absolute values of single characters of the 2015 dataset confirmed that mock-inoculated plants of field L had the smallest root biomass and were among those that had the smallest shoot biomass. Both parameters gained most from the bacterial inoculation (Fig. 3). Inversely, their photosynthetic potential was already the highest of all mock-inoculated plants and it gained least from the inoculation, which placed plants of all fields at roughly equal values. These values were nearly optimal for maize[37].

Impact of *A. lipoferum* CRT1 on maize root and leaf metabolite contents. A total of 92 and 82 metabolites were, respectively, annotated in 6-leaf stage maize root and leaf (most recent mature leaf - forth from the bottom of the plant) samples collected in 2015. These included amino acids, carbohydrates, intermediates of the ascorbate or aldarate metabolisms, members of the TCA or urea cycles, polyols, phenolic compounds and purine or pyrimidine metabolites (Supplementary Table S1). Similar sets of metabolites were detected in

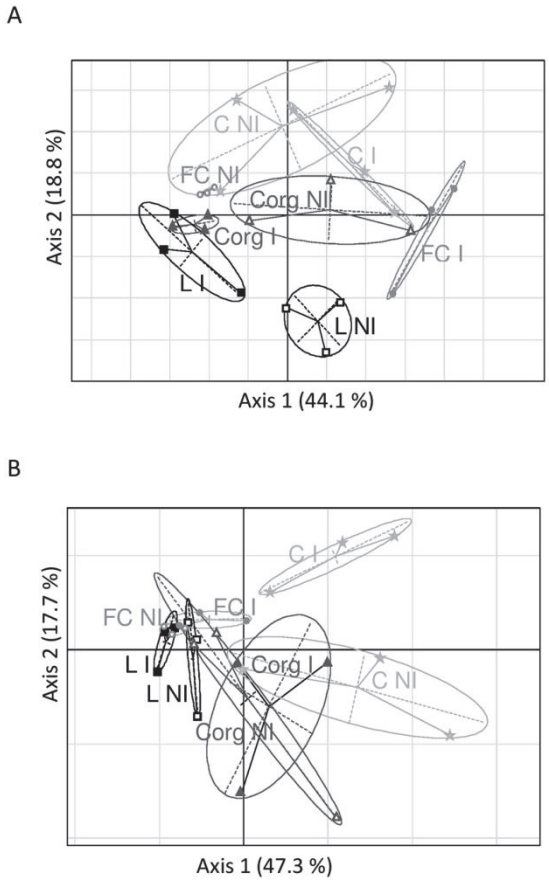


Figure 4. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of leaf (**A**) and root (**B**) metabolomes. Analyzed plants originated from the different fields (LC, circles; L, squares; C, stars and Corg, triangles; also distinguished by different shades of grey) and were either mock-

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

inoculated (empty symbols) or inoculated with *A. lipoferum* CRT1 (full-colored symbols).

mock-inoculated and *A. lipoferum* CRT1-inoculated plantlets of all fields so that potential differences among treatment groups were quantitative rather than qualitative.

A multivariate analysis of the root and leaf metabolite datasets revealed chemical signatures that were specific to sites and *A. lipoferum* CRT1 inoculation (Fig. 4). Differentiation of metabolomes according to treatment conditions was greater in leaves than in roots. Differentiation of leaf metabolomes was nevertheless not total for all conditions (non-inoculated plants of fields FC and C, or inoculated and non-inoculated plants of field C have, for example, overlapping distribution ellipses on Fig. 4A). But plants of these conditions had different root metabolomes (Fig. 4B).

A. lipoferum CRT1 affected the content of 13 and 28 metabolites in roots and leaves, respectively. Though these belonged to varied metabolite classes, most were carbohydrates or carbohydrate metabolism-related metabolites (Table 3). Not a single metabolite had its content significantly modified (at $p < 0.05$) by *A. lipoferum* CRT1 in the plants of at least two of the four fields (Table 3). Glutamine was the only metabolite which content was significantly affected in both the leaves and roots of the plants of the same field (FC).

Impact of *A. lipoferum* CRT1 on two-day maize morphology and seed-to-adult plant ratio. Because yield enhancement was not linked to a metabolic signature and did not parallel a modification of the root-to-shoot biomass ratio but rather correlated with plants which were larger in all of their proportions, modifications of seed-to-adult plant ratio by the bacterial symbionts were estimated and plant morphology was analyzed as early as two days after sowing (right after germination, i.e., radicle emergence). Under controlled laboratory conditions, germination success was greater than 95% and was not affected by *A. lipoferum* CRT1 seed coating (data not shown). However, two days old inoculated seedlings had longer radicles (0.13 ± 0.02 cm and 0.47 ± 0.06 cm, respectively, for mock-inoculated and *A. lipoferum* CRT1-inoculated seeds, $p < 0.001$, Student *t*. test, n = 100 and 2 biological replicates) (Fig. 5). Mock-inoculated seeds had radicles of similar length as untreated ones (0.16 + 0.04 cm, $p = 0.43$, Student *t*.test, n = 100). Because similar measurements cannot be done under field conditions, plant density was measured at harvest (Table 4). Based on initial sowing density, it could be estimated during the two years of this field study that 80.3–99.4% of the seeds generated adult plants at harvest except in field FC in 2014 and L in 2015 where successes under mock-inoculated conditions were 71.4% and 75.1% respectively. Interestingly, it was only under these conditions that *A. lipoferum* CRT1 inoculation significantly raised

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

Organ	Substance name	FC	L	C	Corg
Root	Cadaverine	270.6 ± 1.6*	−20.2 ± 11.6	7.3 ± 6.6	−1.7 ± 9.3
	Cellobiose#	127.7 ± 50.1	−63 ± 15.1′	35.8 ± 107.7	9.5 ± 47.9
	4-hydroxy- *cis*-cinnamic acid	145.6 ± 30.0	−52.5 ± 8.1′	NA	−49.31 ± 0.3
	Dihydrocoumarin	39.2 ± 2.7*	−54.9 ± 20.1	NA	NA
	Galactinol#	129.2 ± 26.7	−50.2 ± 26.9	−60.1 ± 3.5*	27 ± 1.8
	Glutamine	25.3 ± 1.9*	3.5 ± 6.9	21.1 ± 5.8	−19.5 ± 2.8
	Isomaltose#	265.8 ± 6.1*	−76.6 ± 6.0	−22.5 ± 0.7	90 ± 8.1
	Maltitol#	81 ± 78.1	−35.3 ± 7.8	−65.8 ± 1.1*	291.6 ± 48.4
	Maltose#	176 ± 24.7′	−21.5 ± 24.0	−21.5 ± 1.9	510 ± 69.3
	Phosphoric acid	56.6 ± 17.3	−9.9 ± 1.7	−0.7 ± 1.1	80.9 ± 7.2′
	Ribose-5-phosphate#	134.6 ± 25.1	−16 ± 7.5	−58.4 ± 9.7′	26.8 ± 23.4
	Sophorose#	198.4 ± 19.8′	14.7 ± 9.8	−32.7 ± 10.4	222 ± 31.2
	A264005	164 ± 78.9	−55.2 ± 13.1′	−10.4 ± 51.8	46.4 ± 20.8
Leaf	*Beta*- alanine	118.0 ± 2.6*	11.6 ± 2.5	91.9 ± 104.0	−73.1 ± 59.1
	Cinnamic acid, trans-	111.2 ± 4.5′	−76.4 ± 4.2′	77.1 ± 7.0	−61.6 ± 3.4′
	Ferulic acid, trans-	NA	−77.5 ± 0.3	100.8 ± 49.8	−66.21 ± 0.2*
	Fructose#	−6.7 ± 52.5	88.1 ± 15.9	−32.2 ± 74.5	−61.6 ± 13.8′
	Galactinol#	462.7 ± 77.1	NA	117.3 ± 49.0	−69.2 ± 12.9′
	Galactose#	36.9 ± 35.5	−51.0 ± 10.7	34.7 ± 24.7	−62.9 ± 7.2*
	Glucose#	6.9 ± 73.1	136.3 ± 46.8	−28.8 ± 33.6	−27.1 ± 1.4*
	Glucose-6-phosphate#	59.0 ± 34.6	−22.2 ± 0.8	23.5 ± 17.2	−52.7 ± 1.4′
	Glucuronic acid#	−266.8 ± 43.8	−47.5 ± 0.1	−3.0 ± 1.9	−71.3 ± 7.2*
	Glutamine	256.6 ± 1.1*	−61.4 ± 2.1′	85.0 ± 3.9	−64.5 ± 31.1
	Gulonic acid#	−3.9 ± 0.7	−78.6 ± 16.3	233.4 ± 0.9′	−8.9 ± 3.4
	Gulonic acid, 2-oxo-#	23.0 ± 63.5	89.4 ± 6.1*	−24.8 ± 94.7	−26.9 ± 29.1
	Isobutanoic acid, 3-amino-	82.1 ± 0.2′	−57.4 ± 5.5′	77.1 ± 28.9	−77.1 ± 3.6′
	Maltose#	29.12 ± 1.3	−11.6 ± 1.3	−29.0 ± 8.2	−24 ± 0.1*
	Mannosamine, N-acetyl-#	531.7 ± 6.9*	−62.6 ± 9.6	145.5 ± 16.5	−60.7 ± 0.6′
	Mannose#	62.4 ± 269.8	−56.5 ± 82.9	33.0 ± 212.5	−68.3 ± 7.2*
	Quinic acid	61.9 ± 19.7	−58.8 ± 8.5	37.9 ± 15.4	−65.5 ± 3.9*
	Rhamnose#	−329.7 ± 52.0	−62.1 ± 75.3	82.6 ± 220.2	−65.8 ± 19.5′
	Ribose#	64.7 ± 69.8	−62.9 ± 55.0	−2.4 ± 1.2	50.7 ± 1.4*
	Tagatose#	27.1 ± 6.6	11.4 ± 1.3	−8.8 ± 22.4	−66.8 ± 2.5*
	A231002	27.1 ± 128.5	82.9 ± 11.8′	−1.8 ± 221.9	14.0 ± 84.0
	A257011	62.6 ± 37.8	−54.1 ± 52.5	203.5 ± 55.0	−76.8 ± 3.6′
	A115002	268.3 ± 2.3*	−89.3 ± 22.7	126.6 ± 6.1	−40.5 ± 4.9
	A214003	47.6 ± 18.8	−49.7 ± 17.4	9.4 ± 1.3	−54.0 ± 1.1*
	A250008	731.5 ± 21.7	−63.4 ± 31.3	33 ± 18.4	−71.7 ± 9.5′
	A255001	226.7 ± 55.6	−78.3 ± 8.3*	19.8 ± 0.3	−46.1 ± 1.4′
	A268008	105.2 ± 1.5*	−73.4 ± 53.5	111.4 ± 31.5	−84.1 ± 2.1*
	A311002	76.1 ± 7.6′	−65.4 ± 33.4	18.9 ± 59.7	−77.0 ± 58.1

Table 3. Metabolite content changes in roots (A) or leaves (B) after seed inoculation by *A. lipoferum* CRT1. Ratios of mean content values of inoculated over mock-inoculated plantlets are listed and expressed as percentage values +/− percentage relative standard error. Wilcoxon non-parametric tests were conducted for each metabolite to compare inoculated and non-inoculated plants mean values for each field (FC, L, C and Corg). Only substances displaying significant content changes (*p

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

< 0.05; ’p < 0.1) are listed. NA indicates that the metabolite was detected in less than 2 of technical replicate samples. Metabolites were identified by comparison with a standard and are listed in alphabetical order. Unidentified metabolites are named according to their code in the Golm Metabolome Database (http://gmd.mpimpgolm.mpg.de/). Carbohydrates and carbohydrate-related metabolites are marked with the pound sign (#).

seed-to-adult plant ratio to values equivalent to those of the other conditions (85.9% and 89.5%, respectively) and increased grain yield (Table 2).

Discussion

This large field-based study confirmed that cereal seed coating with *A. lipoferum* CRT1 can enhance agronomic yield in fields as already established with this isolate and other *Azospirillum* isolates[15, 38, 39]. This stimulatory effect had been found in several studies to be variable[20, 40] as in this study. Negative impact on yield was also observed

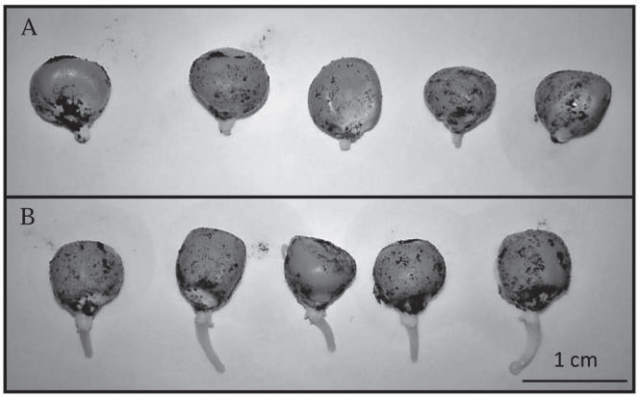


Figure 5. Mock-inoculated (**A**) and *A. lipoferum* CRT1-inoculated (**B**) maize seeds 48 h post-inoculation. Five representative seeds of each treatment group (n = 100) have been pictured. The black marks on the seeds are due to the presence of the peat slurry used to inoculate, or mock-inoculate the seeds. A second biological replicate gave similar results.

Year	FC		L		C		Corg	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
2014	71.4 ± 5.8[a]	85.9 ± 6.4[b]	80.3 ± 9.4[a]	81.7 ± 3.0[a]	86.3 ± 3.5[a]	81.7 ± 8.2[a]	—	—
2015	92.3 ± 8.0[a]	99.4 ± 5.4[a]	75.1 ± 8.0[a]	89.5 ± 6.2[b]	94.0 ± 3.7[a]	95.4 ± 3.5[a]	85.3 ± 2.6[a]	86.2 ± 3.3[a]

Table 4. Percentage of sown seeds making mature plants at harvest. Sub-plots received no nitrogen fertilization in the four fields (FC, L, C, Corg) during the two years of the study. Mature plants at harvest were counted and then expressed as mean percentages (%) of initially sown seeds. Letters a/b below numbers refer to significance classes at p < 0.05 after two-by-two comparisons between *A. lipoferum* CRT1-inoculated and mock-inoculated conditions (n = 5). Non-parametric Wilcoxon tests were run using blocs as a random variable.

occasionally. Because the experimental setup of this study was re-sown two years in a row in an identical manner, it is further suggested that yield enhancement is dependent on a combination of soil and weather characteristics to occur on different sites on different years. These two parameters being multifactorial, and acting jointly on plants, it is hard, at this stage, to speculate about which combination is most beneficial, or deleterious. But the short survival of *A. lipoferum* CRT1 on maize roots (less than 57 days post-sowing) has already led to the suggestion that early events in the plant life are crucial.

Looking at young seedling morphological and physiological characteristics, this study confirmed the growth-promoting activity of *A. lipoferum* on the shoots and roots of maize seedlings and its positive impact on leaf photosynthetic potential as already described by many studies mostly conducted under artificial conditions such as in pots and *in vitro*[30, 31, 36] including a recent study[24] making use of the same *A. lipoferum* isolate, the same maize cultivar, and the same soil (of field FC) as in this study. Plants of some blocs of several fields notably displayed a modified root system architecture with more numerous and longer lateral roots and a higher root-to-shoot biomass ratio, an early landmark of *Azospirillum* success on plants (reviewed by Bashan *et al.*[41]). Nevertheless, although this study revealed a positive correlation between the root-to-shoot biomass ratio of plantlets and mature plant grain yield, the modification of this parameter by *A. lipoferum* CRT1 did not correlate with its ability to enhance yield so that other mechanisms control this phenomenon. Modifications of the proportions of plant parts have been hypothesized to be initiated by auxins produced and secreted by *Azospirillum*[42, 43]. A full genome sequencing of the *Azospirillum* strain of this study did not reveal the presence of the *ipdC* gene commonly responsible for producing the major plant auxin, IAA, by *Azospirillum* (data not shown). However, the production of other auxin-like substances or the existence of alternative biosynthetic pathways cannot be ruled out.

Enhancing plant nutrition is a more conventional way for raising yield. Adding mineral nitrogen did indeed proportionally raise maize grain yield in this study. However, a metabolomic analysis of the leaves and roots of the plants of this study provided no evidence for any significant modification of N and P assimilation by *A. lipoferum* CRT1, in support of several analyses of the impact of N mineralization and P solubilization by *Azospirillum* spp that concluded that these phenomena have, at best, a meager impact on the plant host[28, 44–46]. Indeed, the nitrogen and phosphorus nutrition-related metabolites glutamine[47, 48] and phosphoric acid were among the metabolites whose contents was modified by *A. lipoferum* CRT1 seed coating (Table 3). However, phosphoric acid displayed a trend of content change that was only positive and significant at $p < 0.1$ (Wilcoxon test) in the plants of field Corg, and glutamine

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

content was not affected in the leaves and roots of plants of fields C and Corg while it displayed a negative change in the leaves of the plants of field L, the only field where yield-enhancement was observed in 2015 when the metabolome analyses were conducted. It rather appeared in this study that the presence of *A. lipoferum* CRT1 is perceived by the plant as an additional environmental cue to adjust leaf and root morphologies and metabolomes that were already well differentiated by other field-related environmental stimuli such as weather and soil composition, structure and microbiome (Fig. 4). But neither modifications of the relative proportions of plant parts and/or of their metabolite contents were contributors of yield enhancement by *A. lipoferum* CRT1.

Several data of this study suggest that securing adult plant density may be the primary mechanism of yield enhancement by *A. lipoferum* CRT1. Germination is a much slower and more uncertain event in fields than in artificial cultures. Seeds, and very young seedlings, are at high risk of dehydration, chilling or predation until their root system is long enough to reach secure soil layers where water content and temperature are more stable. Under the field conditions of this study, the seed-to-adult plant ratio was generally greater than 80%. Only occasionally did it drop to around c.a. 75%. However, it was under these conditions that *A. lipoferum* CRT1 raised seed-to-adult plant ratio and grain yield. Proper levels were actually restored. Hypothesizing a link between securing adult plant density and yield enhancement by *A. lipoferum* CRT1 is consistent with the observation of this study and of a meta-analysis on yield enhancement by *Azospirillum* species in cereals[15] where N-addition or deprivation had no impact on yield enhancement by *A. lipoferum* CRT1. It is also consistent with the dual impact of soil and weather on yield enhancement by *A. lipoferum* CRT1 because both parameters influence seed germination, seedling establishment and pest development. Because no impact of pathogens or predators was observed on 3-leaf or older plants, most mortality occured before, during one of the many sequential steps and biochemical, and gene regulatory, processes that make-up germination and post-germination[49]. It is also during this time that *A. lipoferum* CRT1 is present on seed and roots. The data of this study suggest that earlier development of roots two days after sowing leads to more advanced, larger plants (in terms of shoots and roots) at the 6-leaf stage. This faster plant development may bring plantlets increased tolerance to climate havoc. Further investigations will now aim to narrow down the specific step(s) that is (are) improved by the presence of *A. lipoferum* CRT1.

Occasionally, *A. lipoferum* CRT1 seed coating decreased yield. This phenomenon which received virtually no attention in the literature was not found in this study to correlate with a decreased seed-to-adult plant ratio. But it was found to negatively correlate with modifications of the photosynthetic potential. Plants that had the weakest photosynthetic potential at the 6-leaf stage were most affected. These belonged to fields

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

that had optimum germination success. An independent 3-year survey using a different PGPB species also established a similar correlation[50]. This is surprising because this physiological parameter is used routinely by many agronomists to correct feeding shortages in maize fields at the grain filling stage[51, 52] and enhancement of host plant photosynthetic potential[24] and photosynthetic pigments[25] by *Azospirillum* species is a common observation. Nevertheless, the molecular mechanisms of action of *Azospirillum* species on their host photosystem functioning and consecutive impact on plant growth are unknown and may be more complex than anticipated. Using controlled growth conditions, a recent metabolomic analysis indicated that *A. lipoferum* CRT1 lowers glucose content in the upwardly moving xylem sap to lift the down-regulatory effect that this substance exerts on the efficiency of leaf photochemical conversion[24]. More investigations are now required to understand the links between photosynthesis optimization in seedlings, its regulation by *A. lipoferum* CRT1, and yield at harvest.

References

1. Tilman, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 5995–6000 (1999).
2. Townsend, A. R. *et al.* Human health effects of a changing global nitrogen cycle. *Front. Ecol. Environ.* **1**, 240–246 (2003).
3. Dorais, M. Organic production of vegetables: State of the art and challenges. *Can. J. Plant Sci.* **87**, 1055–1066 (2007).
4. Gravel, V. *et al.* Differences in N uptake and fruit quality between organically and conventionally grown greenhouse tomatoes. *Agron. Sustain. Dev.* **30**, 797–806 (2010).
5. Murphy, D. V. *et al.* Soluble organic nitrogen in agricultural soils. *Biol. Fertil. Soils* **30**, 374–387 (2000).
6. Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. *Plant* growth-promoting rhizobacteria on radishes. Proc. IV 1111. *Conf Plant Pathogen. Bacler.* **2**, 879–882 (1978).
7. Adesemoye, A. O., Torbert, H. A. & Kloepper, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb. Ecol.* **58**, 921–929 (2009).
8. Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* **312**, 7–14 (2007).
9. Maksimov, I. V., Abizgil'dina, R. R. & Pusenkova, L. I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **47**, 333–345 (2011).
10. Yang, J., Kloepper, J. W. & Ryu, C.-M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* **14**, 1–4 (2009).
11. Drogue, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F. & Prigent-Combaret, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.* **163**, 500–510 (2012).
12. Gray, E. J. & Smith, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 395–412 (2005).
13. Barriuso, J. *et al.* Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In "Plantbacteria interactions, strategies and Techniques to promote plant growth", Ahmad, I., Pichtel, J. & Hayat, S. Eds pp 1–17. WileyVCH, Weinheim, Germany (2008).
14. Pereg, L., de-Bashan, L. E. & Bashan, Y. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants. *Plant Soil* **399**, 389–414 (2016).
15. Veresoglou, S. D. & Menexes, G. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a metaanalysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil* **337**, 469–480 (2010).
16. Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M. & Pedrosa, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* **331**, 413–425 (2010).
17. Díaz-Zorita, M. & Fernández-Canigia, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* **45**, 3–11 (2009).
18. Okon, Y. & Labandera-Gonzalez, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 1591–1601 (1994).
19. Bashan, Y. & De-Bashan, L. E. Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Adv. Agron.* **108**, 77–136 (2010).

20. Cassán, F. & Díaz-Zorita, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biol. Biochem.* **103**, 117–130 (2016).
21. Poly, F., Monrozier, L. J. & Bally, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* **152**, 95–103 (2001).
22. Cassán, F., Vanderleyden, J. & Spaepen, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus. *Azospirillum. J. Plant Growth Regul.* **33**, 440–459 (2013).
23. Robin, A. *et al.* Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Advances in agronomy* **99**, 183–225 (2008).
24. Rozier, C. *et al.* Xylem Sap Metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacterium. *Azospirillum lipoferum CRT1. Metabolomics (Los Angel)* **6**, 182–192 (2016).
25. Bashan, Y., Bustillos, J. J., Leyva, L. A., Hernandez, J. P. & Bacilio, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense. Biol. Fert. Soils* **42**, 279–285 (2006).
26. Shahzad, S. M., Arif, M. S., Riaz, M., Iqbal, Z. & Ashraf, M. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *Eur. J. Soil Biol.* **57**, 27–34 (2013).
27. El Zemrany, H. *et al.* Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Plant Soil* **291**, 109–118 (2007).
28. Bashan, Y., Holguin, G. & de-Bashan, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can. J. Microbiol.* **50**, 521–577 (2004).
29. El Zemrany, H. *et al.* 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 (2006).
30. Fages, J. & Mulard, D. Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez *Zea mays. Agronomie* **8**, 309–314 (1988).
31. Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P. & Bally, R. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* **45**, 339–342 (1999).
32. Degelau, A., Scheper, T., Bailey, J. E. & Guske, C. Fluorometric measurement of poly-β hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Appl. Microbiol. Biot.* **42**, 653–657 (1995).
33. Kadouri, D., Jurkevitch, E. & Okon, Y. Involvement of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl. Environ. Microb.* **69**, 3244–3250 (2003).
34. Cáceres, E. A. R. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microb.* **44**, 990 (1982).
35. R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing (2008).
36. Arsac, J. F., Lamothe, C., Mulard, D. & Fages, J. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* **10**, 649–654 (1990).
37. Liu, Y. F., Qi, M. F. & Li, T. L. Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery. *Plant Sci.* **196**, 8–17 (2012).
38. Kloepper, J. W. & Beauchamp, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1219–1232 (1992).
39. Tahir, M. & Sarwar, M. A. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Pak. J. Life Soc. Sci.* **11**, 1–7 (2013).
40. Egamberdiyeva, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl. Soil Ecol.* **36**, 184–189 (2007).
41. Bashan, Y. & Dubrovsky, J. G. *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biol. Fert. Soils* **23**, 435–440 (1996).
42. Asghar, H., Zahir, Z., Arshad, M. & Khaliq, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growthpromoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol. Fertil. Soils* **35**, 231–237 (2002).
43. Fibach-Paldi, S., Burdman, S. & Okon, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense. FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 99–108 (2012).
44. Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E. & Zanetti, G. 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 (1986).
45. Boddey, R. M., Baldani, V. L. D., Baldani, J. I. & Döbereiner, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil.* **95**, 109–121 (1986).
46. Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 487–506 (2000).
47. Temple, S. J., Vance, C. P. & Stephen Gantt, J. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* **3**, 51–56 (1998).
48. Turner, S. L. & Young, J. P. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Moi. Biol. Evol.* **17**, 309–319 (2000).

49. Anzala, F., Paven, M. L., Fournier, S., Rondeau, D. & Limami, A. M. Physiological and molecular aspects of aspartate-derived amino acid metabolism during germination and post-germination growth in two maize genotypes differing in germination efficiency. *J. of Exp. Bot.* **57**, 645–653 (2006).
50. Gurska, J. *et al.* Three Year Field Test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 4472–4479 (2009).
51. Silva, M., de, A., Jifon, J. L., da Silva, J. A. G. & Sharma, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Braz. J. Plant Physiol.* **19**, 193–201 (2007).
52. Wissuwa, M., Gamat, G. & Ismail, A. M. Is root growth under phosphorus deficiency affected by source or sink limitations? *J. Exp. Bot.* **56**, 1943–1950 (2005).

Acknowledgements

Anne-Marie Perrois, Théo Berthenet, Valentin Filippi, Marjolaine Durieux, Maxence Lacombe, Laurie Faisandier (Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay, France) and Leslie Blazère (Lycée La Martinière Duchère, Lyon, France) are thanked for their technical support. Hélène Houdebine (Agrauxine SA) is thanked for coating *A. lipoferum* CRT1 on the maize seeds. Shallow Sea Farm (Corydon, IN, USA) is thanked for English editing this manuscript. This work was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) [grant number ANR-12-Agro-0008]. CR was supported by a fellowship from the *Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche* (France).

Author Contributions

C.R., J.H., D.L., S.C. and L.L. designed and conducted the experiments. They analyzed the raw data. C.R., S.C. and L.L. provided methods and build the figures and tables for the manuscript. C.R. and L.L. wrote and organized the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-07929-8 **Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Scientific RePoRTS | 7: 7416 | DOI:10.1038/s41598-017-07929-8

Supplementary Table S1: Percent variation of metabolite contents in the root (A) and in the shoots (B) of Seiddi maize genotype upon *A. lipoferum* CRT1 inoculation in the four parcels: FC, L, C and Corg.

A

Metabolic pathways	Metabolic variation I vs NI (%)			
	FC	L	C	Corg
SUGAR METABOLISM				
Starch + sucrose :				
Maltose	119.3±33.8	-45.5±17.5	-16.5±27.2	28.7±8.4
Sucrose	117.8±75.8	-43.7±10.5	9.9±5.2	26.3±34.6
Trehalose. alpha.alpha'-. D-	25.7±14.8	-19±7.6	-45.1±13.4	216.4±63.2
Xylose	26.5±4.9	-34.2±9.5	15.5±7	-38.3±9.2
Fructose + mannose :				
Sorbose	40.5±9.8	-26.3±13.1	-63.4±47.8	11.7±16.1
Mannose	113.7±69.2	-40.1±12.3	-37.4±14.5	-53.5±17.9
Rhamnose	NA	94.8±31.8	30.7±16.3	73.9±21.1
Galactose :				
Galactose	98.8±41.1	-40.1±30.9	-65.8±39.3	-66.4±46.8
Tagatose	74.3±13.8	-52.8±13.8	NA	54.7±38.4
Pentose phosphate :				
Ribose	-21.2±4	-40.5±11.5	-15.2±17.3	-10.8±1.1
Gluconic acid. 2-oxo-	-17.3±8	-49.5±16.1	-51.1±17.6	-13±24.8
Glyceraldehyde	121.5±71.2	2.5±0.6	-23.5±6.9	-59.5±15.8
Ribulose	111.6±51.1	-23.7±14.5	3.1±1.8	-18.5±5.3
Glycolysis + neoglucogenesis :				
Glucose	126.8±45.3	-44±18.2	-24±17.9	-32.7±16.2
Glucose-6-phosphate	-36.3±10.1	-46.9±12.8	-72.7±25.6	-43±15.6
Phosphoenolpyruvic acid	26.8±9.4	-83.8±7.7	-35.7±16.1	1.8±1.3
Galactose-6-phosphate	221.9±81.7	-40.2±24.1	-17.6±8.2	-43.5±15.9
ASCORBATE AND ALDARATE METABOLISM				
Glucuronic acid	60±13.4	-60±12.9	-27.2±10.8	-58.9±12.7
Threonic acid	NA	-92.1±74.7	NA	-9.4±2.1
Galacturonic acid	NA	-46.3±12.1	-26.5±63.4	-75±24
TCA CYCLE				
Citric acid	119.9±57.6	-37.1±15	-33.5±20.1	-47.6±30.2
Malic acid	61.7±6.2	132.9±35.4	NA	38.4±9.5
Citric acid. 2-methyl-	19±5	-74.1±25.8	-27.6±10.3	109.8±46.3
Itaconic acid	377.9±182.9	NA	NA	NA
Aconitic acid. cis-	118.8±41.1	-12.8±7.2	-48.8±16.3	NA
Glutaric acid. 2-oxo-	45.6±13.1	383.7±76.8	NA	15.5±2.2
AMINO ACIDS METABOLISM				
Lysine :				
Lysine	41.7±10.9	-57.4±7.2	-50.8±9.9	-46.4±14.9

Alanine, aspartic acid, glutamate :				
Glutamic acid	111.3±36.8	25.9±7.1	-29.7±8.1	259.5±68.3
Asparagine	107.6±72.7	-8.9±15.9	-60.7±8	232.1±36.7
Aspartic acid	147±81.7	15±12.8	63.7±17.3	83.8±41.4
Cysteine, methionine :				
Methionine	54.3±24.6	-50.3±4.7	-70.5±9.5	12.9±13.5
Arginine, proline :				
Proline	113±40	NA	15.8±9.8	46.3±22.1
Glycine, serine, threonine :				
Glycine	-3.3±1	14.5±8.1	-71.3±20.2	-67.9±17.8
Serine. O-acetyl-	NA	NA	-33.3±11.7	195.1±91.3
Homoserine	-27.4±7	-17.8±3.5	-29.6±8.3	564.3±94.8
Threonine, L-	120.1±38.2	-39.9±12.8	-35.8±18.7	-4.1±1.4
Serine	58.7±23.1	1±6.2	-37.9±14.5	7.6±8.1
Valine, leucine, isoleucine :				
Isoleucine	-47.7±18.5	-30.4±15.4	-85.3±56.7	34.3±12.2
Leucine	78.1±14.6	27.9±12.4	36.8±8	25.4±3.4
Histidine :				
Histidine	116.1±47.9	-75.6±11.9	32.5±8.2	90.8±29.5
Aromatic amino acids :				
Shikimic acid	10.6±5.8	-49.9±14.9	13.6±4.1	-10.9±7.5
UREA CYCLE METABOLISM				
Citrulline	-59±11.4	NA	-41.6±10.5	8.9±1
Ornithine-1.5-lactam	27.5±14.2	-28.3±6.3	NA	-40.9±11.4
POLYOLS				
Mannitol	46.8±18.7	-55.4±12.3	-27.1±16.9	-14.7±7.3
Inositol. myo-	42.1±10.9	-28.6±13.5	-22.5±8	17±8.9
Xylitol	-12.6±4.6	-13.1±5.2	-33.5±29.3	-5.9±2.4
PHENOLIC COMPOUNDS				
Ferulic acid. cis-	714.6±85	237.9±284.2	-55±27.1	-61.8±26.3
Ferulic acid. trans-	213.9±90	NA	-29±7	NA
Caffeic acid. cis-	0.5±35.2	-25.4±22.5	-54.9±20.9	-64.2±50.2
Cinnamic acid. 4-hydroxy-. trans-	125.6±51.1	-23.1±8.8	-38.9±9.4	-58.2±12.2
PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM				
Uracil	127±19	-53.9±1.1	-52.9±23.3	68.3±15
Thymine	93.2±28.4	21.4±8.4	-76.3±16.6	-65.4±13
Thymidine	-31.5±19.9	-14.3±9.2	-12.7±5.1	169.4±35
Inosine	220.3±62.1	-18.7±3.8	-22.4±34.4	33.3±20.5
OTHER PATHWAY METABOLISM				
Ethanolamine	NA	NA	79.6±18.3	NA
Triethanolamine	1.9±1.6	-5.2±9	-41.8±21	101±46.6
Glucose. 2-amino-2-deoxy-	65.3±14	-64±12.1	-44.8±28.5	-35±NA
Glutaric acid	415±43.8	57±27.4	NA	NA
Erythrose	218.5±83.7	21.4±9.2	-50.3±27.1	-56.4±5.9

	Ribonic acid	39.4±10.2	-41.6±13.4	4.5±1.9	-0.1±0.3
	Galactosamine. N-acetyl-	NA	NA	-26.7±10.2	86.6±32.1
	Glucopyranose. D-	105.5±40.2	3.1±0.3	-53.6±41.3	-61±22.5
UNKNOWN COMPOUNDS					
	similar to Glycerolaldopyranosid	9.7±3.7	NA	21.9±7.3	64.5±16.1
	similar to Diethanolamine	NA	NA	347.8±63.8	NA
	similar to Fructose Derivate	86.3±40.1	NA	NA	-71.9±20.9
	A292006	75.3±19.8	NA	0.1±2.3	26.7±8.1
	A304001	-61±13.6	-34.1±10.5	-9.8±3.3	285±81.1
	A269003	121.8±26.8	-47.4±17.1	-32.4±37.4	18.6±45
	A254009	NA	NA	-15.1±12.1	4.1±1.9
	A259001	517.3±100.6	-51.6±10.1	49.8±20.1	-16.4±6.8
	A218003	NA	-55.8±25.9	-40.8±16.2	-59.6±19.1
	A176026	-12.3±5.6	-1.3±0.4	73.8±20.4	-25.8±9.8
	A176025	-40.5±15.1	-56.8±19.5	196.2±46.8	-36±24.8
	A170017	21.6±9.4	4.8±2.1	-13.9±4.6	-11.8±4.4
	A166002	58.5±15	-24.2±13.3	-54.7±8.4	219.6±84.3
	A166016	70.3±28.2	-72±11	-13.1±7.5	7.1±2.7
	A171016	NA	-81.9±20	-58.4±21.5	7.7±2.8
	A237007	83.1±13.4	-21.1±7.5	-44.4±48.7	-30±11.8

B

Metabolic pathways	Metabolic variation I vs NI (%)			
	FC	L	C	Corg
SUGAR METABOLISM				
Sugar dimers :				
Sophorose	-17.9±8.2	NA	-24.5±5.4	NA
Gentiobiose	441.3±30.8	-32.2±3	59.3±19.7	-73.6±25.7
Starch + sucrose :				
Isomaltose	-4.1±193.5	15.6±6.9	-23.5±34.6	-53.3±18.8
Sucrose	85.3±33.8	40.1±13.7	-32.5±26.1	5.5±3.2
Trehalose, alpha,alpha'- D	77.4±46.4	15.7±6	-24±8.1	-0.9±11
Fructose + mannose :				
Mannose	3.4±4.7	105.9±30.2	-30.8±12.1	-21.5±8.5
Galactose :				
Galactose	-1.6±2	-67±15.5	0.2±12.9	-45.5±14.7
Pentose phosphate :				
Gluconic acid	116.5±37.1	-37.4±12.1	13.6±7.7	35.9±7.5
Arabinose	-27.1±29.6	-3.7±0.2	49.4±26.6	-2.2±23.8
Glycolysis + neoglucogenesis :				
Glucose	3.9±14.2	108.6±30.9	-27±13.2	-11.4±41.8
Lactic acid	112.2±24.2	-29.2±7.4	-8.1±3.1	-80.7±25.1
Galactose-6-phosphate	996±133.4	-65.8±5.2	NA	NA
TCA CYCLE				
Isocitric acid	27.7±8.3	4.5±4.6	16.1±12.1	17.4±2.5
Malic acid	-30±12.1	-28.9±22.8	93.5±27	-58.7±15.2
Itaconic acid	377.9±182,9	NA	NA	NA
Aconitic acid, cis-	-627±155	NA	871±282	NA
Glutaric acid	313.7±84.9	-33.7±1	29±17	-5.6±2
AMINO ACIDS METABOLISM				
Lysine :				
Lysine	-93±20.2	125.4±64.4	10±1.2	-14.2±5.5
Alanine, aspartic acid, glutamate :				
Asparagine	254.5±33.7	9.1±1.2	48.5±26.3	-44.1±23.3
Glycine, serine, threonine :				
Glycine	1. 9±14.1	-21.8±10	-45.1±4,6	-74.1±20.3
Homoserine	NA	16,7±1,6	-23,6±3.6	NA
Threonine, L-	62.5±0.6	-65.4±29.1	18.8±2.4	213.3±64,8
Aromatic amino acids :				
Phenylalanine	114±39,4	NA	NA	NA
Shikimic acid	12.5±26.3	78.1±28.8	69.8±19.1	35.8±3.1
UREA CYCLE METABOLISM				
Ornithine	-35.5±7.8	NA	176.1±61.1	14.4±3.4
POLYOLS				

	Mannitol	25.8±12.8	NA	75.3±33	NA
	Inositol, myo-	40.1±31.9	35.6±7.9	-19.7±9.8	-2.9±1.8
	Galactitol	NA	134.9±64.1	52.7±35	-45.6±11.4
	Maltitol	NA	97.1±17	976,4±109	NA
	Xylitol	52,9±34,7	-22,4±20,5	17,3±27,2	-50,6±26,7
PHENOLIC COMPOUNDS					
	Caffeic acid, trans-	NA	-58.2±10.5	-67.7±6.3	-40.5±10.8
	Cinnamic acid, 4-hydroxy-, trans-	-4.1±2.4	NA	122.3±20.8	-17±8.7
PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM					
	Guanosine	NA	-50.4±6.1	134.4±23.1	-79.2±47
	Cytosine	96.1±40.7	-71.6±17.4	65.6±31.8	-19.5±4.2
OTHER PATHWAY METABOLISM					
	Ethanolamine	NA	-16,7±7,1	NA	NA
	Phosphoric acid	16.2±15.3	-38.9±41.8	67.7±44.6	-58.4±21.3
	Diethylenglycol	281.3±51.1	32.1±7.4	-19.4±9.2	24.4±14.7
	Glyceric acid	42.5±2	-31.1±2.8	63.9±3.2	-36.6±2
	Galacturonic acid-1-phosphate	9.8±1.6	NA	NA	NA
	Quinic acid, 5-caffeoyl-, trans-	-2.2±7.6	-64.4±35.5	-37.5±19.4	-26.9±2.3
	Glycinamide	22.5±128.8	NA	-2.4±1.6	-71.3±17.7
	Malonic acid, methyl-	-74±15.2	-15.6±0.6	-45.3±1.6	-56.5±2
	Butyric acid, 2-amino-	NA	-12.8±9.7	-34.2±13.9	28.5±3.6
	Glucopyranose, D-	59.3±9.1	-72.3±21.2	188.4±66.1	-52.5±14.5
UNKNOWN COMPOUNDS					
	A251001	-32.9±6.2	28±72.3	-13.3±9.9	-14.1±44.1
	A217007	-31.1±7.3	-17.5±8.5	-46.7±14.2	649.2±68.5
	A306003	191.5±24.5	-65.4±15.7	NA	-41.3±5.3
	A319008	178.8±98.1	221.5±11.9	-44.4±16.4	-42.9±17.8
	A285001	109±30.1	-68.2±39,8	164.3±46.4	-68.2±22.3
	A217004	NA	-73±42.1	37.8±17.5	361.6±64.1
	A229001	141±47.1	-38.1±12.1	13.3±4.1	-47.5±12
	A260006	296.5±85.8	-55.4±6	169.1±58.1	-79.3±21.7
	A264005	86.7±150.4	25.4±126.7	-7.5±117.8	-16.8±62.4
	A199004	10.5±3.9	NA	373.1±68.7	-52.3±11.6
	A170001	-29±6.5	10.9±22	2.7±3.8	0.8±31.1
	A155014	42±27.8	19.5±9.3	-13.3±22	5.4±1.8

3. Discussion

Cette étude nous a permis de confirmer l'impact très variable d'*Azospirillum* sur le rendement agricole des plantes cultivées (Díaz-Zorita et Fernández-Canigia 2009; Okon et Labandera-Gonzalez 1994). Des augmentations de rendement ont été observées sur certaines parcelles, certaines années mais l'effet n'était pas répétable sur d'autres sites ou années. Il semble donc dépendant de conditions pédoclimatiques dont nous n'avons pas pu déterminer la nature. Des diminutions de rendements toutes aussi non-reproductibles ont également été observées sur certains jeux d'échantillons. Les effets positifs et négatifs d'*A. lipoferum* CRT1 sur le rendement du maïs ne concernaient qu'un site par année et se compensaient, générant un effet nul sur l'ensemble des quatre sites de l'étude.

Un certain nombre d'études a suggéré que les effets stimulateurs de croissance d'*Azospirillum* pouvaient être inhibés lorsque le sol était trop riche en matière organique (Fallik *et al.* 1988). Dans un sens, les seuls deux sites (C et Corg) où aucune augmentation de rendement par *A. lipoferum* CRT1 n'a été observée étaient ceux dont une des caractéristiques pédologiques était une forte teneur en matière organique du fait de leur position en fond de vallée. Mais les sols des sites différaient par de nombreux facteurs. Notamment, les sites C et Corg différaient des autres sites par un taux de calcaire plus élevé. La comparaison des effets d'ajouts croissants d'engrais azoté sur le rendement a cependant révélé que la concentration de cet élément dans le sol avait un impact positif sur le rendement mais pas sur la modulation du rendement par l'agent bactérien. Le niveau d'azote résiduel dans les sols des différents sites n'est donc pas apparu comme un facteur important pour permettre à *A. lipoferum* CRT1 d'augmenter le rendement. Ceci signifie que non-seulement des teneurs élevées en azote n'inhibent pas la plus-value agronomique de cette souche de PGPR mais que sa capacité à rendre l'azote atmosphérique accessible à son hôte ne contribue pas à augmenter le rendement. Ce dernier point est confirmé par les analyses des teneurs en métabolites racinaires et foliaires durant cette étude qui ne montrent aucune amélioration de la nutrition azotée et il soutient les conclusions d'autres études utilisant d'autres souches de PGPR (El Zemrany *et al.* 2006; Baudoin *et al.* 2009; Okon 1993).

Une autre hypothèse classiquement avancée pour expliquer l'augmentation de rendement par des *Azospirillum* est que les hormones végétales qu'ils sécrètent, et au tout premier ordre les auxines comme l'IAA, modifient l'architecture du système racinaire pour lui permettre d'explorer un plus grand volume de sol (Aloni *et al.* 2006; Overvoorde *et al.* 2010). Lors des études en conditions contrôlées des Chapitres 2 et 3, des modifications de l'architecture racinaire de type auxinique ont en effet été observées après ajout d'*A. lipoferum* CRT1. Les mêmes types

de modifications de l'architecture racinaire ont également été observés sur certains sites ou blocs durant cette étude où ils généraient des plantes avec un ratio de masse diminué entre les parties aériennes et racinaires (PA/PR). Mais si les valeurs de PA/PR des placettes corrélaient au rendement final (aussi suggéré par la connaissance agronomique générale sur le maïs), leur augmentation par *A. lipoferum* CRT1 ne corrélait pas avec l'augmentation de rendement par cette souche. Cette conclusion n'est pas simple mais est cruciale pour bien comprendre la relation établie entre le maïs et *A. lipoferum* CRT1. Les résultats de cette étude montrent que les plantules de chacun des 4 sites avaient une signature morphologique, métabolique et de rendement photosynthétique propre sans ajout de l'agent microbien. Ceci montre la grande adaptabilité à des sols différant par leur composition chimique, microbiologique et structure physique mais aussi à des climats différents d'une année sur l'autre. L'ajout exogène d'*A. lipoferum* CRT1 n'a pas amené les plantules de toutes les parcelles à adopter une morphologie ou équilibre métabolique similaire. Il a influencé ces paramètres de manière site spécifique, suggérant que la présence de la bactérie sur le grain puis au niveau de la rhizosphère et des racines a été considérée par la plante comme un paramètre environnemental supplémentaire à prendre en compte pour adopter la croissance et le développement précoce les plus optimums. La stimulation par la PGPR n'a pas imposé une réponse spécifique à la PGPR mais a modulé la réponse des plantes aux autres stimulations de son environnement. Par effet domino, la bactérie elle-même sera impactée dans sa survie, sa croissance et sa colonisation de la plante hôte par les conditions environnementales (Ho *et al.* 2017). Il est cependant important de noter que le rendement agronomique d'une culture est la résultante d'une myriade d'évènements durant sa culture allant de sa germination, sa croissance et sa tolérance aux divers stress et pathogènes rencontrés. Ce que les données de cette étude suggèrent est que l'ajout d'*A. lipoferum* CRT1 sur les grains au semis n'a pas le pouvoir d'augmenter suffisamment la nutrition et la croissance des jeunes plantules face aux autres contraintes du milieu pour conduire à une augmentation du rendement final en grain. Son impact sur le rendement en grain se fait donc autrement.

Le traitement statistique conduit durant l'étude a suggéré que l'augmentation de rendement par *A. lipoferum* CRT1 corrélait avec des plantules plus grandes dans toutes leurs parties, comme si elles étaient plus avancées en développement, *i.e.* avaient germé plus tôt. Des analyses en conditions de culture contrôlées ont confirmé cet effet germinatif. Comme une germination plus précoce en champ mettra à l'abri de la sécheresse, du froid mais aussi de prédateurs les très jeunes plantules, les niveaux de germination ont été estimés dans les diverses conditions de l'essai. Ils ont montré des baisses importantes dans une condition chaque année de l'étude. Il est

très difficile d'être certain de ce qui a causé ces baisses du taux de germination car les conditions adverses qui peuvent en être à l'origine peuvent être multiples et combinées (Chaves et Oliveira 2004; Chaves *et al.* 2002; Mittler 2006). Mais de l'observation des personnes ayant participé aux essais et de celle des agriculteurs partenaires, il est suggéré qu'une année un des sites a subi lors de la lévée des pertes au semis suite à la prédation de corbeaux et que l'autre année, un autre site a subi un gel et une sécheresse juste après le semis (sol le plus drainant de l'étude). Prédation par les oiseaux et sécheresse sont mieux tolérées par des grains de maïs en germination s'ils germent plus précocement grâce à un ancrage plus profond dans le sol. Le maïs est de plus une plante non-compensatrice pour qui rendement et peuplement sont corrélés. Il a donc été fait l'hypothèse que la présence d'*A. lipoferum* CRT1 sur la semence a limité les effets de conditions adverses sur la germination au moment du semis. *A. lipoferum* CRT1 n'augmenterait donc pas le rendement par augmentation de croissance des plantes mais en rétablissant des rendements optimums en cas de germination insuffisante. Dans l'étude suivante (Chapitre 5), les mécanismes d'interaction entre *A. lipoferum* CRT1 et le grain de maïs ont été caractérisés.

CHAPITRE 5 : Impact d'*Azospirillum lipoferum* CRT1 sur la germination des grains de maïs

1. Introduction

1.1 Objectifs

L'étude conduite en champ dans le chapitre précédent (Chapitre 4) avait conclu qu'*A. lipoferum* CRT1 affectait la levée des semences ainsi que la morphologie et physiologie de plantules aux stades 3-6 feuilles. Cependant, seule la sécurisation de la levée corrélait avec une sécurisation du rendement à la fin du cycle de croissance. Peu d'études ont porté sur l'impact des PGPR sur la levée des semences. Ce phénomène est complexe et constitué d'une multitude d'étapes conduisant à la germination *stricto sensu* (sortie de la radicule) puis à la croissance des organes jusqu'à ce que la plantule soit visible hors de terre. Le travail de ce chapitre a donc pour objectif de caractériser l'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur la levée des semences de maïs pour définir 1/ si cet effet biologique suit une règle similaire de spécificité d'hôte que les effets sur la croissance et la physiologie observés sur des plantules de 11 j (3 feuilles) Chapitres 2 et 3, et 2/ quelle(s) étape(s) du processus germinatif est(sont) la(les) plus affectée(s) par *A. lipoferum* CRT1. Comme pour les 3 chapitres précédents, il est fait l'hypothèse qu'une analyse du métabolome du grain en germination permettra de jeter des bases rationnelles sur les mécanismes biochimiques à l'œuvre derrière ce processus.

1.2 Le processus de levée des semences

1.2.1 Etapes clés

Les graines de la plupart des espèces végétales entrent en dormance une fois produites. Elles y demeureront tant que les conditions ne sont pas favorables à leur développement. Ce phénomène permet aux graines de ne pas germer sur la plante mère, d'avoir le temps d'être dispersées à distance et de ne pas initier de germination hasardeuse quand la survie de la plantule est impossible comme, par exemple, durant une période hivernale froide ou en l'absence d'eau ou de lumière. La graine est généralement composée de l'embryon, de son enveloppe protectrice (ou *testa*) et de l'endosperme, qui constitue un tissu de réserve pour l'embryon en plus du(des) cotylédon(s) (Mayer et Poljakoff-Mayber 1982). Durant la dormance, les différents tissus de la graine sont sous une forme partiellement déshydratée et les molécules de réserve sont souvent de grande taille comme l'amidon, les protéines ou les triglycérides. Ce sont ces réserves qui serviront à nourrir l'embryon lors de son développement (Bewley 1997), même si de faibles quantités de sucres solubles, acides organiques et acides aminés sont présents dans les graines en dormance pour satisfaire les premiers besoins en énergie et constituants de base lors de l'initiation de la germination. Durant le stockage et la

conservation des grains de maïs à des fins commerciales, le contenu en carbohydrates solubles peut-être modifié avec pour conséquence directe une perte de la capacité germinative du grain et une baisse de la viabilité de l'embryon (Bernal-Lugo et Leopold 1992). C'est le cas notamment du saccharose et du raffinose mais aussi de certains monosaccharides (fructose, glucose, galactose). Ainsi, sans entrer en germination, le contenu chimique de la graine peut être modifié.

Le terme 'germination' réfère dans son sens strict à la sortie de la radicule de la graine. Mais il est souvent utilisé dans un sens plus large qui englobe le processus germinatif *stricto sensu* et le début des processus post-germinatifs allant jusqu'à la 'levée' ou sortie du sol de la plantule. Ce processus germinatif *stricto sensu* peut être divisé en deux processus (Figure 5.1). Le premier est l'imbibition de la graine durant laquelle l'eau diffuse dans les colloïdes de cette dernière. Ceci va permettre la diffusion de petites substances solubles comme des métabolites secondaires antioxydants inhibiteurs de germination qui pourront sortir de la graine ? et des métabolites primaires énergétiques qui pourront diffuser au sein de la graine pour satisfaire les premiers besoins en énergie. On observe ainsi une diminution du contenu en saccharose des grains de maïs en imbibition, contrairement aux teneurs en fructose et glucose qui restent constantes (Sánchez-Linares *et al.* 2012). L'augmentation de la teneur en eau va également augmenter la force hydrophobe pour restaurer les structures protéiques et la compartimentation cellulaire. Cela va permettre des actions fondamentales de réparation de l'ADN et des organites comme les mitochondries. De même, une synthèse protéique utilisant des ARNm stockés dans la graine en dormance a lieu. L'imbibition a une durée variable selon les genres et espèces végétales (Bentsink et Koornneef 2008; Lechon *et al.* 1982). Elle est suivie d'une phase de synthèse protéique qui culmine par la sortie de la radicule, un phénomène rapide d'élongation cellulaire qui permet à la graine de s'ancrer dans son substrat. C'est la phase visible de la germination. Elle est suivie par des actions post-germinatives de développement du jeune embryon (divisions cellulaires, synthèse protéique) qui utilisent les réserves énergétiques polymériques (amidon, protéines, triglycérides) de la graine.

Les différentes étapes de germination et notamment la rupture de l'endosperme et de la *testa* sont contrôlées par la lumière, l'humidité mais aussi certaines hormones tels que les gibbérellines, l'éthylène ou encore l'acide abscissique (Figure 5.2 - Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006).

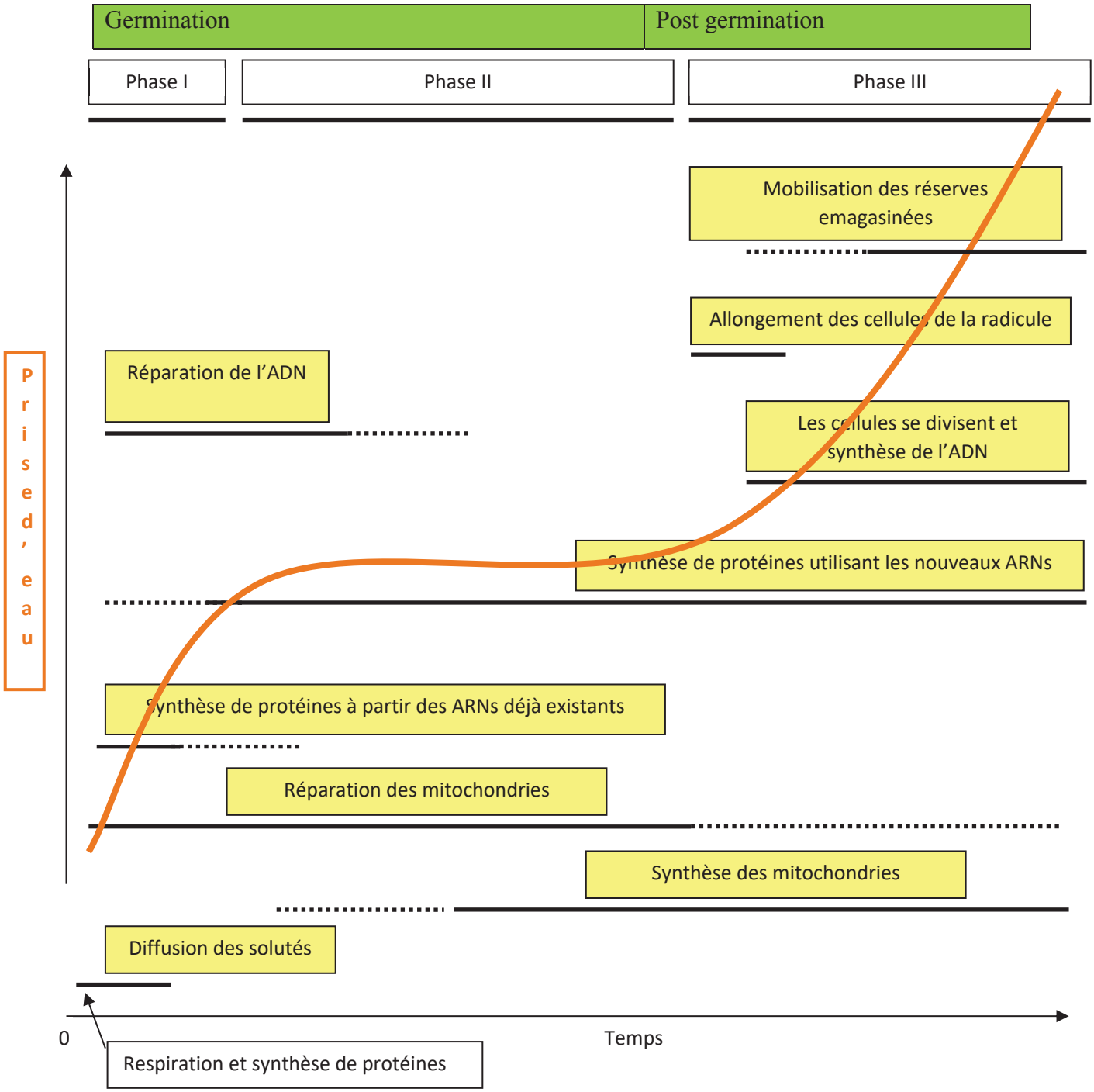


Figure 5.1 : Les différents événements germinatifs et post-germinatifs du grain de maïs (d'après Bewley 1997).

La prise d'eau par le grain (courbe) est mise en regard des différents processus biochimiques durant la phase I (ou phase d'imbibition), la phase II (ou phase de germination) et la phase III (ou phase post-germinative). L'échelle de temps est arbitraire et les durées peuvent varier selon les espèces végétales et la méthodes/durées de stockage des graines.

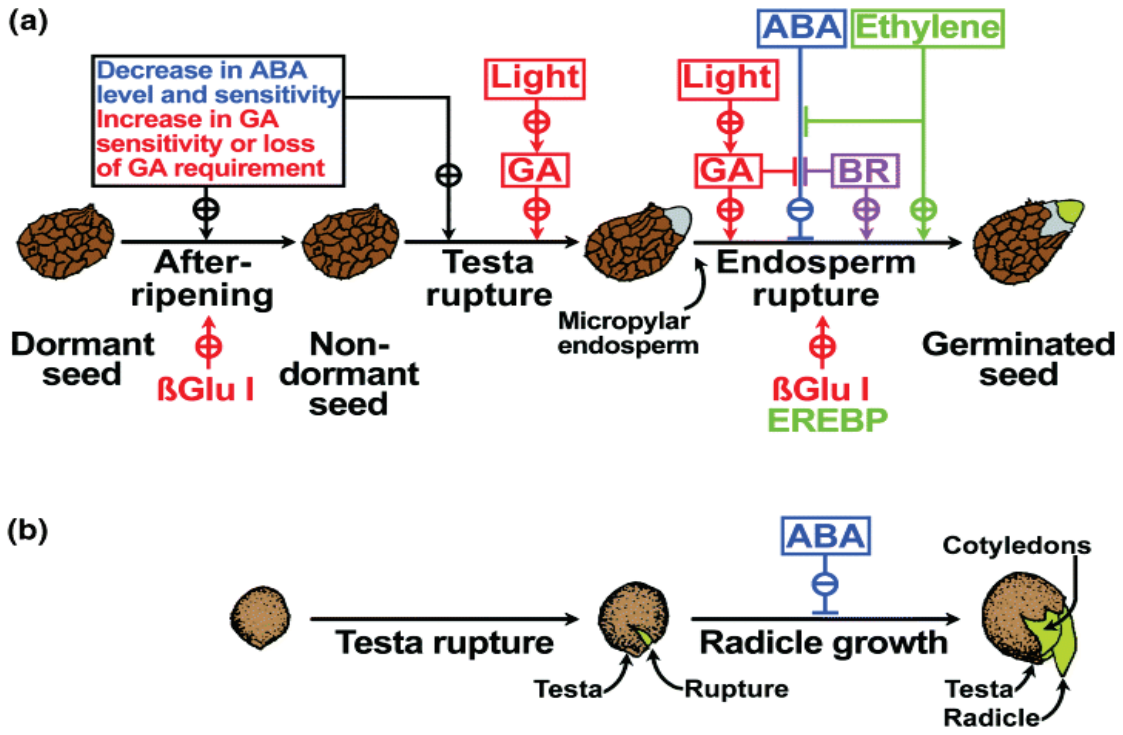


Figure 5.2 : Régulation de la sortie de dormance de *Nicotiana* (a) et *Brassica* (b) par les hormones et la lumière (extrait de Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006).

(a) la germination des graines de Nicotiana *sp. est réalisée en 2 étapes: la rupture de la testa suivie de la rupture de l'endosperme. La sortie de dormance et le début de germination ont lieu après la maturation de la graine (stockage à température ambiante durant plusieurs mois ou via la voie des gibbérellines (GA) induite durant la phase d'imbibition). L'acide abscissique acid (ABA) inhibe la rupture de l'endosperme mais pas celui de la testa. Les GA, l'éthylène et les brassinosteroides (BRs) activent la rupture de l'endosperme and contrecarrent les effets inhibiteurs de l'ABA. Les gènes des β-1,3-glucanase de classe I inhibées par l'ABA (*βGlu I*) sont induits au niveau de l'endosperme du micropyle juste avant la rupture de l'endosperme (Leubner-Metzger, 2003). La lumière, les GA et l'éthylène induisent l'expression de la βGlu I et la rupture de l'endosperme alors que l'ABA, l'osmolarité et l'obscurité jouent un rôle d'inhibiteur. (b) la germination des graines de* Brassica napus *a lieu en une seule étape. Les graines matures de ce genre n'ont pas d'endosperme. La rupture des testa et l'élongation initiale de la radicule résultent en l'achèvement de la germination. L'ABA n'inhibe pas la rupture de la testa mais inhibe la croissance de la radicule (Schopfer & Plachy, 1984; Kucera* et al. *2005).*

1.2.2 Induction de la germination par des facteurs abiotiques

En plus de l'eau, de nombreux facteurs physiques ou chimiques tels que la lumière (longueur d'onde), la température, l'oxygène, la présence de phytohormones (acide gibbérellique, acide abscissique ou kinétine) sont nécessaires pour l'initiation de la germination (Haber et Luippold 1960). Le pH a, quant à lui, un effet modulateur de la durée de germination (Rivard et Woodard 1989). La recherche sur les inducteurs de germination a été de plus en plus développée ces dernières années à des fins agronomiques ou horticulturales. En agronomie, d'autres facteurs seront essentiels afin d'optimiser le pourcentage de germination dans une culture tels que la profondeur du semis, la granulométrie du substrat, ou encore la densité de semis. Certains composés phénoliques réagissent avec l'oxygène, inhibant ainsi la germination. Une pratique courante en agriculture est le trempage des graines dans de l'eau ou autres solutions (eau oxygénée, hypochlorite de sodium) pour lixivier ces composés phénoliques et les empêcher de séquestrer l'oxygène nécessaire à la germination. Les graines à enveloppe dure peuvent de même être scarifiées (scarification mécanique ou chimique) afin de rendre la graine perméable et faciliter l'imbibition (Baskin et Baskin 1998). Certains monoterpènes très lipophiles tels que l'α-pinène sont de-même connus pour inhiber la germination des graines (Abrahim *et al.* 2000). Il a été démontré que le priming des graines (stockage 2-3 jours dans une atmosphère chaude et humide) permettait à ces dernières d'acquérir une résistance face à des stress environnementaux (hypoxie, températures extrêmes) en accélérant le processus germinatif afin de permettre un ancrage et une activation plus précoce du métabolisme (Mustafa 2017). Différents protocoles de priming sont couramment utilisés en agriculture selon l'espèce végétale, le contexte pédo-climatique et les pratiques agricoles (Paparella *et al.* 2015; Rehman *et al.* 2011).

1.2.3 Modification de la composition chimique des graines lors de la germination

La composition chimique des graines est variable selon les espèces et selon les conditions de fructification (Ali *et al.* 2010). Dans le cas du grain de maïs (caryopse), les molécules de réserve comme l'amidon et les protéines sont principalement accumulées dans le tégument alors que les lipides de réserve sont principalement situés dans le cotylédon de l'embryon. Le caryopse de maïs contient également des sucres solubles (saccharose, glucose, fructose…) et des vitamines (riboflavine, thiamine, acide ascorbique, vitamine A) (Mayer et Poljakoff-Mayber 1982; Ali *et al.* 2010).

Le grain de maïs est composé, selon une concentration croissante, des minéraux suivants : Ca, Mg, P, K, Na. Il contient aussi des protéines, des lysophospholipides, des acides gras et pour

98 à 99% des 2 types d'α-glucane : amylose et amylopectine (Tester *et al.* 2004; Morrison 1995; Appelqvist et Debet 1997). Lors du processus post-germinatif, l'amidon est hydrolysé en sucres simples afin de nourrir l'embryon et les organes végétaux en développement. La diminution de la teneur en amidon peut être rapide comme par exemple chez l'Eleusine où une baisse de teneur de 81,1 g/100 g à 71,3 g/100 g a été observée après 24 h de germination (Sripriya *et al.* 1997). Ceci va conduire à une augmentation parallèle en sucres simples comme par exemple le galactose et le glucose chez le riz (Dure 1960). Les teneurs de nombreux di- ou trisaccharides comme le saccharose et le raffinose diminuent fortement durant la germination et la post-germination (Nomura *et al.* 1969; Shu *et al.* 2008). Cependant, le maltose, produit initial de la dégradation de l'amidon par les amylases, voit sa concentration augmenter en début du processus post-germinatif.

Dans le grain de maïs, les principaux acides aminés sont l'acide glutamique et la leucine (respectivement 21,30 g et 14,29 g pour 100 g de protéines), suivis par la proline, l'alanine et l'acide aspartique (Mertz *et al.* 1964). La concentration de certains acides aminés va être fortement affectée par le processus de germination chez les céréales (Dalby et Tsai 1976). C'est le cas du tryptophane et de la lysine dont la concentration augmente. Lors de la germination du soja ou de l'éleusine, par exemple, une augmentation des teneurs en acides aminés essentiels et non-essentiels a été mise en évidence (revu dans Bau *et al.* 1997; Sripriya *et al.* 1997). Chez le riz, une augmentation des teneurs en leucine et sérine a de même été observée (Shu *et al.* 2008). Dans un autre contexte, le contenu en lysine a été montré comme étant plus faible dans les farines de soja germé que dans celles de graines non germées, avec une concentration diminuée de 54.9% dans ces graines germées (Bau *et al.* 1994). Les teneurs en prolamines, protéines de stockage propres à chaque céréale comme la zéine chez le maïs, vont quant à elles diminuer (Dalby et Tsai 1976; Moueium *et al.* 1996). Il a été montré que les concentrations en albumine et en globuline augmentaient lors de la germination de différents cultivars de maïs (Moueium *et al.* 1996). De même, les concentrations en GABA, en putrescine et en éthanolamine augmentent tout au long de la germination (Shu *et al.* 2008). Les teneurs en acides organiques et inorganiques (acides lactique, succinique, fumarique et phosphorique) augmentent aussi alors que celles des acides gras (acides palmitique, palmitoléique et oléique) diminuent.

1.2.4 Le microbiome de la graine: un héritage de la plante mère

Un parallèle important peut être érigé entre le microbiome humain le microbiome des plantes, que ce soit au niveau de la rhizosphère, de la phyllosphère, du pollen que de la graine. Le microbiome humain est étudié depuis de nombreuses années à des fins thérapeutiques. C'est

notamment par un équilibre entre microorganismes pathogènes et bénéfiques que l'organisme humain balance entre maladies et bonne santé (Cho et Blaser 2012). Dans le cas des plantes, le phytobiome inclut la plante elle-même, l'ensemble des macro- et microorganismes et l'environnement qui entrent en interaction avec la plante, que ce soient des animaux (nématodes, insectes), le sol, d'autres plantes, ou les communautés microbiennes (Figure 5.3, 5.4).

Le microbiome rhizosphérique de pieds de maïs en champ a été montré comme étant dépendant des caractéristiques du sol mais aussi de la génétique de la plante qui possède un profil type d'exsudation conduisant au recrutement de communautés et de fonctions bactériennes spécifiques (Chaparro *et al.* 2013; Turner *et al.* 2013). La diversité du microbiome rhizosphérique sera donc dépendante du cultivar utilisé mais correspond aussi pour une part à une transmission, un héritage de la plante mère à la graine et par conséquent, à sa rhizosphère (Peiffer *et al.* 2013). L'étude du microbiome des graines est un sujet d'actualité pour de nombreuses équipes car ce dernier est impliqué dans de nombreux mécanismes inhérents au développement et à la croissance de la plante (Berg *et al.* 2013). Il stimule également la tolérance de la plante hôte à des stress abiotiques en activant des mécanismes de défense impliquant la SAR (Systemic Acquired Resistance) (Turner *et al.* 2013). Le microbiome de la graine est donc d'une grande aide pour le futur développement de l'embryon. Chez certaines plantes accumulant de larges quantités de substances bioactives, un lien étroit existe entre le profil en métabolites secondaires et son microbiome (Köberl *et al.* 2013). Le microbiome d'une graine inclut notamment des PGPR dont certaines sont capables d'aider au recrutement d'autres microorganismes symbiotiques comme les mycorhizes (Azcón 2014).

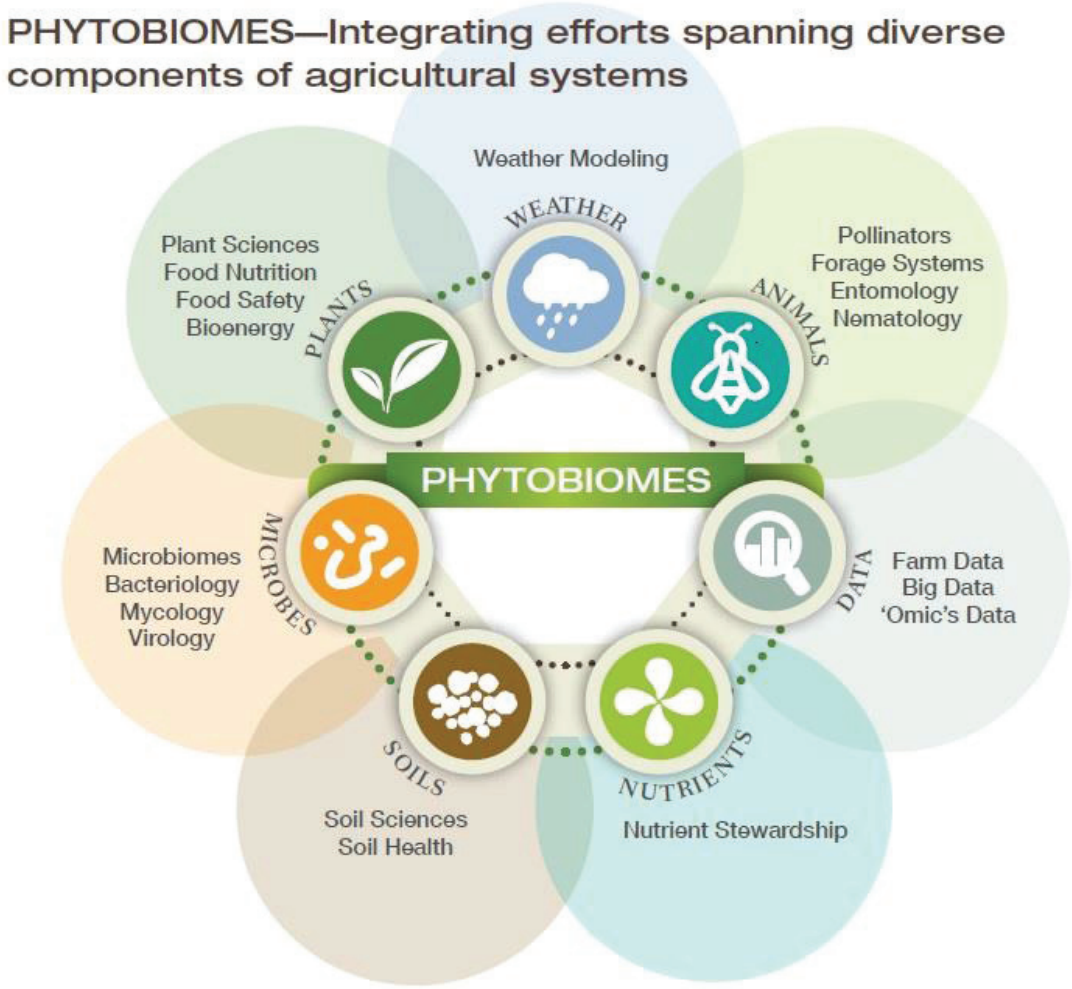


Figure 5.3 : Différents éléments et fonctions inclus dans le phytobiome (http://www.phytobiomes.org/about/Pages/What-is-the-Phytobiome.aspx).

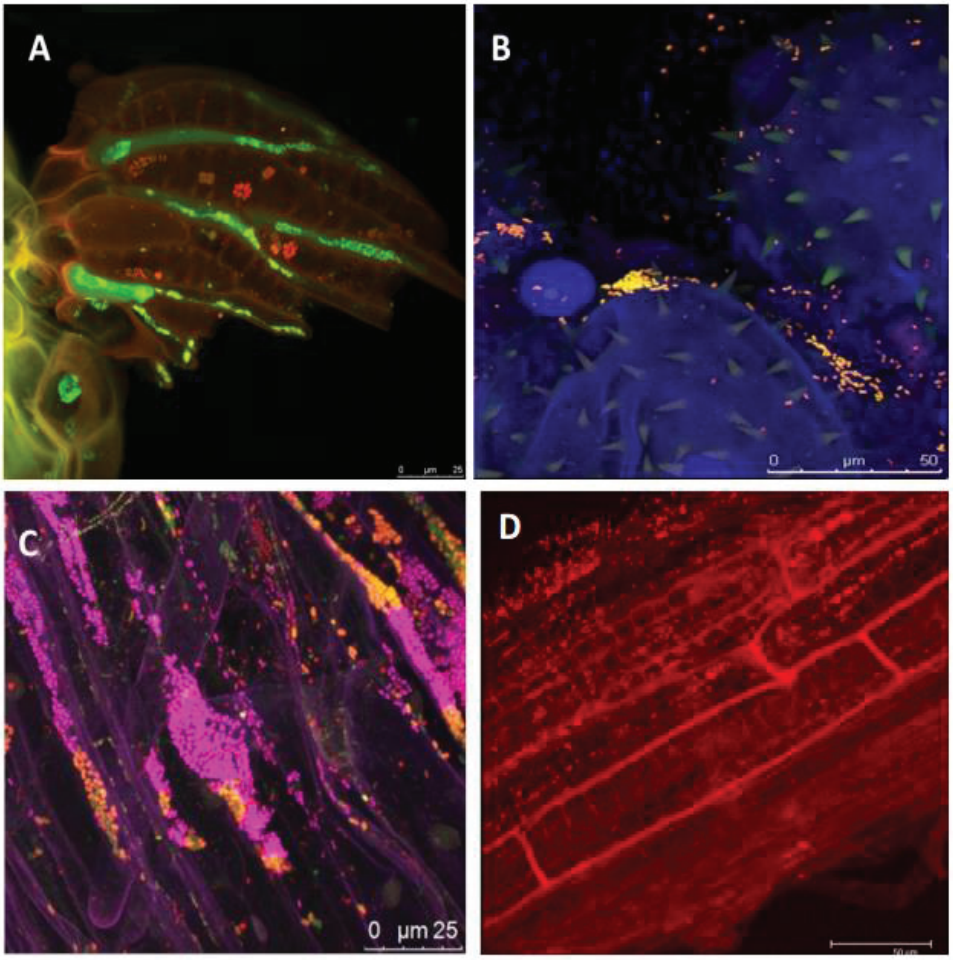


Figure 5.4 : Visualisation par hybridation *in situ* par fluorescence (A-C) et microscopie confocale à balayage laser (D) de la plante en tant que méta-organisme naturel (d'après Berg *et al.* 2013).

(A) phyllosphère de feuilles de Sphagnum montrant des colonies d'Alphaproteobactéries (en jaune) et d'autres bactéries (en rouge), (B) pollen de potiron montrant des gammaprotéobactéries (en jaune) et autres bactéries non-classifiées (en rouge), (C) rhizosphère de laitue montrant des Gammaprotéobactéries (en jaune) et des Bétaprotéobactéries (en rose) et (D) des racines de colza inoculées avec l'agent de biocontrôle Pseudomonas trivialis 3Re2-7 marqué au DsRed.

1.2.5 Modification de la germination par les PGPR

Certaines PGPR associées aux graines sont présentes dans le microbiome original de la graine et ont été héritées de la plante mère. D'autres trouvent leur origine dans le microbiome tellurique

au contact de la graine. Les mécanismes de recrutement et de sélection des microorganismes par les plantes conduisent à une co-évolution entre les communautés microbiennes du phytobiome et les plantes hôtes (Gopal et Gupta 2016). Pour palier à l'absence éventuelle de PGPR idéale dans le sol où est implantée la graine, ou pour palier à un manque de temps suffisant pour permettre aux mécanismes naturels de recrutement de faire leur œuvre, il est possible d'ajouter artificiellement une souche de PGPR élite soit par apport de sol/compost contenant cet organisme, soit par collage direct sur la graine. Ces technologies d'ingénierie agroécologique constituent un enjeu important des pratiques agronomiques modernes et peuvent s'apparenter à une sélection artificielle d'un microbiome phytobénéfique optimisé (Mueller et Sachs 2015; Ramakrishnan *et al.* 2017). Outre les nombreux effets phytobénéfiques attribués aux PGPR sur la morphologie racinaire, le contenu en chlorophylle, l'activité photosynthétique, le rendement en biomasse et en grain, ces dernières sont connues pour agir sur le stade précoce qu'est la germination, le paramètre le plus couramment mesuré étant le pourcentage de germination (Chowdhury *et al.* 2016). Une inoculation avec un mélange de *P. fluorescens* et *P. putida* a permis d'atteindre un pourcentage de germination maximum (de 100%) pour des grains de maïs et une inoculation avec *Azospirillum*, de 98,33% (Noumavo *et al.* 2013) avec une augmentation de 22.44% et 20.39% respectivement, par rapport à des lots de grains non-inoculés. De 5 jours à 8 jours après semis, le pourcentage de germination de grains de maïs et de soja inoculés avec *Bradyrhizobium japonicum* E109 et *A. brasilense* Az39 étaient nettement supérieurs à ceux des lots contrôles (Cassán *et al.* 2009). Cependant, dans cette étude, les pourcentages de germination des grains inoculés et non-inoculés étaient similaires 8 jours après semis. Ceci suggère que les souches bactériennes utilisées agissent à un stade très précoce de la germination. Dans une autre étude, des graines de radis inoculées avec différentes souches de PGPR ont montré un effet de bio-priming en présence de NaCl, un élément connu pour diminuer le taux de germination (Kaymak *et al.* 2009). Cet effet de bio-priming fait l'objet d'un grand nombre d'études mettant en jeu différentes souches de PGPR et différents modèles végétaux d'intérêt agromonique et il est possible qu'il soit lié à une induction de tolérance au stress salin par les PGPR.

1.3 Démarche expérimentale

Afin de caractériser l'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur la germination des semences de maïs, les évolutions morphologiques et le métabolome de grains de deux cultivars de maïs (FriedriXX et FuturiXX) ont été suivis à intervalles de temps réguliers dans des conditions contrôlées de température et humidité. L'analyse métabolomique a porté sur les petites substances solubles et

sur le polymère énergétique amidon. Les réponses morphologiques et de potentiel photosynthétique des deux cultivars à *A. lipoferum* CRT1 ont été testés 11 j après semis (stade 3 feuilles).

2. Matériel et méthodes

2.1 Culture bactérienne, inoculation, semis et suivi morphologique de la germination des grains de maïs

Les pré-cultures et cultures bactériennes d'*A. lipoferum* CRT1 ont été réalisées telles que décrites dans le Chapitre 2 et dans Rozier *et al.* (2016) ainsi que leur inoculation sur des grains de maïs calibrés en poids et forme.

Une fois inoculés, les grains ont été alignés dans des boîtes de Pétri en plastique carrées (120*120mm) stériles sur 3 couches de papier Whatman (Chromatography paper, 3mm Chr, Cat No 3030917) préalablement humidifié avec un volume similaire d'eau (10 mL). Une seule condition expérimentale était introduite par boîte. Chaque boite contenait 20 grains et chaque condition était répliquée 2 fois par expérience (réplicats techniques) et les expériences répétées 3 fois (réplicats biologiques). Les cultivars utilisés pour cette étude étaient FuturiXX (RAGT) et FriedriXX (RAGT). Leurs semences ont été soit inoculées avec de l'eau distillée soit avec une quantité similaire de culture bactérienne d'*A. lipoferum* CRT1. Les grains étaient déposés sur les papiers filtre de la même façon, *i.e.* face avec l'embryon visible vers le haut afin de ne pas perturber la germination. Suite à l'inoculation, les boîtes de Pétri ont été refermées et placées dans une enceinte close sur un lit humide de vermiculite et close par une vitre en verre afin qu'il n'y ait pas de baisse d'humidité dans l'enceinte durant l'expérience. Humidité et température ont été suivies tout au long de l'expérimentation au sein de l'enceinte pour s'assurer de son bon fonctionnement. Toutes les deux heures, un appareil Canon 550D relié à une télécommande de déclenchement avec intervallomètre et placé au-dessus de l'enceinte prenait une image des boîtes contenant les grains des différentes conditions ainsi que d'une règle graduée placée à proximité. La longueur des radicules de chaque grain a alors été estimée par analyse des images.

L'inoculation avec de l'eau ou la bactérie initie donc le processus d'imbibition qui est la première étape du processus germinatif. Ce moment sera appelé 'le semis' dans le reste du document.

2.2 Mesures des paramètres morphologiques et physiologiques des plantules de maïs

Les mesures de rendement quantique maximal de conversion photochimique (Fv/Fm), de rendement quantique de conversion photochimique en présence de lumière actinique (Ft/Fm'), de la longueur cumulée des racines latérales et de la surface foliaire cumulée ont été effectuées après une inoculation similaire à celle de l'expérimentation en boîtes de Pétri et tel que décrit dans Rozier *et al.* 2016 et 2017 sur des plantules de 11 j (stade 3 feuilles).

2.3 Dosage de l'amidon

La teneur en eau des grains a été mesurée pour chaque cultivar au moment de l'inoculation (semis) puis à 48 h et 72 h post-semis sur 10 grains de chaque cultivar en soustrayant leur masse fraiche de leur masse sèche déterminée sur grains broyés et mis à l'étuve 24 h à 110°C. Au moment du semis, puis 44 h et 72 h après semis, 20 grains de maïs pour chaque condition ont été récoltés et la radicule, si existante, enlevée. Les grains ont ensuite été congelés dans l'azote liquide afin de bloquer le métabolisme puis broyés individuellement dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier. La poudre obtenue pour chaque grain a été séparée en deux: 100 mg ont été conservés pour le dosage d'amidon et 80 mg pour l'analyse des métabolites primaires. Le dosage d'amidon a été réalisé sur 5 échantillons (grains) indépendants par conditions avec un kit de dosage enzymatique de l'amidon total (AA/AMG, Libios) (Figure 5.5). Pour chaque réplicat, 100 mg de poudre congelée et conservée à -80°C ont été placés dans un tube à hémolyse en verre puis mélangés à 0,2 mL d'éthanol 80% (v/v) afin de favoriser sa dispersion. Le mélange a ensuite été vortexé et 3 mL d'α-amylase en solution ont été immédiatement ajoutés. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 100°C pendant 6 min en agitant vigoureusement toutes les 2 min avant d'ajouter 0,1 mL d'une solution d'amyloglucosidase. Les tubes ont ensuite été vortexés et chauffés à 50°C pendant 30 min. Le contenu des tubes a été transféré dans une fiole de 100 mL et le volume ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. Un aliquot de 2 mL a été prélevé et centrifugé à 3 000 rpm pendant 10 min. Dans deux nouveaux tubes à hémolyse en verre (en duplicat), 0,1 mL de surnageant ont été transférés et 3 mL du réactif GOPOD ajoutés. Une solution de D-glucose « contrôle » contenant 0,1 mL de solution standard de D-glucose (1 mg/mL) et 3 mL de GOPOD a été réalisée similairement. Les tubes ont été incubés à 50°C pendant 20 min et l'absorbance lue avec un spectrophotomètre à 510 nm. Des échantillons contrôle ont été réalisés dans les mêmes conditions en remplaçant l'α-amylase et l'amyloglucosidase par de l'eau distillée. Cette étape a permis d'estimer la teneur en glucose libre des grains.

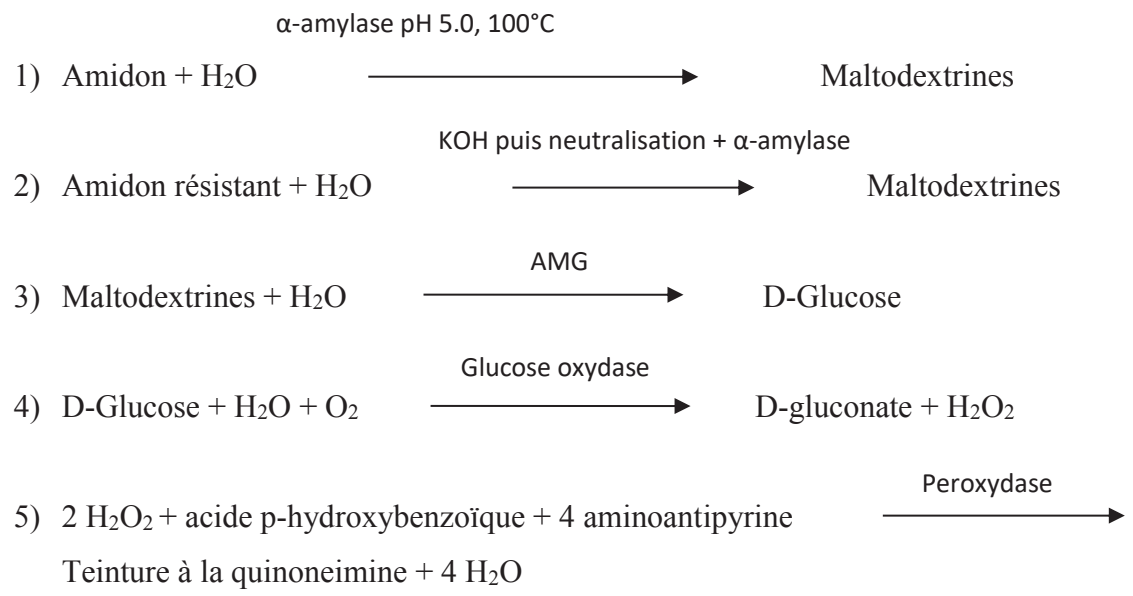


Figure 5.5 : Etapes du dosage d'amidon réalisées avec le kit de dosage enzymatique de l'amidon total AA/AMG (Libios).

2.4 Dosage des métabolites primaires

A partir des grains de maïs broyés dans l'azote liquide et utilisés pour le dosage d'amidon, 80 mg de fine poudre de chaque grain (n=5 pour chacune des 4 conditions) ont été séparés et conservés à -80°C afin de stabiliser les métabolites en inactivant de possibles réactions enzymatiques. Ils ont été transférés dans un tube Eppendorf de 2 mL, placés dans la glace et 300 µL de methanol froid (-20°C) ont été ajoutés au broyat suivi de 7 µL de ribitol à 1 mg/mL (standard interne, Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Les tubes ont été vortexés après chaque ajout. Les échantillons ont ensuite été incubés à 70°C pendant 15 min sous agitation et refroidis à température ambiante. Dans chaque tube, 200 µL de $CHCl_3$ ont été ajoutés et ces derniers ont été vortexés et incubés 5 min à 37°C sous agitation avant d'ajouter 400 µL d'eau Ultra Pure et de vortexer à nouveau. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 5 min à 14 000 rpm et 400 µL de surnageant a été transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. De nouveau, les 400 µL de surnageant ont été centrifugés 5 min à 14 000 rpm et 390 µL du surnageant a été transféré dans un second tube Eppendorf de 1,5 mL. Les extraits ont ensuite été séchés 4 h au Speed Vacuum puis stockés dans un dessiccateur jusqu'à l'étape de dérivation chimique. Un tube contrôle a été réalisé similairement mis à part que la poudre de grain broyé n'a pas été ajoutée. Juste avant ajout des réactifs de dérivation chimique, les extraits de métabolites primaires des grains de maïs et le tube contrôle ont été séchés environ 30 min au Speed Vacuum. Le culot

séché a été repris à la pipette (par allers et retours) dans 40 µL d'une solution de methoxylaminehydrochloride (20 mg/mL de pyridine) puis vortexé. Les tubes ont ensuite été incubés 1h30 à 30°C sous agitation et 70 µL de MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, Machery-Nagel) ont été ajoutés avant agitation au vortex et incubation 30 min à 37°C sous agitation. Les échantillons dérivés chimiquement ont ensuite été transférés dans des vials munis d'un réducteur et analysés immédiatement par GC-MS.

Les analyses GC-MS (Agilent 7890A and 7000A, Santa Clara, USA) ont été réalisées selon la méthode décrite dans le Chapitre 4, de même que les annotations et quantifications des composés qui ont fait appel aux logiciels MetAlign and TagFinder. La ligne de base des chromatogrammes a été corrigée avec le logiciel MetAlign. Les aires de pics de chaque chromatogramme ont ensuite été estimées avec le logiciel MassHunter (Agilent, Santa Clara, USA) puis normalisées à celle du standard interne.

2.5 Analyses statistiques

Pour chaque composé, les aires de pic normalisées ont été exprimées sous forme de pourcentage de la valeur maximum obtenue pour l'ensemble des conditions. Le dataset regroupe 4 conditions comprenant 2 cultivars et deux niveaux d'inoculation bactérienne (inoculé et non-inoculé). Chaque condition regroupe n=5 plantes pour les analyses métabolomiques et du contenu en amidon et n=20 pour les cinétiques de croissance. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team 2008) additionné des packages RVAidememoire, mixOmics et ade4 (téléchargés en mars 2016). Des tests non-paramétriques de Wilcoxon ont été conduits. Le seuil de significativité a été fixé à $p<0,05$ mais les métabolites ayant une différence significative (tendance) à $p<0,1$ ont aussi été reportés. Pour la cinétique de croissance les différences à 0,05 (*), 0,01 (**) et 0,001 (***) ont été reportées.

3 **Résultats**

3.1 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur la germination

Dans les conditions de germination utilisées dans cette étude, l'imbibition des variétés de maïs était d'environ 3 h, la prise de poids par diffusion d'eau dans les tissus végétaux étant importante surtout la première heure (données non-montrées). Un suivi de germination comme défini dans son sens strict, *i.e.* par l'émergence de la radicule, a été effectué par photographie à intervalles réguliers toutes les 2 h (Figure 5.6). La germination des grains non-inoculés de FriedriXX et FuturiXX était visible dès 42 h et 46 h après semis respectivement et était totale 62 h et 78 h

après semis. L'inoculation des grains par *A. lipoferum* CRT1 a eu un effet marqué sur le temps de germination de la variété FriedriXX en le diminuant de 6-8 h lorsque le taux de germination était inférieur à 50%. Cette différence de temps se réduisait ensuite graduellement jusqu'à devenir quasi nulle quand le taux de germination était de 100%. Des réductions similaires du temps de germination ont été observées lors des deux autres réplicats biologiques de cette expérience. Aucune réduction reproductible du temps de germination par *A. lipoferum* CRT1 n'a été observée avec la variété FuturiXX, les effets étant de plus fluctuants et non-reproductibles entre réplicats biologiques et selon les taux de germination.

L'analyse des moyennes des longueurs de radicules à ces différents temps de cinétique a révélé un effet positif sur la longueur de la radicule par *A. lipoferum* CRT1 chez le cultivar FriedriXX (Figure 5.7A). Cette différence était significative à $p<0,05$ 40-52 h post-semis. Elle était maximum à 44 h post-semis (0,003± 0,002 cm et 0,060± 0,015 $p<0,002$ - test de Wilcoxon). Aucune différence significative de longueur de radicule n'était induite par *A. lipoferum* CRT1 chez le cultivar FuturiXX durant la durée de l'analyse (Figure 5.7A). Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'analyse des pourcentages de germination (Figure 5.6) avec un effet activateur sur l'émergence de la radicule chez FriedriXX par *A. lipoferum* CRT1 à des temps très précoces (<52 h post-semis) quand le pourcentage de germination est inférieur à 80%. La précocité de l'effet est plus visible si le pourcentage d'induction de croissance de la radicule est exprimé en fonction du temps (Figure 5.7B). Cette représentation confirme l'absence d'effet de la bactérie sur la germination de FuturiXX et montre un maximum d'induction de croissance racinaire à 44 h post-semis où les radicules des grains inoculés grandissent environ 23 fois plus rapidement que celles des grains non-inoculés. Tous ces résultats suggèrent qu'*A. lipoferum* CRT1 accélère l'émergence de la radicule chez le maïs de manière cultivar-spécifique sans pour autant augmenter la vitesse de croissance de la radicule une fois qu'elle est sortie du grain.

Des essais préliminaires ont été conduits pour explorer l'étendue de la relation de spécificité d'hôte de l'effet germinatif d'*A. lipoferum* CRT1 sur le maïs. Les résultats montrent que que le cultivar Seiddi (Caussade Semences), qui montre des augmentations de croissance racinaire et de potentiel quantique de conversion photochimique 11 j après semis (Chapitre 2) montre également une germination accélérée un peu moins de 2 j après semis (données non-montrées). La situation est différente chez le cultivar Portile (Caussade Semences) qui montre de petites, mais significatives, réponses physiologiques similaires à celles de Seiddi et FriedriXX 11 jours après semis et aucune réponse lors de sa germination. Les cultivars MAS 47.P (Maïsadour Semences) et Splendis (Euralis Semences) n'ont pas montré de réponse à l'agent bactérien lors

de leur germination mais leurs réponses physiologiques 11 j après semis n'ont pas encore été caractérisées (données non-montrées).

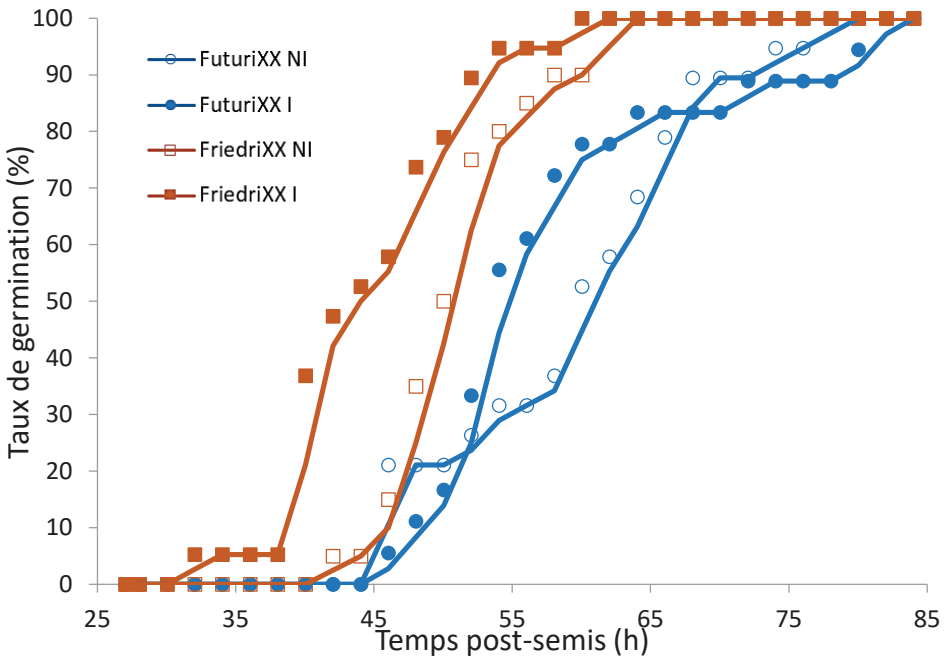


Figure 5.6 : Pourcentage de germination du maïs après inoculation par *A. lipoferum* CRT1. *Deux cultivars de maïs (FuturiXX, en bleu et FriedriXX, en orange) ont été soit non-inoculés (symboles vides) ou inoculés (symboles pleins) avec A.lipoferum CRT1 et visualisés en fonction du temps après semis (n=20). Un réplicat biologique sur les trois réalisés est montré et des résultats similaires ont été obtenus lors des deux autres réplicats.*

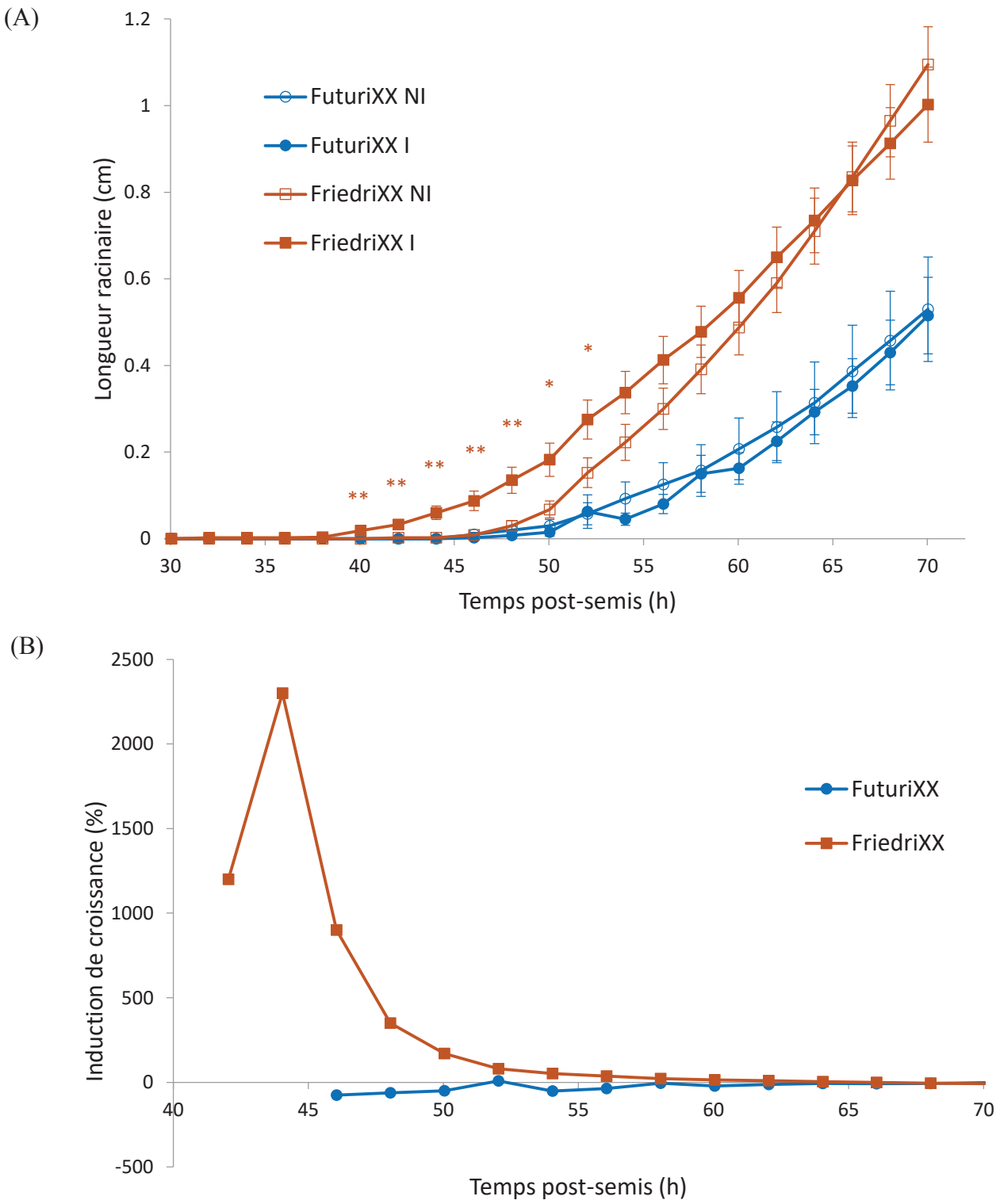


Figure 5.7 : Longueur des radicules de grains de maïs après inoculation par *A. lipoferum* CRT1.

*Deux cultivars de maïs (FuturiXX en cercles bleus et FriedriXX en carrés oranges) ont été soit non-inoculés (symboles vides) ou inoculés (symboles pleins) avec A. lipoferum CRT1. (A) les longueurs des radicules sont montrées sous la forme de m+/-SD (n=20, tests de Wilcoxon ** pour p<0,05). (B) pourcentage d'induction de croissance de la radicule pour chacun des cultivars.*

3.2 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur la teneur en amidon des grains en germination

La teneur en amidon des grains de maïs des deux cultivars étudiés, FuturiXX et FriedriXX lorsqu'ils ne sont pas inoculés n'est pas significativement différente à t0 (69,97±5,37% et 67,68±4,77%, respectivement) (Figure 5.8). Les teneurs en amidon restent inchangées après 2 et 3 j post-semis, quelle que soit la condition. Quels que soient le temps de cinétique et le cultivar, aucune différence significative de la teneur en amidon n'a été observée dans les grains après inoculation avec *A. lipoferum* CRT1 à la place de l'eau UP stérile ($p<0,05$ - Test de Wilcoxon).

Des dosages contrôle ont été réalisés en remplaçant les enzymes du kit (α-amylase et amyloglucosidase) par de l'eau distillée. La quantité ainsi mesurée de glucose libre dans les grains FriedriXX fut de seulement 0,14±0.04% de la masse sèche du grain à 44 h post-semis (données non-montrées). Son impact sur les teneurs en amidon mesurées est donc très faible.

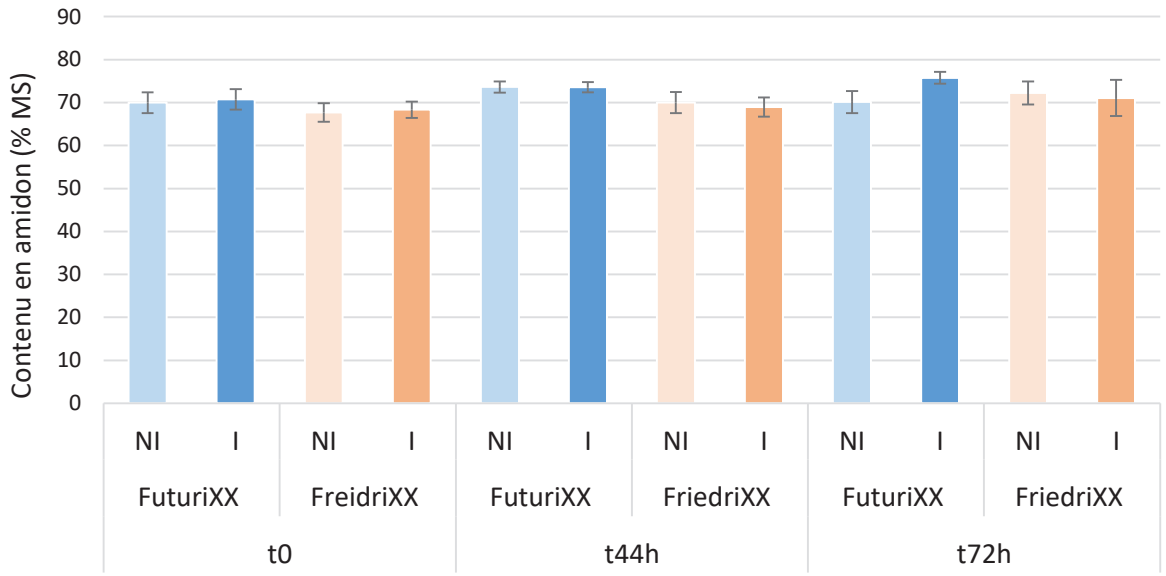


Figure 5.8 : Modification du contenu en amidon total des grains de maïs après inoculation par *A. lipoferum* CRT1.

Les cultivars de maïs FuturiXX (barres bleues) et FriedriXX (barres rouge) ont été non-inoculées (NI couleurs claires) ou inoculées (I couleurs foncées) avec A. lipoferum CRT1. Les teneurs en amidon des grains ont été estimées 0 h, 44h et 72 h après inoculation.

3.3 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur le métabolome du grain

Une analyse globale du métabolome des grains non-inoculés et inoculés par *A. lipoferum* CRT1 des cultivars FuturiXX et FriedriXX a été réalisée au semis puis 44 h et 72 h post-semis. Toutes conditions confondues, 126 métabolites ont été annotés dont 67 discriminants ($p<0,1$ et $p<0,05$ - Test de Wilcoxon) lors de l'inoculation dans au moins une condition (Tableau 5.1). Ces derniers interviennent dans différentes voies métaboliques : 6 appartiennent au cycle de Krebs et à la glycolyse, 18 au métabolisme des sucres et autres carbohydrates, 12 au métabolisme des acides aminés, 5 aux polyols, 2 aux nucléotides et associés, 2 au métabolisme des hormones et polyamines, 5 à des composés phénoliques et 1 est un composé d'origine non-végétale.

La figure 5.9A correspond à la représentation d'une analyse en composante principale (ACP) pour toutes les conditions de temps, d'inoculation et de cultivar. La non-superposition des ellipses représentant les conditions NI pour chaque cultivars au semis (t0) atteste que les grains au repos des deux cultivars ont des équilibres métaboliques différents. A l'inverse, la superposition des ellipses, pour chaque cultivar, à t0 correspondant aux conditions I et NI n'est pas surprenante et valide, en quelque sorte, la méthodologie employée.

Les ellipses représentant les différents temps de cinétique sont majoritairement séparées (faibles recouvrements) pour chaque cultivar suivant les 2 axes de l'ACP. Le métabolome du grain est donc modifié au moment de la germination (44 h post-semis) et en post-germination (72 h post-semis). Les recouvrements sont plus importants entre les conditions NI et I à 44 h et 72 h post-semis chez FuturiXX et 72 h chez FriedriXX. Les conditions non-inoculées et inoculées à 44 h post-semis pour le cultivar FriedriXX sont les mieux séparées graphiquement, signifiant qu'il existe des différences plus importantes entre les contenus en métabolisme primaire de ces deux conditions (Figure 5.9A).

Une analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA) a été réalisée aux temps 44 h (Figure 5.9B) et 72 h (Figure 5.9C) post-semis afin de déterminer les substances responsables des différences des contenus métaboliques à ces temps de cinétique. Graphiquement, une telle analyse permet une meilleure séparation des ellipses représentant les différentes conditions avec un meilleur soutien des axes, surtout l'axe 1 (composante 1, 73.1%). Les points correspondant aux conditions non-inoculées sont toujours plus dispersés que ceux des conditions inoculées. L'axe 1 sépare globalement les métabolomes des deux cultivars et l'axe 2 les niveaux d'inoculation. Ceci confirme les différences majeures entre les contenus en métabolites primaires des deux cultivars. Par contre, autant l'inoculation bactérienne faisait évoluer les contenus métaboliques dans le même sens de l'axe 2 44 h après semis, autant elle les fait évoluer

en sens inverse à 72 h, suggérant des changements différents de métabolomes à ces deux temps de cinétique.

Tableau 5.1 : Modifications des teneurs en métabolites des grains des cultivars FriedriXX et FuturiXX.

Metabolites [a]	I vs NI (%) [b]			
	FuturiXX		FriedriXX	
	t44h	t72h	t44h	t72h
Glycolysis-TCA and related [c]				
A105001-Lactic acid	63,7±14,9	-73,8±42,9	93,5±15,5	-70±3,6
A123004-Glyceraldehyde	36,5±14,7	28,9±2,3	5,5±1,4	-31,9±2
A176014-Aconitic acid, trans-	17,3±9,6	36,2±2,2	19,1±8,6	-58,8±14,4
A182003-Isocitric acid	17,7±4,6	40,8±3,9	16,8±6,6	-62,5±18,9
A134001-Succinic acid	0,1±2,5	25,8±10,3	-45,2±1,6	-44,5±13,1
A137001-Fumaric acid	13,9±4,3	35,9±9,1	-69,6±2,3	-24,8±8,4
Sugars and related [c]				
A167011-Ribose	-8,5±7,1	48,5±15,2	-23,5±0,1	-0,6±0,1
A199002-Galactonic acid	6±3,3	17,4±13,2	-47,6±0,3	-1±0,2
A186001-Gulonic acid, 2-oxo-	-3,8±2,1	10,7±0,1	-44,2±1,7	-4,8±2,2
A189002-Glucose	7,8±11	9,3±1,3	-40,7±1,8	-4,5±6,7
A189001-Mannose	24,4±9,2	26,5±2,1	-50,7±2,6	-2,5±1,9
A233002-Glucose-6-phosphate	13,1±4,1	44,9±2,0	-31,3±0,7	-18,1±4,1
A188001-Galactose	-93,2±68,1	-45,7±15,3	-54,5±0,6	-10,4±3,7
A188004-Fructose	-95,6±428,8	-42,8±17,4	-66,2±3,5	16,8±5,2
A198006-Glucopyranose, D-	2,3±4,1	42,8±10,2	-28,5±0,2	-13,1±3,1
A267008-beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose	-10,6±7,3	9,9±6,2	-17,8±0,4	-6,2±0,6
A211003-Ribose-5-phosphate	13,6±4,2	24,1±6,1	-22,8±1,7	40,5±7,1
A269006-Cellobiose, D-	-1,4±0,3	9,6±1,1	-16,8±0,9	-5,9±1,4
A179001-Arabinonic acid	8,8±9,5	35,2±2,7	22,4±6,5	-52,7±11,4
A231001-Mannose-6-phosphate	85,4±14,7	58±2,3	24,6±,1	-45,9±9,4
A193004-Glucuronic acid	NA	38,2±1,7	NA	NA
A287001-Isomaltose	32,1±9,2	54±5,8	NA	-47,6±9,8
A172002-Rhamnose	-39,1±0,5	-26,1±0,4	-5,9±1,9	-7,8±3
A204001-Galactaric acid	79±3,1	21,3±9,1	74,7±20,1	-41±10,1
Amino acids and related [c]				
A164007-Asparagine	-97,8±16,7	42,4±16,2	-47,3±2,0	-72,7±10
A118002-Isobutanoic acid, 2-amino-	2,1±0,9	20,8±8,1	-32,8±2,1	-22,5±6,1
A192003-Lysine	-88,9±22,9	-14,2±6,1	-62,7±3,2	24,1±7,1
A194002-Tyrosine	-5,1±4,9	46,3±14,7	-61,3±4,9	22,1±6,9
A140001-Threonine	91,3±26,2	73,4±18,7	-21,9±6,5	-60,6±3,5
A133001-Glycine	30±11,4	44,8±10	0,8±0,2	-46,4±0,4
A153002-Pyroglutamic acid	28,6±6,6	35,9±2,9	5,7±5,7	-34,9±2,2
A129002-Leucine	9,6±3,6	41,9±0,6	33,8±8,7	-57,4±3,8
A122001-Valine	17,2±9,1	50,4±4,2	-11,4±3,1	-33,7±5,5
A142007-Methionine	-20,7±5,9	57,6±5,1	-23,8±7,8	-80,2±13,9
A145025-Glycinamide	19,6±8,3	31,8±1,2	-6,8±2,2	32,1±8,2
A164001-Phenylalanine	46±9,6	37,7±2,5	33±7,3	-41,5±9,5

Polyols [c]				
A149002-_Threitol	-5,6±12,4	42,4±13,9	-33,7±1,2	-15,6±15,7
A150002-Erythritol	-1,3±1,8	0,5±1,5	-35,1±1	-18,8±4,2
A194001-Galactitol	25,4±4,9	20,7±6,1	-57±2,9	28,9±8,3
A193002-Mannitol	12,3±3,9	-30,2±12,6	-64,9±3,8	27,5±7,5
A171001-Xylitol	-3,3±1,1	14,6±0,4	-1,5±0,9	-0,5±0,1
Nucleotides and related [c]				
A136001-Uracil	46,8±10,5	94,5±10,6	-39,8±2,1	-89,3±3,6
A249007-Thymidine	-17,9±9,1	16,9±14,1	NA	-28,9±1,4
Hormones and polyamines [c]				
A175002-Putrescine	83,8±10,6	18,1±4,2	11,6±6,2	-19,4±2,1
A228007-Abscisic acid	16,6±8,2	48,8±2,7	21,9±7,2	-29,5±10,2
Phenolic compounds [c]				
A210001-Ferulic acid, trans-	NA	14,6±0	-41,9±2,9	-9,2±6,1
A199001-Caffeic acid, cis-	35,8±10,2	44,1±0,1	-45,6±1,1	-7,3±3,1
A180006-Cinnamic acid, 4-hydroxy-,	-34,5±9,7	-42,5±0,2	-3,9±1,5	-65,5±2,2
A178004-Vanillic acid	-7,7±3,1	66,9±3,2	-15,7±7,3	-15,1±3,2
A185001-Quinic acid	-94±13,1	8,6±10	-20,9±0,8	40,3±10
Others [c]				
A122003-Malonic acid	-60,8±6,7	-15,7±6,3	-27,6±7,2	37,2±7,6
A129001-Phosphoric acid	23,7±0,4	21,4±6,7	4,5±6,7	-25±12,4
A135003-Glyceric acid	98,9±2,6	17,6±9,4	-2,2±0,9	-58±2,7
A106002-Glycolic acid	3,9±1,1	72,7±2,2	1,5±0,7	-37,3±0,1
A143001-Glutaric acid	20,3±8,1	26,3±0,1	-7,4±2,1	-3,3±0,3
A195002-Ascorbic acid	NA	35,7±0,8	NA	-30,8±6,7
A145012-Isobutanoic acid, 3-amino-	-98,5±21,2	30,7±1,6	-27,3±7,9	16,6±5,1
A203003-NA	NA	11,9±2,1	-41,2±1,9	6,6±3,1
A140003-NA	14,1±2,3	31,7±1,2	-70,3±2,3	-33,1±12,9
A155004-NA	-2,7±34,9	29,1±35	-88±4,1	-94±22
A237001-NA	25,6±8,1	19,8±0,1	32,4±3,7	-56,8±0,8
A230001-NA	16,4±6,1	57,5±4,5	-22,3±5,4	10,7±10
A234001-NA	50,6±18,0	87,5±3,7	NA	NA
A254003-NA	8,4±18,3	45,7±4,2	-32,5±8,4	-49,6±12,4
A143003-NA	25,1±9,5	34,1±2,7	-11,1±7,8	-3,2±1
A189019-NA	16,3±4,3	39,5±3,9	15,7±3,3	-59±6,8
Non-plant substance [c]				
A207013-Glucosamine, N-acetyl-	20,6±0,4	22,8±0,1	-12±0,1	-23,3±0,3

*[a]Les métabolites sont classés par famille d'après la classification de KEGG) puis dans l'ordre de sortie de GC-MS. [b]Les changements du contenu métabolique des grains ont été analysés 44 h et 72 h post-semis. Seuls les métabolites montrant une différence significative (p< 0,05 ; test de Wilcoxon ; vert foncé en couleur de fond) et une tendance significative (p< 0,1 ; test de Wilcoxon ; vert clair en couleur de fond) apparaissent dans le tableau. Les valeurs sur fond blanc ne représentent pas des évolutions significatives. Les valeurs correspondent à des pourcentages d'évolution entre les deux conditions ((I - NI)/NI *100 +/- (écart type I - écart type NI)/écart type NI*100).*

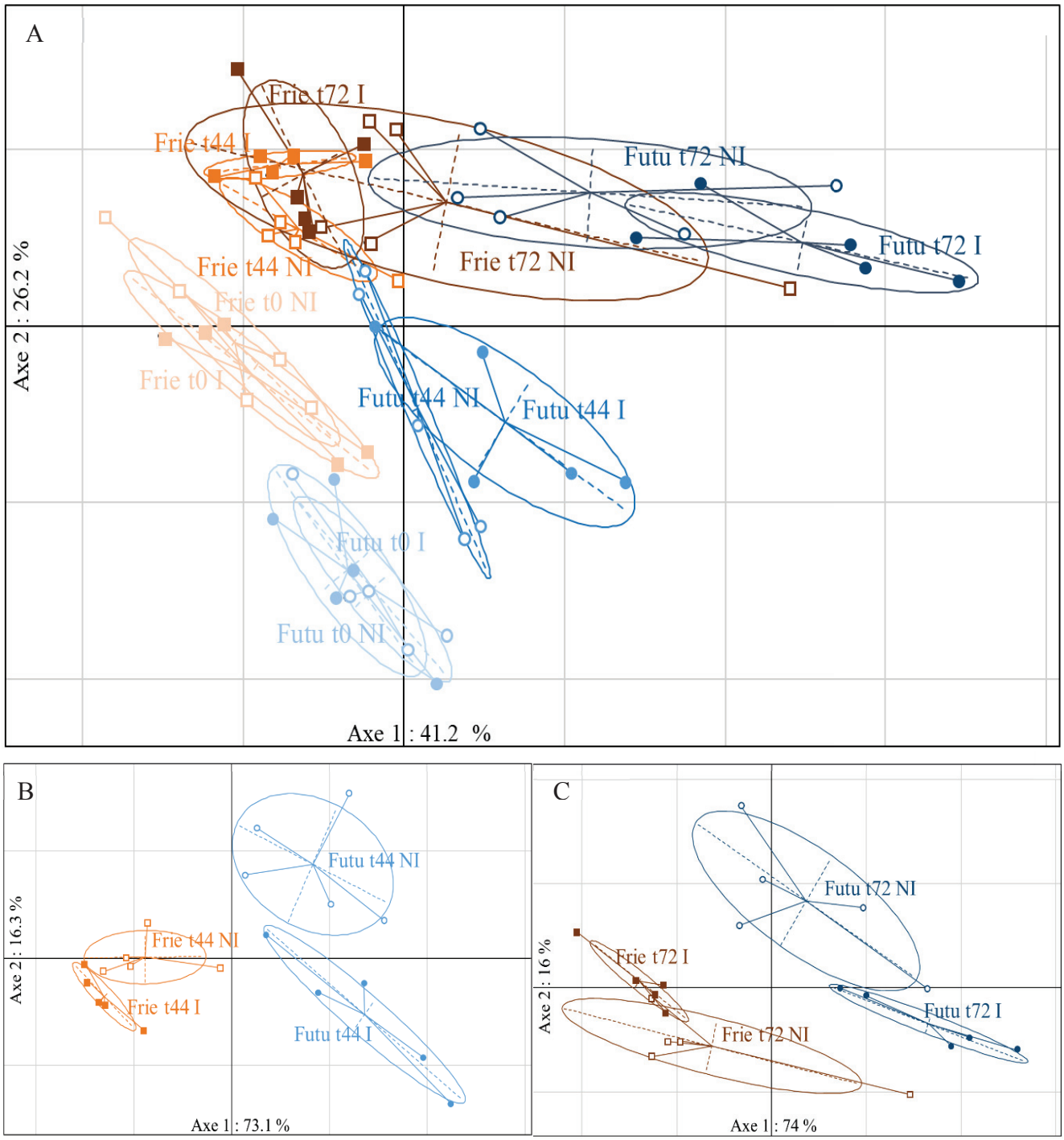


Figure 5.9 : Analyse multivariée non-discriminante (ACP – A) et discriminante (PLS-DA – B et C) du contenu métabolique des grains de maïs des cultivars FuturiXX et FriedriXX non-inoculés et inoculés avec *A. lipoferum* CRT1.

Le cultivar FuturiXX (Futu) est représenté par des cercles bleus clair à foncé, FriedriXX (Frei) par des carrés orange à marrons (dégradé selon le temps de cinétique). La condition NI est représentée par des cercles ou carrés vides, la condition I par des figures pleines.

Le tableau 5.1 liste l'ensemble des métabolites dont le contenu est significativement affecté (deux niveaux de significativité testés, $p<0,05$ et $p<0,1$, analyses monovariées, Tests de Wilcoxon) par l'inoculation avec *A. lipoferum* CRT1 à chaque temps de cinétique pour chaque cultivar. A 44 h post-semis, 18 métabolites sont significativement modifiés lors de l'inoculation chez le cultivar FriedriXX (I vs NI) contre 3 seulement chez FuturiXX ($p<0,05$; test de Wilcoxon). A 72 h post-semis, chez FriedriXX, 7 métabolites sont significativement affectés ($p<0,05$; test de Wilcoxon) par l'inoculation et 9 chez FuturiXX. Aucun métabolite dont le contenu a été modifié par la présence de l'agent bactérien dans un cultivar ou un temps de cinétique ne l'est aussi dans l'autre cultivar ou l'autre temps de cinétique.

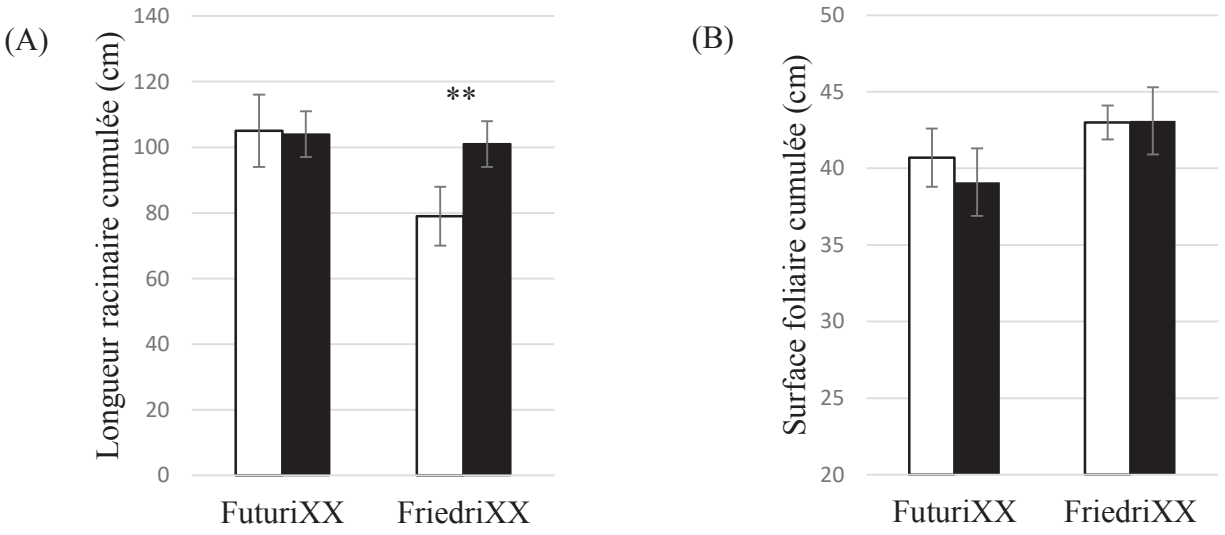
Chez FriedriXX, les différences en contenu métabolique sont plus importantes 44 h post-semis que 72 h post-semis. Le point le plus marquant est que les 18 métabolites dont le contenu est significativement modifié ($p<0,05$) par *A. lipoferum* CRT1 44 h post-semis voient tous leur concentration baisser, sans exception. Presque tous sont également des sucres, polyols ou molécules affiliées comme le ribose, l'acide galactonique, l'acide 2-oxogulonique, le glucose, le mannose, le glucose-6-phosphate, le galactose, le fructose, le D-glucopyranose, le β-D-fructofuranosyl-2,1-β-D-fructofuranose, le thréitol et l'érythritol.

En accord avec le moindre impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur la germination de FuturiXX, le métabolome des grains de cette variété est moins affecté 44 h post-semis (=post-inoculation) que dans la variété FriedriXX. De manière plus surprenante, des modifications plus importantes de son contenu métabolique sont observées 72 h post-inoculation. Une augmentation significative de la concentration en acide abscissique (48,8±2,7%) est notamment observée. Cette substance est connue pour sa capacité à activer les mécanismes de défense des plantes. L'acide 3-aminoisobutanoique qui partage cette activité biologique voit aussi sa concentration augmenter à ce temps de cinétique (30,7±1,6%). Un autre métabolite a attiré notre attention : la N-acetylglucosamine. Ce composé non végétal dont la concentration était supérieure lors de l'analyse des grains inoculés par rapport aux grains non-inoculés (22,8±0,1%) est un constituant de la paroi cellulaire des bactéries Gram+ et de certains champignons. De ce fait, il est présent chez *A. lipoferum* (Mehnaz *et al.* 2007).

3.4 Impact d'A. lipoferum CRT1 sur la physiologie et la morphologie des plantules de 11 j (3 feuilles)

Afin de savoir si les deux cutivars se comportent aussi différemment vis-à-vis d'*A. lipoferum* CRT1 au stade classiquement étudié de 3 feuilles (Chapitre 2 et 3) qu'à la germination, leur potentiel photosynthétique et leur morphologie ont été mesurées 11 j post-semis. Les plantules

du cultivar FriedriXX semées en présence d'*A. lipoferum* CRT1 montraient un système racinaire plus développé avec des racines latérales à la fois plus nombreuses et plus longues comme montré Figure 5.10A avec la mesure de la longueur cumulée des racines latérales. Les racines principales d'un diamètre supérieur à 1 mm présentaient une longueur inchangée (donnée non-montrée) tout comme la surface foliaire cumulée (Figure 5.10B). De même, l'inoculation bactérienne augmentait, chez FriedriXX, le rendement quantique maximum de conversion photochimique, Fv/Fm (Figure 5.10C), et le rendement quantique réel en présence de lumière actinique, Ft/Fm' (Figure 5.10D). La situation était très différente avec le cultivar FuturiXX qui, comme cela a déjà été montré dans le Chapitre 2, ne montre ni modification de son architecture racinaire et foliaire ni augmentation de son rendement quantique maximal de conversion photochimique (Figure 5.10A-C). Par contre, il montre une baisse de son rendement quantique de conversion photochimique en présence de lumière actinique (Figure 5.10D).



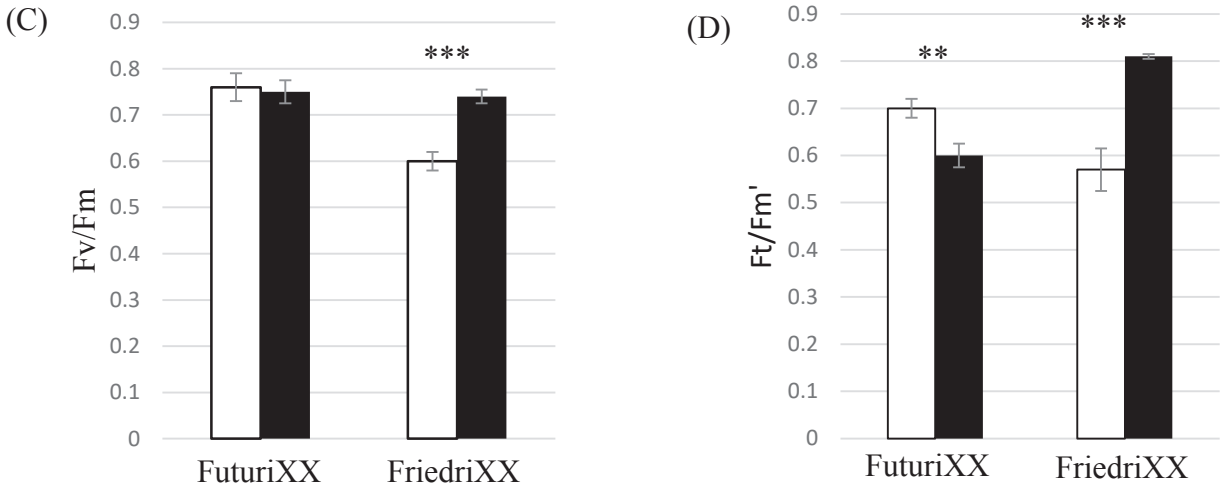


Figure 5.10 : Paramètres morphologiques et physiologiques des plantules de maïs inoculées avec *A. lipoferum* CRT1 et contrôle.

(A) Longueur cumulée des racines latérales (diamètre compris entre 1-0,5 mm). (B) surface cumulée foliaire. (C) Rendement quantique maximal de conversion photochimique (Fv/Fm). (D) Rendement quantique actuel de conversion photochimique (Ft/Fm'). Ces paramètres ont été mesurés sur des plantules du cultivar FuturiXX ou FriedriXX 11 jours après semis et non-inoculation (en blanc) ou inoculation (en noir) avec A. lipoferum CRT1.

4 Discussion

L'analyse des photographies prises en time-lapse durant cette étude suggère que le dépôt d'*A. lipoferum* CRT1 sur les semences de maïs au moment de leur semis accélère la sortie de la radicule. Mais aucun effet ultérieur post-germinatif n'a été observé sur la croissance de la radicule. Une amélioration par différentes espèces et genres de PGPR du taux de germination du maïs (pouvant atteindre jusqu'à 18.5%), par amélioration de l'indice de vigueur du grain, a déjà été décrit dans des conditions contrôlées (Gholami 2008). Une autre étude utilisant l'agent PGPR de biocontrôle *P. fluorescens* a également observé une stimulation de la germination ainsi que du rendement et de la biomasse de la plante hôte (Raj *et al.* 2004). Cependant, aucun suivi cinétique n'a été réalisé dans ces études pour savoir si une accélération de la sortie de la radicule accompagnait ces résultats. Comme les lots de grains de maïs utilisés dans cette étude avaient un taux de germination de quasi 100%, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de ces études.

La comparaison durant cette étude des métabolomes des grains de maïs en germination et post-germination confirme la suggestion faite lors de l'analyse des photographies en time-lapse qu'*A.*

lipoferum CRT1 accélère un processus conduisant à la sortie de la radicule. Au moment où le pourcentage de germination était augmenté au maximum (d'un facteur 11, 44 h post-semis), l'analyse de contenu en petits métabolites solubles a révélé une diminution sélective des métabolites liés au métabolisme énergétique (sucres, polyols et molécules apparentées). Inversement, aucun effet n'a été observé sur la teneur en amidon. Ceci est compatible avec l'usage connu (Nomura *et al.* 1969; Shu *et al.* 2008) des petites molécules énergétiques stockées dans la graine au repos pour satisfaire les besoins énergétiques des étapes pré-germinatives (*i.e.* avant la sortie de la radicule) et avec l'usage des larges molécules énergétiques (comme l'amidon pour le maïs) pour soutenir la croissance de la radicule et des parties aériennes post-germination (Bewley 1997). De fortes concentrations en sucres simples comme le glucose est également connu pour exercer un effet inhibiteur sur la germination en réprimant la cascade de signalisation contrôlée par l'hormone de croissance auxine (LeClere *et al.* 2010). Il est donc possible que la consommation de ces substances énergétiques simples par *A. lipoferum* CRT1 lève leur effet inhibiteur sur la germination et accélère ainsi la sortie de la radicule.

Des études antérieures en champ et sous serre des mécanismes d'action d'*A. lipoferum* CRT1 sur le maïs avaient conclu que l'étape clé conduisant à l'augmentation de rendement était précoce, avant le stade plantule (Jacoud *et al.* 1999; El Zemrany *et al.* 2007). La principale raison invoquée était que l'agent bactérien a une teneur qui diminue sur le grain depuis le moment de son dépôt lors du semis pour devenir indétectable 57 jours après semis, au stade 5-6 feuilles. Plus récemment, par une analyse d'un plus grand nombre de caractères sur un système expérimental plus grand et pluriannuel, il a été suggéré que la capacité de l'agent bactérien à stimuler le rendement en grain était en fait liée à sa capacité à accélérer la levée des semences pour limiter la mortalité des grains juste après le semis en cas de conditions pédoclimatiques défavorables et ainsi sécuriser la levée et donc le peuplement final (Chapitre 4 - Rozier *et al.* 2017). Les résultats de cette étude confirment cet effet germinatif en précisant même que ce sont les processus pré-germinatifs qui sont accélérés et non pas ceux liés à la croissance de la radicule post-germination. Le priming par des conditions de température et humidité élevées, et à présent le bio-priming, sont des technologies utilisées en routine afin d'assurer la germination des plantes de culture (Reddy 2012; Kaymak *et al.* 2009; Mirshekari 2012). Le potentiel des PGPR à assurer cette fonction a d'ailleurs été envisagé (Kaymak 2010) et nos résultats confirment qu'*A. lipoferum* CRT1 s'inscrit dans cette logique. Mais les PGPR ont des actions très variées sur les végétaux et certaines, comme *P. fluorescens* doublent leur capacité à stimuler la germination d'une activité de protection contre les organismes phytopathogènes

(Raj *et al.* 2004). Comme peu de souches de PGPR ont été analysées pour des effets germinatifs, il serait judicieux, suite à cette étude, d'effectuer un screening de souches de PGPR élites pour leur capacité à accélérer la sortie de la radicule. Elles pourraient être utilisées seules ou en combinaison avec d'autres souches possédant d'autres capacités à stimuler la croissance des végétaux ou à les protéger contre des agressions.

La capacité d'*A. lipoferum* CRT1 à accélérer la sortie de la radicule ne se manifeste que sur des hôtes spécifiques au niveau intra-spécifique. Sur les deux variétés utilisées dans cette étude, seule une, FriedriXX, a répondu positivement à l'agent bactérien. De manière intéressante, la variété Seiddi utilisée dans les chapitres 2, 3 et 4 a une germination accélérée par *A. lipoferum* CRT1 et présente, sous conditions similaires de semis et 11 j après semis, les mêmes modifications morphologiques de son architecture racinaire et foliaire et la même augmentation de ses rendements quantiques maximum, et actuels, de conversion photochimique que la variété FriedriXX. Comme la variété FuturiXX ne présente ni modification physiologique 11 j après semis ni accélération de sortie de radicule en présence de l'agent bactérien, il est tentant de conclure que ces deux phénomènes apparaissant à des moments différents de vie de la plante sont liés. Cependant, le nombre de variétés analysées est trop faible à ce stade pour soutenir cette hypothèse.

Si des relations fines de spécificité de reconnaissance hôte-bactéries ont été établies pour de nombreuses souches de PGPR et leurs hôtes végétaux, les mécanismes gouvernant cette spécificité n'ont encore jamais été élucidés. Les importantes différences entre les métabolomes des grains des deux variétés de maïs de cette étude au moment du semis sont peut-être responsables de cet effet entre *A. lipoferum* CRT1 et les grains de maïs en germination. De fortes concentrations en sucres à la surface des feuilles (principalement glucose, fructose et saccharose) (Mercier et Lindow 2000) sont connues pour favoriser la colonisation bactérienne et donc leur interaction avec les plantes. Mais les résultats de la présente étude suggèrent l'existence d'une signalisation impliquant des éliciteurs car l'absence de réponse positive de la plante par accélération de sortie de la radicule semble être concomitante à la mise en place d'une réaction de défense contre l'agent microbien. Trois jours après semis, les grains de la variété FuturiXX accumulaient en effet des concentrations plus importantes de l'hormone de stress acide abscissique qui contrôle notamment l'expression de mécanismes de défense (Anderson *et al.* 2004). En accord avec ce résultat, une étude séparée utilisant la PGPR *Bacillus subtilis* a révélé une induction de la phenylalanine ammonia lyase (une enzyme contrôlant la production de métabolites antibiotiques) chez les grains inoculés (Podile et Laxmi 1998) et la présente

étude a observé une augmentation parallèle des teneurs en N-acétylglucosamine, une substance non-végétale et constituant la paroi des bactéries Gram +. *A. lipoferum* CRT1 a été classé dans la littérature en tant que Gram variable, oscillant entre Gram + et Gram - en fonction de son stade de croissance (Du *et al.* 2000; Navarre et Schneewind 1999). Différentes études ont fait état de la mortalité assez rapide de PGPR dans la rhizosphère ou sur les racines de plantes (Wiehe et Höflich 1995; Yan *et al.* 2003). Il est donc possible que l'apparition de N-acétylglucosamine dans nos extraits résulte de la dégradation des parois d'*A. lipoferum* CRT1 par des enzymes de défense du grain. Cependant, les travaux ont été effectués dans un modèle sans sol, non-stérile et avec des grains issus de l'agriculture biologique. Il est donc possible que cette substance résulte de la dégradation d'autres souches de microorganismes présentes au semis sur les grains. Une information importante non-disponible pour l'instant concerne le niveau de développement d'*A. lipoferum* CRT1 sur les grains de maïs dans les jours qui suivent son ajout. Des analyses par dénombrement d'unités formant colonies et par qPCR des entités microbiennes présentes à la surface des grains pourraient éclairer ce point.

Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives

1. *Les concepts traditionnels de nutrition et hormones expliquent-ils l'effet morphotrophe d'A. lipoferum CRT1 sur le maïs ?*

Une importante partie de la littérature fait l'hypothèse que les effets morphotrophes des PGPR du genre *Azospirillum* sont liés à des effets nutritifs et/ou à la modification de la balance en phytohormones, telles que les auxines, dans la plante hôte (Malik *et al.* 1997; Okon 1993; Richardson *et al.* 2009). Khalid *et al.* (2004) conclut même que plus une souche produit d'auxines, plus ses effets stimulateurs de croissance sont importants. La production d'auxines et la minéralisation de l'azote atmosphérique sont d'ailleurs les deux principaux critères de sélection de souches de PGPR du genre *Azospirillum*. Zaeim *et al.* (2017) décrit les effets indirects que peuvent produire les PGPR, tels des catalyseurs, sur la plante (activité antagoniste contre des pathogènes notamment, modification de la chimie du sol dont la teneur en phosphate et ammonium). Cependant, les informations gagnées au fur et à mesure de nos expérimentations et résumées sur les figures 6.1 et 6.2 ne fournissent aucun soutien à ces hypothèses.

Une première série d'observations a été faite durant l'expérimentation en champ (Chapitre 4). En effet, tant au niveau du rendement en grain que des effets morphologiques et physiologiques observés sur les plantules de 4-5 feuilles, les réponses sur les 4 parcelles semées se sont révélées très distinctes entre sites et années. Non seulement les plantes, même non-inoculées, se sont avérées très influencées par les conditions environnementales mais la présence d'*A. lipoferum* CRT1 n'a pas imposé aux plantes d'adopter une morphologie, signature en métabolites ou rendement en grain similaires, ou tout au moins, tendre vers des signatures similaires sur ces points. La présence de la bactérie pouvait par exemple tout aussi bien augmenter le rendement que le faire baisser. L'action de la bactérie sur les plantules en champ a donc semblé être un facteur supplémentaire aux autres facteurs biotiques et abiotiques pour modeler la croissance et le développement de la plante. Il ne les supplante pas, il agit sur la plante en fonction d'eux. Notre étude n'est pas la seule à mettre en exergue cette importante variabilité dans les réponses de la plante à la présence de PGPR (Díaz-Zorita et Fernández-Canigia 2009; Okon et Labandera-Gonzalez 1994). Comme une application exogène d'auxine ou d'engrais azotés ont un effet répétable d'augmentation de croissance (Arteca 2013; Tilman *et al.* 2002), il serait attendu qu'*A. lipoferum* CRT1 ait une action morphotrophe similaire sur son hôte indépendamment du contexte pédo-climatique si son effet était principalement dû à sa capacité à nourrir son hôte et à modifier sa balance hormonale. Il serait également attendu qu'un effet nutritif se traduise par une évolution similaire des teneurs de certaines substances sur tous les sites de notre étude. Ou alors, il faudrait admettre que l'expression de ces activités chez *A.*

lipoferum CRT1 est dépendant du contexte pédo-climatique (de manière directe ou indirecte *via* son hôte) ou qu'elles sont trop faibles face aux sollicitaions environnementales. Mais d'autres observations suggèrent qu'*A. lipoferum* CRT1 agit par d'autres mécanismes sur son hôte. Le séquençage récent du génome d'*A. lipoferum* CRT1 a révélé l'absence de gènes classiquement responsables de la production de l'IAA, même s'il n'est pas exclu que cette souche puisse synthétiser d'autres composés à action auxinique. Nos résultats ont montré que le niveau de fertilisation azotée n'influence pas l'impact d'*A. lipoferum* CRT1 sur le rendement. Dans le même sens, d'autres études ont montré que l'ammonification de l'azote atmosphérique par *Azospirillum* était trop faible pour impacter significativement la croissance de son hôte (Broek *et al.* 2000; Martínez-Viveros *et al.* 2010; Richardson *et al.* 2009).

L'étude en champ décrite dans ce document (Chapitre 4) concluait que l'augmentation de rendement était liée à une accélération de la germination, une activité biologique qui a été confirmée en conditions contrôlées (Chapitre 5). La germination des semences de maïs n'est pas soumise à la nutrition externe. Mais elle est régulée hormonalement, notamment par les auxines. Notre analyse métabolomique des grains en germination n'a cependant pas permis de doser des hormones végétales. L'utilisation de technologies plus sensibles comme testées dans le Chapitre 2 pourrait peut-être donner un éclairage sur ce point.

L'analyse transcriptomique réalisée dans le Chapitre 3 a montré l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la cascade de signalisation des auxines et de l'ABA. Ces activations ont été visibles dans les feuilles et non dans les racines malgré le fait que ces deux organes aient une croissance stimulée par *A. lipoferum* CRT1, surtout les racines. Si ces croissances étaient dues à la production de molécules à activité auxinique par la bactérie, il serait attendu que l'impact sur la transcription de gènes régulés par les auxines soit plus visible sur les racines que les feuilles. Même si l'ABA et les auxines sont transportées par la sève ascendante, l'analyse métabolomique réalisée dans cette étude (Chapitre 2) n'a pas mis en évidence d'hormones végétales dans la sève ascendante et l'usage d'un outil plus sensible de spectrométrie de masse est peut-être nécessaire pour clarifier ce point.

L'analyse métabolomique de la sève ascendante (Chapitre 2) n'a pas mis en évidence d'augmentation des teneurs en phosphate, orthophosphate ou de molécules organiques porteuses d'azote comme la glutamine, l'arginine ou l'asparagine suite à l'inoculation par *A. lipoferum* CRT1. Ces résultats ne soutiennent pas l'hypothèse d'une nutrition minérale accrue par la bactérie, soit par son action directe sur l'azote de l'air ou le phosphore du sol soit par

augmentation de la surface racinaire suite à une modification de la balance hormonale de la plante par la bactérie.

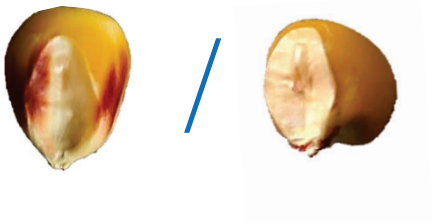
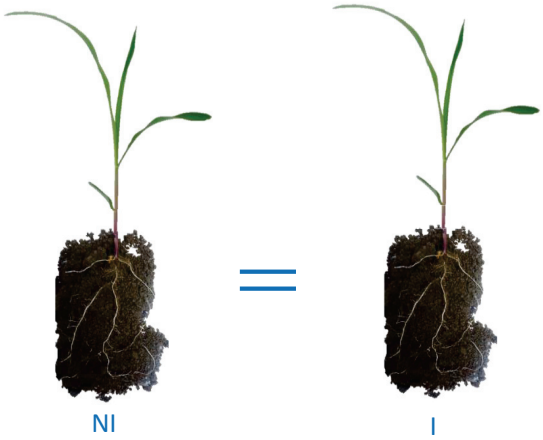
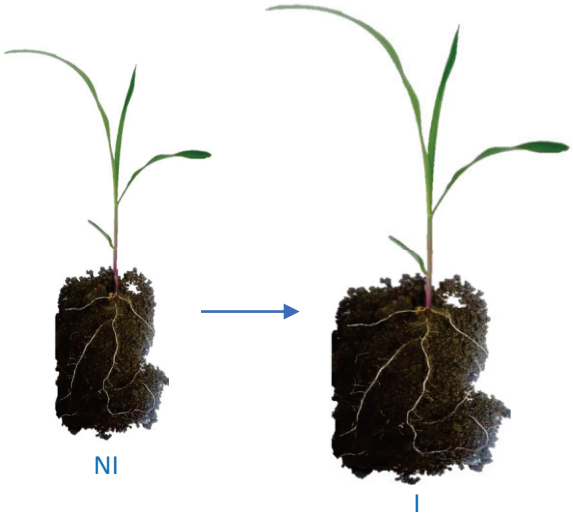
FUTURIXX	FRIEDRIXX/SEIDDI
	
-pas d'effet sur la germination -réactions de défense (augmentation de la concentration en ABA, dégradation de la paroi de la bactérie)	-accélération de sortie de la radicule -sécurisation du rendement en champ -diminution de teneur des sucres et AA
	
-pas de stimulation de croissance et potentiel photosynthétique -stimulation de la voie de l'JA -stimulation activités réd/ox -diminution teneur constituants du cycle Krebs	-stimulation de croissance racinaire et foliaire - augmentation efficacité photosynthétique (PSII) -stimulation des voies ABA et IAA -modification des parois cellulaires -modification régulation des activités cellulaires

Figure 6.1 : Effets cultivar-spécifique observés sur la plante lors de l'interaction avec *A. lipoferum* CRT1.

Dans les cadres supérieurs, les effets liés au grain et à la germination, dans les cadres du bas, les effets liés à la plantule en conditions contrôlées et en champ. ABA=acide abscissique ; AA=acides aminés ; JA=acide jasmonique ; réd/ox=effets d'oxidoréduction ; PSII=photosystème II ; IAA=acide indol-3-acétique.

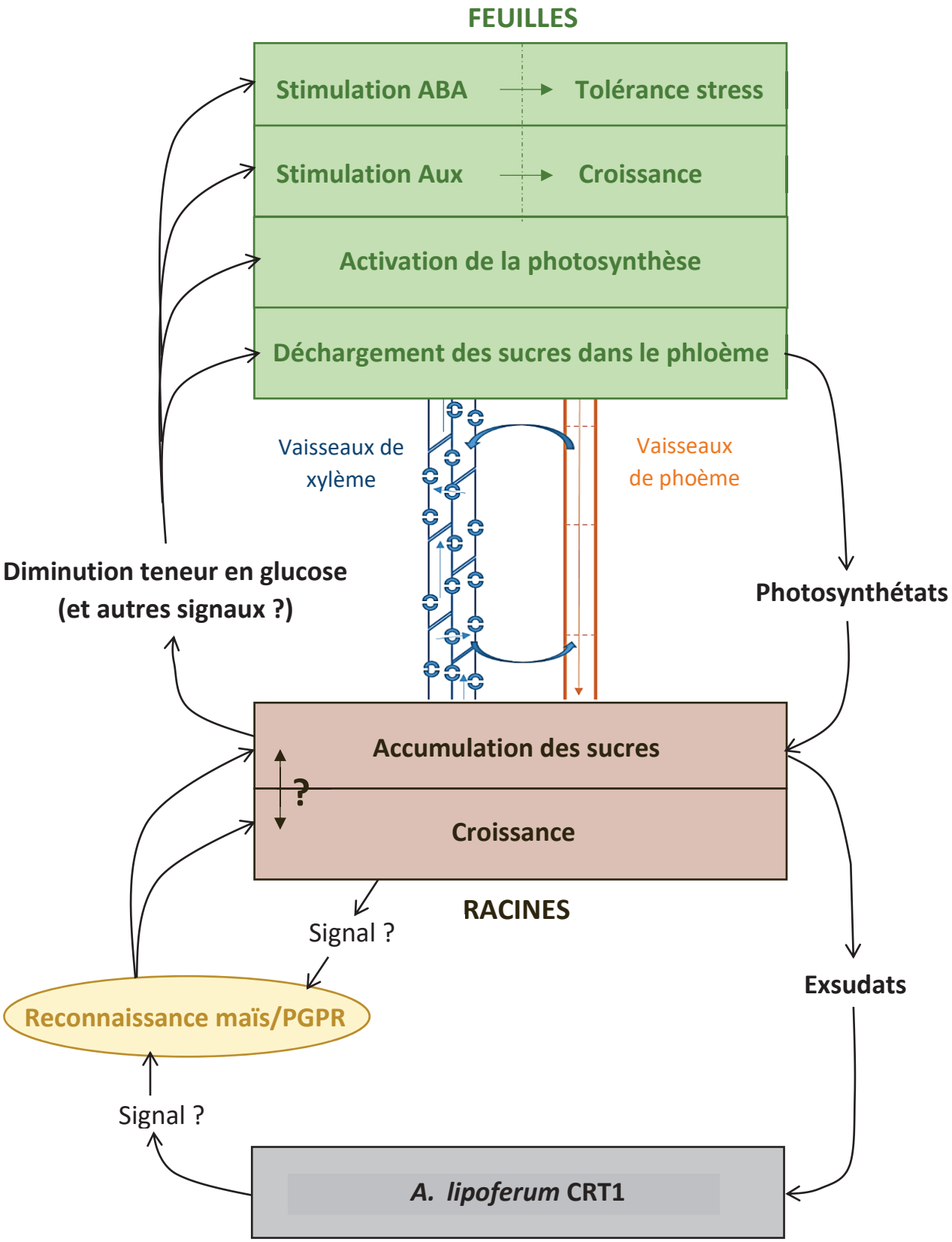


Figure 6.2 : Modélisation de l'interaction entre un cultivar de maïs compatible avec la symbiose et *A. lipoferum* CRT1.

La bactérie est représentée dans un rectangle gris, les racines dans des boîtes marron et les feuilles dans des boîtes vertes. Les flèches indiquent les hypothèses de relations de cause à effet induites par l'inoculation avec la PGPR comme suggérées par les résultats des différents chapitres de cette étude.

2. *Un rôle possible des sucres simples dans la signalisation de l'action morphotrophe d'A. lipoferum CRT1 sur le maïs*

Toutes les analyses métabolomiques qui ont été conduites, que ce soit au niveau des parties racinaires, aériennes (Chapitre 3), de la sève ascendante (Chapitre 2), du grain (Chapitre 5), en conditions contrôlées (Chapitres 2,3,5) ou en champ (Chapitre 4), ont révélé des modifications significatives (augmentations ou diminutions) des teneurs de différents sucres simples en corrélation avec une stimulation de croissance par *A. lipoferum* CRT1. Ces derniers sont notamment connus pour réguler des activités métaboliques comme la photosynthèse et les voies de signalisation intracellulaire de nombreuses phytohormones. Ils sont aussi consommés par la bactérie et utilisés par la plante pour sa croissance. La modulation de leur concentration (par consommation ou modification de répartition entre compartiments) au sein de la plante pour une augmentation de croissance locale et systémique par *A. lipoferum* CRT1 est une de nos principales hypothèses (Figure 6.2).

2.1 Inter-relations entre sucres et rhizobiome

De manière générale, les carbohydrates, acides aminés et acides organiques sont les principales substances organiques exsudées par les racines. Ils constituent la principale source de carbone pour les microorganismes telluriques dont les PGPR (Goswami *et al.* 2016; Okon 1993). 5 à 30% des produits issus de la photosynthèse sont ainsi exsudés par la plante, permettant au nombre de bactéries d'être 100 à 1000 fois plus élevé au niveau de la rhizosphère qu'au niveau d'un sol nu (Glick 2014). Comme un certain nombre de métabolites secondaires antibiotiques est également sécrété, la diversité génétique bactérienne diminue en se rapprochant de la racine. Les PGPR et leurs fonctions associées, comme la solubilisation du phosphate tellurique, sont ainsi affectées par la racine (Figure 6.3) (Goswami *et al.* 2016) et la plante va modifier la composition chimique, microbiologique et structurelle du sol qui est à proximité de ses racines, un sol appelé sol rhizosphérique (Marschner *et al.* 1987). *Azospirillum* ne peut pas métaboliser le saccharose mais peut utiliser le glucose et le fructose, produits du clivage du saccharose. Ces trois molécules, saccharose, glucose et fructose ont été montrées comme étant les principales sources de l'attraction chemotactique d'*Azospirillum* vers les racines des plants de blés (Heinrich et Hess 1985). D'autres molécules comme le D-fructose, L-aspartate, citrate, oxalate ou encore le L-malate aident à établir une spécificité intra-spécifique d'attraction (Reinhold *et al.* 1985). Il a aussi été montré qu'*A. lipoferum* CRT1 pouvait être mis en culture sur du glucose et que sa cinétique de croissance et de biomasse étaient bonnes (Figure 6.4 ; Okon 1993).

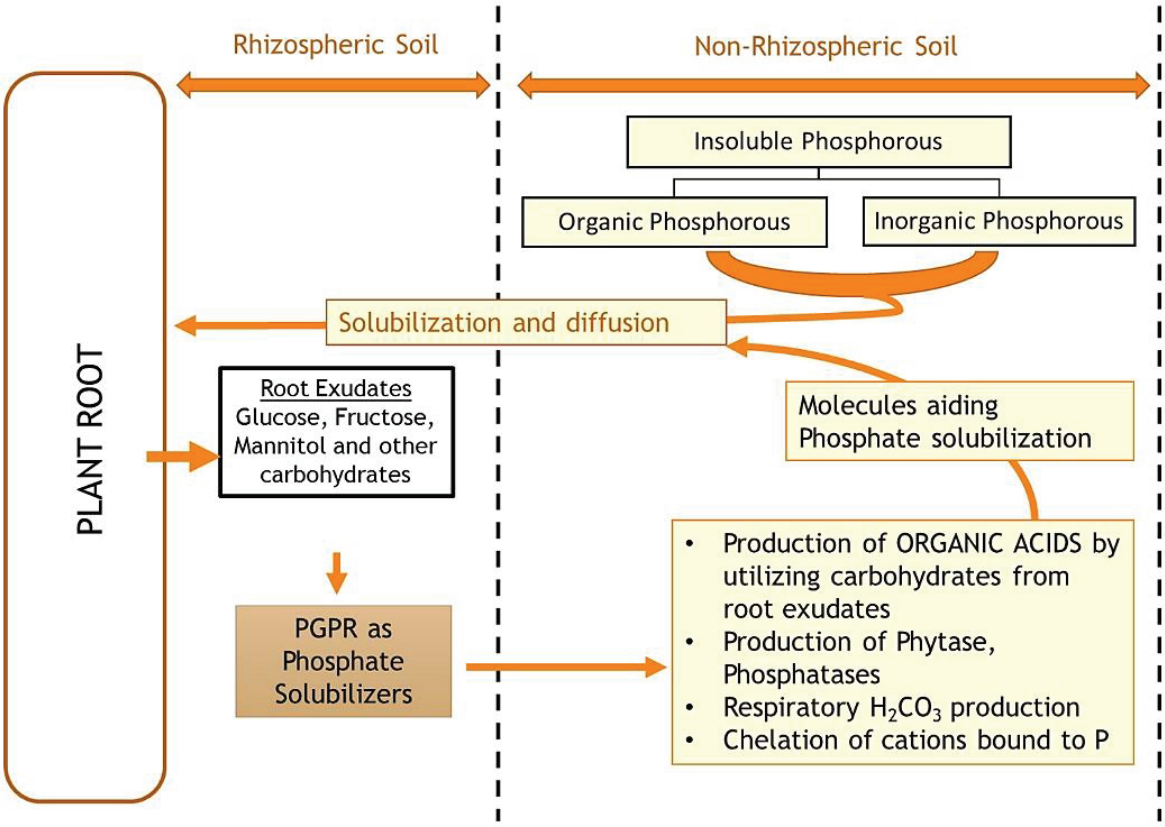


Figure 6.3 : Liens entre l'exsudation de carbohydrates de la plante et les mécanismes des PGPR (d'après Goswami *et al.* 2016).

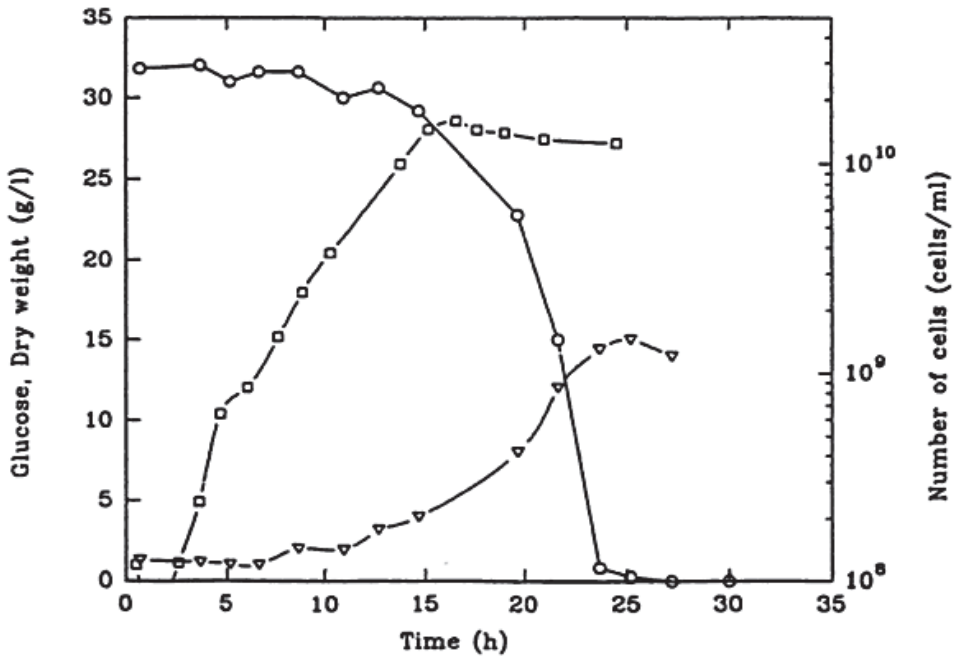


Figure 6.4 : Cultures d'A.lipoferum CRT1 sous des conditions de fermentation (d'après Okon 1993).

La cinétique de production de biomasse et de consommation du glucose est illustrée ici avec la masse sèche totale des cellules (triangles), le glucose (cercles) et le nombre de cellules par mL (carrés).

Les carbohydrates de faible poids moléculaire et principalement le glucose peuvent-être ré-absorbés par la plante de manière active (*via* des transporteurs protéiques spécifiques). La ré-absorption de matières carbonées par des plantules de maïs a été étudiée par l'utilisation de radioisotopes. Le glucose et le mannose sont ré-absorbés par les plantules à hauteur de 70,5 et 40,2 µg par gramme de racines (poids sec) et par heure, respectivement (Jones et Darrah 1992). La présence de bactéries rhizosphériques induit une forte compétition pour le glucose qui devient limité (Kuzyakov et Jones 2006). En accord avec l'idée qu'une consommation rhizospérique puisse impacter les teneurs en sucres internes à la plante, il a été observé lors de nos expériences, que l'ajout d'*A. lipoferum* CRT1 diminue la quantité de glucose transportée vers les parties aériennes (Chapitre 2) et celle des grains en germination (Chapitre 5). L'hypothèse peut donc être faite que l'ajout d'*A. lipoferum* CRT1 augmente le pouvoir des racines à agir comme un puit aux substances carbonées énergétiques, engendrant ainsi une modification de la signalisation due au sucres et de leurs effets régulateurs de la photosynthèse et de la tolérance aux stress osmotiques et salins (Kerepesi et Galiba 2000).

2.2 Impact de sucres sur la signalisation hormonale dans la plante

Le métabolisme du saccharose est au centre de mécanismes de croissance des racines, de synthèse de protéines, amidon, cellulose, ou encore de régulation de facteurs de transcription. Les sucres simples qu'il génère constituent en effet la principale source d'énergie et briques de construction. Ils interviennent aussi dans la régulation de la pression osmotique, interagissent avec les cascades de transduction de signaux hormonaux lors de stress environnementaux et agissent comme signal d'interaction plante/bactéries (revu dans Ruan, 2014). C'est le cas notamment du glucose. Les hexokinases sont des enzymes qui phosphorylent les hexoses dont le glucose, et qui agissent comme première étape de la signalisation 'glucose' qui fait ensuite usage des cascades de signalisation des auxines, de l'acide abscissique, des cytokinines et de l'éthylène (Rolland et Sheen 2005). Cette interaction sucre/voies hormonales est de même connue pour le saccharose. Par sa capacité à produire du glucose à la place de l'UDP glucose (contrairement à la glucose synthase), l'invertase va permettre d'initialiser un signal glucose (Figure 6.5). La régulation transcriptionnelle de ces 2 enzymes va donc induire des signaux de sucres légèrement différents (Koch 2004) et est réalisée en partie par des signaux attribués au sucres et aux hormones (Winter et Huber 2000; Trouverie *et al.* 2003; Long *et al.* 2002). Deux groupes de protéines, les protéines DELLA et les protéines PIF (phytochrome-interacting factor) sont les principaux médiateurs et intégrateurs qui relient les voies de signalisation des

sucres et des auxines, cytokinines, JA, ABA, gibbérellines et brassinostéroides (Figure 6.6) (Ljung *et al.* 2015). Cette signalisation croisée est nécessaire pour s'assurer que l'engagement vers la croissance induite par les hormones puisse être soutenu par une quantité suffisante en substrats énergétiques principalement constitués de sucres simples (Lastdrager *et al.* 2014a). Les PIF sont également au centre de la cascade de signalisation initiée par la lumière pour l'établissement du rythme circadien (Leivar et Quail 2011). Le glucose module de même le fonctionnement d'un complexe protéique : le complexe protéique G, qui régule la localisation de l'auxine dans les racines des plantes (Booker *et al.* 2010). Outre la croissance, l'activité photosynthétique et la prise de nutriments seront aussi co-régulées par les sucres et les hormones. C'est très souvent la disponibilité en saccharose dans la plante, fortement corrélée à celle du tréhalose-6-phosphate, qui va être un indicateur du statut métabolique de cette dernière et induire une régulation de facteurs de transcription (C/S1-bZIP notamment) contrôlant la croissance de la plante (Lastdrager *et al.* 2014b).

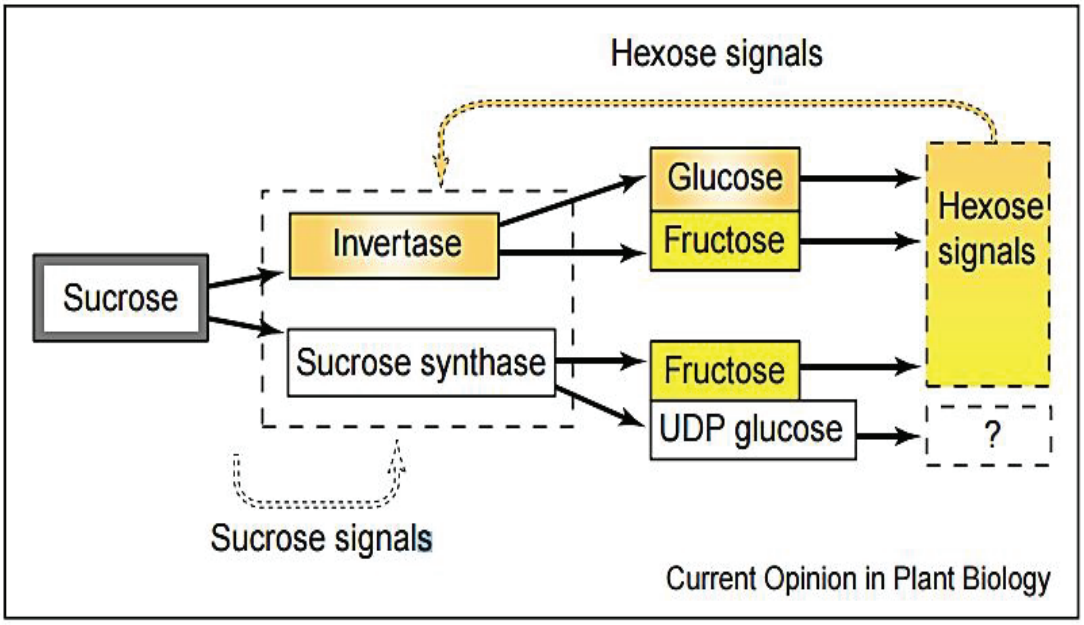


Figure 6.5 : Importance des enzymes clivant le saccharose dans l'équilibre entre les signaux de sucres et les voies métaboliques (Koch 2004).

Différents mécanismes de signalisation sont actives par des hexoses et d'autres metabolites sous-jacents mais aussi par le saccharose lui-même L'invertase, qui clive le saccharose, génère du glucose libre notamment et quasiment deux fois plus de substrat pour la signalisation des sucres basée sur les hexoses que le fait l'action réversible de dégradation de la saccharose-synthase.

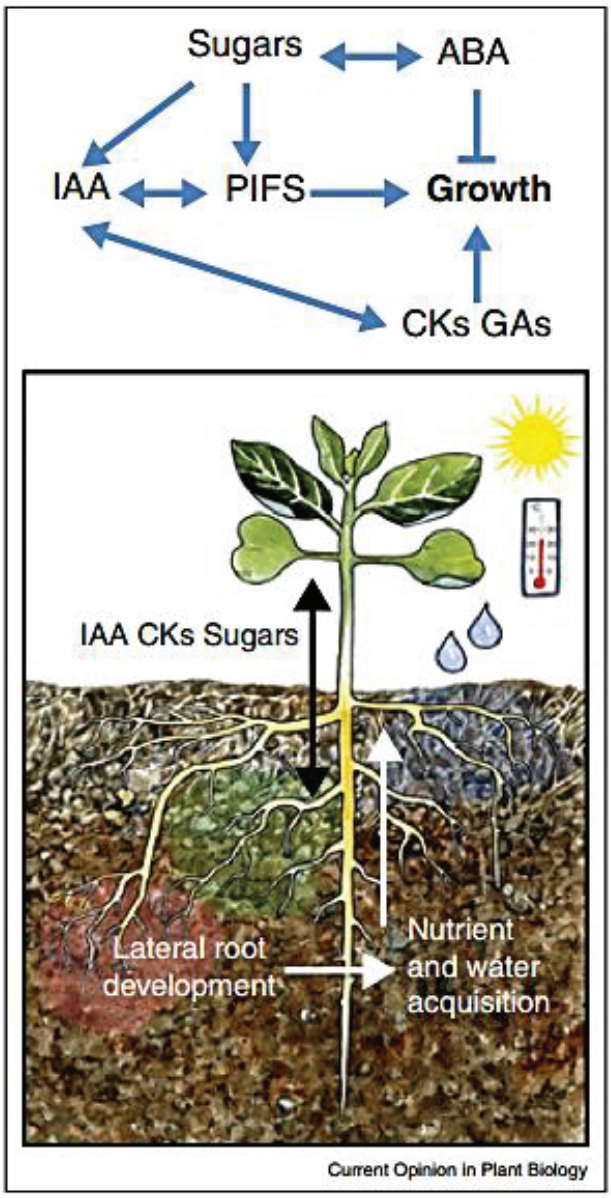


Figure 6.6 : Les sucres et les phytohormones sont des composants clé dans la régulation de la croissance des plantes (d'après Ljung *et al.* 2015).

La température, la lumière et d'autres facteurs environnementaux sont ressentis par les parties aériennes de la plante. Ceci va affecter la photosynthèse et la production de sucres en régulant les niveaux de l'IAA et la fonction de PIF. Les cytokinines, gibbéréllines et acide abscissique affectent de même la croissance et leurs voies de signalisation sont liées au status des sucres et nutriments. Les CKs, IAA et sucres agissent comme des signaux longue-distance, affectant le développement des racines latérales et les jeunes pousses. L'IAA et les sucres peuvent-être transportés des feuilles vers les racines, induisant un développement des racines latérales afin de d'augmenter la prise d'eau et de nutriments à partir du sol, créant ainsi une capacité de croissance des tiges plus importante. La signalisation des racines vers les feuilles est aussi importante afin de coordonner la croissance et le développement de la plante entière. Les voies ne sont pas encore connues intégralement, de même que les boucles de régulation et les partenaires de l'interaction.

Les cascades intracellulaires de transduction des signaux hormonaux et sucres sont tellement imbriquées qu'il est difficile de savoir qui des sucres ou des hormones sont les signaux initiateurs de phénomènes biologiques. Certains travaux ont ainsi affirmé que le rôle de l'auxine dans la dominance apicale chez les plantes était négligeable contrairement à ce qui a été cru pendant longtemps et devait être attribué aux sucres. En effet, l'induction de la dominance apicale est ici antérieure à une modification de la teneur en auxine et une supplémentation artificielle en saccharose a permis d'induire la sortie de dormance des bourgeons latéraux (Mason *et al.* 2014). La problématique s'applique aussi au système expérimental de cette étude où il est difficile de savoir si la baisse de teneur en sucres est due à une croissance accrue induite par un signal bactérien auxinique ou si elle est directement induite par l'agent bactérien et agit comme signal positif sur la croissance en utilisant la voie de signalisation de l'auxine. Lors des analyses transcriptomiques de cette étude, aucun transcrit appartenant à la famille des PIF ne s'est révélé être significativement modifié par *A. lipoferum* CRT1. Mais ces protéines sont également régulées post-traductionnellement et il serait intéressant de les étudier plus en détail.

D'autres études ont montré que les PGPR modifient le contenu global en sucres solubles et en amidon chez leur hôte. L'inoculation de plantules de vigne avec la PGPR *Burkholderia phytofirmans* PsJN permet notamment une acclimatation au froid par une accumulation du contenu en glucose, fructose, maltose, sucrose, raffinose et mannose, en comparaison avec les plantules non-inoculées (Fernandez *et al.* 2012). De même, à 26°C, les feuilles des plantules inoculées contiennent significativement plus d'amidon que les feuilles des plantules non-inoculées. La photosynthèse est impactée avec une diminution de la photosynthèse nette chez les plantules inoculées par induction de la fermeture des stomates.

Il est à noter que si les données transcriptomiques et métabolomiques de cette étude suggèrent que l'induction de croissance par *A .lipoferum* CRT1 implique, ou s'effectue en parallèle d'une modification des cascades de signalisation par le glucose, les auxines et l'ABA, aucune implication des cascades de signalisation intracellulaire d'autres hormones végétales comme les cytokinines, gibbérellines et brassinostéroides n'a été suggérée.

3. Vers de nouvelles formulations à base de PGPR

Encore aujourd'hui, de nouvelles souches de PGPR sont découvertes par des screening à grande échelle de bactéries rhizosphériques aux activités phytobénéfiques (Rahmoune *et al.* 2017; Chunhaleuchanon 2008). Il est important de noter que leurs effets sont spécifiques d'une espèce

ou même d'un cultivar au sein d'une même espèce. Afin d'obtenir les meilleurs effets de croissance et de rendement de la plante inoculée, il est nécessaire d'isoler et de caractériser un grand nombre de souches de PGPR adaptées aux conditions de sol dans lesquelles la culture est souhaitée. La souche devra avoir la capacité de s'ancrer sur les racines de la plante afin d'établir une coopération engendrant les effets phénotypiques discutés tout au long de ces travaux. Un point important à noter est que la plante peut mettre en place des mécanismes de défense en réponse à l'inoculation. La production de métabolites secondaires phénoliques a été mise en évidence lors d'interaction entre *Azospirillum* et des cultivars non-compatibles avec la symbiose de riz (Drogue *et al.* 2014) et de maïs (cette étude). Il est donc nécessaire de vérifier la compatibilité d'une souche PGPR avec le ou les cultivars d'intérêt. Les bactéries décrites dans ces travaux de thèse, mais aussi certains champignons tels que ceux appartenant aux genres *Ampelomyces*, *Coniothyrium* et *Trichoderma*, sont des candidats de choix pour l'amélioration des cultures (Berg 2009; Bent 2006). L'activité phytobénéfique de nouvelles espèces de PGPR ou PGPF (plant growth-promoting fungi) est régulièrement mise en évidence. Une perspective actuelle est de réaliser des mélanges de différentes espèces et de tester leur action synergique sur la plante hôte. C'est le cas par exemple de la bactérie nodulant les légumineuses, *Rhizobium,* testée en co-inoculation avec différentes souches PGPR telles que *Zotabacter chroococcum*, *A. brasilense*, *P. fluorescens, P. pudida*, et *Bacillus cereus* (Tilak *et al.* 2006) mais aussi de certaines souches de *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* qui montraient aussi des activités phytobénéfiques individuellement (Antoun *et al.* 1998; Valverde *et al.* 2007; Kaur *et al.* 2015). Les effets synergiques entre 3 souches différentes de PGPR et 3 souches de cyanobactéries ont, par exemple, permis de doubler la masse de la panicule chez le blé (Nain *et al.* 2010). La co-inoculation avec les cyanobatéries est d'ailleurs une des technologies qui semble les plus prometteuses (Manjunath *et al.* 2011; Prasanna *et al.* 2012). Différents genres de champignons mycorhiziens ou non ont de même été co-inoculés avec des PGPR. C'est le cas par exemple de souches d'*Aspergillus*, *Piriformospora* ou *Glomus* (Meena *et al.* 2010; Kohler *et al.* 2010; Khan et Zaidi 2007). Enfin, des formulations à base de différentes PGPR (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*) ont aussi été envisagées et testées mais semblent moins efficaces que celles avec les *Rhizobium* ou des Cyanobactéries (Esitken *et al.* 2006; Felici *et al.* 2008; Sivasakthi *et al.* 2014).

Le maïs est une plante de culture très sensible à la sécheresse et à l'hypoxie, rendant sa production difficile lors de périodes d'inondation ou de sécheresse si l'irrigation et l'arrosage sont limités (Nasrolahzadeh *et al.* 2017). Chaque année, les pertes de rendement dues aux aléas

climatiques et à l'herbivorie sont importantes. De nombreuses études ont réalisé un suivi sur plusieurs années des réponses au manque d'eau de différentes parcelles. Des épisodes de sécheresse sont fréquents, même en Europe, et les restrictions en eau ont des répercussions sur le rendement des céréales (Soubeyroux *et al.* 2012). Žalud *et al.* (2017) a par exemple suivi 4 parcelles en République Tchèque durant 5 années consécutives en estimant la disponibilité en eau du sol. Les précipitations totales d'un mois (juillet) permettaient d'expliquer ici 64% de la variabilité de rendement observée entre les parcelles. Ceci nous conforte sur nos données issues des conditions de champ qui montraient que les conditions environnementales étaient les principaux acteurs de la variabilité morphologique, métabolique et physiologique des plantes. L'inoculation par *A. lipoferum* CRT1 y apparaissait comme un facteur sécurisant la germination, et donc le rendement final. Elle n'y apparaissait pas comme un facteur augmentant la croissance. La co-inoculation de cette souche de PGPR avec un autre microorganisme (bactérie, cyanobactérie ou champignon) ayant une action de stimulation de croissance à un stade plus tardif du développement de la plante serait peut-être une piste à tester pour augmenter le rendement final en absence d'accident climatique, ou pour conserver des rendements similaires en diminuant les apports d'engrais.

4. Perspectives

La suite de ces travaux peut être décrite sur le court terme, mais aussi, dans une vue plus globale, sur le long terme.

Un premier point concerne le développement et la survie d'*A. lipoferum* CRT1 sur des cultivars non-compatible avec la symbiose (ne présentant pas de réponse morphologique à l'agent bactérien). La présence de N-acétylglucosamine et de l'ABA dans l'analyse des grains (Chapitre 5) et l'activation de la transcription d'éléments régulateurs de l'JA dans les feuilles des plantules du cultivar non-compatible avec la symbiose ont éveillé notre soupçon sur le devenir des bactéries ajoutées sur le grain. Si des suivis d'effectifs de populations ont été réalisés sur les racines de cultivars de maïs présentant des réponses morphologiques à l'agent bactérien, ce travail n'a pas encore été fait sur les autres cultivars. Des dénombrements par dilution/étalement et qPCR d'*A. lipoferum* CRT1 sur grains/racines au moment de l'inoculation jusqu'au stade 3 feuilles sont donc prévus assez rapidement dans la suite de ce travail afin de déterminer si une mortalité des bactéries n'est pas à l'origine de l'absence de réponse symbiotique chez les cultivars non-compatible avec la symbiose.

Ensuite, la composition chimique des sèves ascendante et descentante et leur rôle dans le transport de messagers méritent d'être regardés avec plus de détails. Les analyses par GC-APCI-Q-TOF de cette étude (Chapitre 2) ont permis de détecter, de manière qualitative et préliminaire, la présence de phytohormones dans la sève ascendante du maïs. Cette technologie semble prometteuse pour quantifier les teneurs des hormones dans les différents compartiments étudiés dans ces travaux et leur impact dans l'interaction plante/PGPR. Afin de déterminer si un réel signal moléculaire était à l'origine des modifications systémiques dans la plante en réponse à l'inoculation, des expérimentations d'échange de sève peuvent être envisagées. Les feuilles de plantules non-inoculées pourraient être 'nourries' avec la sève récoltée sur des plantules inoculées (et *vice versa*). Suite à l'échange de sève, le rendement quantique de conversion photochimique des plantules pourrait être estimé et des analyses métabolomiques et transcriptomiques du compartiment foliaire réalisées. L'étude de la composition de la sève ascendante peut de même être effectuée sur des plantules ayant reçu une application exogène d'IAA et comparée avec celle faite après inoculation avec *A. lipoferum* CRT1.

Sur du plus long terme, l'inoculation avec *A. lipoferum* CRT1 de mutants sur les voies de signalisation des sucres (saccharose/glucose notamment) ou de phytohormones (auxines) pourrait être envisagée afin d'éclaircir leur implication dans la réponse de la plante à l'inoculation. Des mutations sur des transporteurs de sucres pourraient aussi être ciblées dans ce travail car ils sont connus pour leur importance dans la nutrition des pathogènes ou symbiotes des plantes (Chen 2014; Doidy *et al.* 2012; Williams *et al.* 2000).

L'étude du métabolome des compartiments foliaires et racinaires nous a révélé la présence et le quantité de certains métabolites en tant que résultante de leurs contenus dans plusieurs tissus à un temps t. Afin de déterminer la vitesse réelle d'échange et de modification du contenu chimique des tissus au sein d'un compartiment (notion très importante lorsque nous parlons de signaux moléculaires), il serait intéressant d'utiliser un nouvel outil 'omique', la fluxomique. Ce dernier utilisant des marquages isotopiques et des modèles mathématiques, se prête particulièrement bien à l'analyse de systèmes biologiques tels que le nôtre (Schwender *et al.* 2004; Shachar-Hill 2007). C'est un outil en forte expansion depuis une quinzaine d'années et encore en cours d'optimisation.

Même si de nombreux effets de bio-priming avec des souches de PGPR ont été décrits dans la littérature, celui sur l'accélération de la germination (sortie radicule), et donc de la sécurisation des rendements en champ, n'a été que très peu évoqué et a surtout été bien décrit dans cette étude. Il serait intéressant de screener de nouvelles souches de PGPR issues de la rhizosphère

du maïs spécifiquement sur cette propriété car cela n'a pas été fait. Il serait également intéressant de tester des co-inoculations entre *A. lipoferum* CRT1 et d'autres souches qui semblent avoir un potentiel de phytostimulation à des stades plus avancés du développement végétal car ces mélanges de souches ont potentiellement des effets beaucoup plus importants qu'une souche seule.

Finalement, il est important de noter que toutes les analyses de cette étude ont porté sur la souche commerciale *A. lipoferum* CRT1. Les conclusions qui en sont tirées ne sont donc valables que pour l'interaction entre cette souche de PGPR et le maïs. Or il existe une très grande diversité génétique entre PGPR, et même entre isolats d'*Azospirillum*. Il serait donc intéressant de conduire des études similaires sur d'autres souches d'*Azospirillum* pour mieux comprendre l'interaction entre ce genre bactérien et ses hôtes végétaux.

Références bibliographiques

Abbasi, Samira, Hossein Zahedi, Omid Sadeghipour, et Reza Akbari. 2013. « Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on physiological parameters and nitrogen content of soybean grown under different irrigation regimes (PDF Download Available) ». *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/286171090_Effect_of_plant_growth_promoting_rhizobacteria_PGPR_on_physiological_parameters_and_nitrogen_content_of_soybean_grown_under_different_irrigation_regimes.

Abrahim, Denise, Welligton L. Braguini, Ana M. Kelmer-Bracht, et Emy L. Ishii-Iwamoto. 2000. « Effects of Four Monoterpenes on Germination, Primary Root Growth, and Mitochondrial Respiration of Maize ». *Journal of Chemical Ecology* 26 (3): 611-24. doi:10.1023/A:1005467903297.

Adjanohoun, A., P. A. Noumavo, R. Sikirou, M. Allagbe, H. Gotoechan-Hodonou, K. K. Dossa, B. Yehouenou, R. Glele Kakai, et L. Baba-Moussa. 2012. « Effets Des Rhizobactéries PGPR Sur Le Rendement et Les Teneurs En Macroéléments Du Maïs Sur Sol Ferralitique Non Dégradé Au Sud-Bénin ». *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 6 (1): 279-88. doi:10.4314/ijbcs.v6i1.24.

Ahmad, Farah, Fohad Mabood Husain, et Iqbal Ahmad. 2011. « Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in PGPR Research ». In *Microbes and Microbial Technology*, 363-91. Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4419-7931-5_14.

Ainsworth, Elizabeth A., et Stephen P. Long. 2005. « What Have We Learned from 15 Years of Free-Air CO2 Enrichment (FACE)? A Meta-Analytic Review of the Responses of Photosynthesis, Canopy Properties and Plant Production to Rising CO2 ». *New Phytologist* 165 (2): 351-72. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01224.x.

Alexou, M., et A.D. Peuke. 2013. « Methods for Xylem Sap Collection ». In *Plant Mineral Nutrients*, édité par Frans J.M. Maathuis, 195-207. Methods in Molecular Biology 953. Humana Press. doi:10.1007/978-1-62703-152-3_13.

Ali, Qasim, Muhammad Ashraf, et Farooq Anwar. 2010. « Seed Composition and Seed Oil Antioxidant Activity of Maize Under Water Stress ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87 (10): 1179-87. doi:10.1007/s11746-010-1599-5.

Ali, Shaik Zulfikar, Vardharajula Sandhya, Minakshi Grover, Venkateswar Rao Linga, et Venkateswarlu Bandi. 2011. « Effect of inoculation with a thermotolerant plant growth promoting Pseudomonas putida strain AKMP7 on growth of wheat (Triticum spp.) under heat stress ». *Journal of Plant Interactions* 6 (4): 239-46. doi:10.1080/17429145.2010.545147.

Allwood, J. William, David I. Ellis, et Royston Goodacre. 2008. « Metabolomic Technologies and Their Application to the Study of Plants and Plant–host Interactions ». *Physiologia Plantarum* 132 (2): 117-35. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.01001.x.

Aloni, R., E. Aloni, M. Langhans, et C. I. Ullrich. 2006. « Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism ». *Annals of Botany* 97 (5): 883-93. doi:10.1093/aob/mcl027.

Altieri, Miguel A. 2002. « Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginalenvironments ». http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880902000853.

Alvarez, S, E.L.. Marsh, S.G. Schroeder, et D.P. Schachtman. 2008. « Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought ». *Plant, Cell & Environment* 31 (3): 325–340. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01770.x.

Andersen, Peter C., Brent V. Brodbeck, et Russell F. Mizell. 1989. « Metabolism of Amino Acids, Organic Acids and Sugars Extracted from the Xylem Fluid of Four Host Plants by Adult Homalodisca Coagulata ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 50 (2): 149-59. doi:10.1111/j.1570-7458.1989.tb02384.x.

Anderson, Jonathan P., Ellet Badruzsaufari, Peer M. Schenk, John M. Manners, Olivia J. Desmond, Christina Ehlert, Donald J. Maclean, Paul R. Ebert, et Kemal Kazan. 2004. « Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis ». *The Plant Cell Online* 16 (12): 3460-79. doi:10.1105/tpc.104.025833.

Andersson, Ulrica, Mounia Heddad, et Iwona Adamska. 2003. « Light Stress-Induced One-Helix Protein of the Chlorophyll a/b-Binding Family Associated with Photosystem I ». *Plant Physiology* 132 (2): 811-20. doi:10.1104/pp.102.019281.

Annesley, Thomas M. 2003. « Ion Suppression in Mass Spectrometry ». *ResearchGate* 49 (7): 1041-44. doi:10.1373/49.7.1041.

Antoun, Hani, Chantal J. Beauchamp, Nadia Goussard, Rock Chabot, et Roger Lalande. 1998. « Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium Species as Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Non-Legumes: Effect on Radishes (Raphanus Sativus L.) ». *Plant and Soil* 204 (1): 57-67. doi:10.1023/A:1004326910584.

Antoun, Hani, et Danielle Prévost. 2005. « Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria ». In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, édité par Zaki A. Siddiqui, 1-38. Springer Netherlands. doi:10.1007/1-4020-4152-7_1.

Appelqvist, Ingrid A. M., et Martine R. M. Debet. 1997. « Starch-biopolymer interactions—a review ». *Food Reviews International* 13 (2): 163-224. doi:10.1080/87559129709541105.

Arenas-Huertero, Francisco, Analilia Arroyo, Li Zhou, Jen Sheen, et Patricia León. 2000. « Analysis of Arabidopsis Glucose Insensitive Mutants, Gin5 and Gin6, Reveals a Central Role of the Plant Hormone ABA in the Regulation of Plant Vegetative Development by Sugar ». *Genes & Development* 14 (16): 2085-96. doi:10.1101/gad.14.16.2085.

Arkhipova, T. N., E. Prinsen, S. U. Veselov, E. V. Martinenko, A. I. Melentiev, et G. R. Kudoyarova. 2007. « Cytokinin Producing Bacteria Enhance Plant Growth in Drying Soil ». *Plant and Soil* 292 (1-2): 305-15. doi:10.1007/s11104-007-9233-5.

Arteca, Richard N. 2013. *Plant Growth Substances: Principles and Applications*. Springer Science & Business Media.

Ashraf, M., et M. R. Foolad. 2007. « Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance ». *Environmental and Experimental Botany* 59 (2): 206-16. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.

Ashraf, M., et P. J. C. Harris. 2013. « Photosynthesis under Stressful Environments: An Overview ». *Photosynthetica* 51 (2): 163-90. doi:10.1007/s11099-013-0021-6.

Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J. R. Lawrence, et A. Hartmann. 1995. « In Situ Localization of Azospirillum Brasilense in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, RRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. » *Applied and Environmental Microbiology* 61 (3): 1013-19.

Awasthi, Ashutosh, Nidhi Bharti, Priya Nair, Rakshpal Singh, Ashutosh K. Shukla, Madan M. Gupta, Mahendra P. Darokar, et Alok Kalra. 2011. « Synergistic effect of Glomus mosseae and nitrogen fixing Bacillus subtilis strain Daz26 on artemisinin content in Artemisia annua L. » *Applied Soil Ecology* 49 (septembre): 125-30. doi:10.1016/j.apsoil.2011.06.005.

Azcón, Rosario. 2014. « Mycorrhizosphere: The Role of PGPR ». In *Root Engineering*, édité par Asunción Morte et Ajit Varma, 107-43. Soil Biology 40. Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-54276-3_6.

Babalola, Olubukola Oluranti. 2010. « Beneficial Bacteria of Agricultural Importance ». *Biotechnology Letters* 32 (11): 1559-70. doi:10.1007/s10529-010-0347-0.

Bacelar, Eunice A., José M. Moutinho-Pereira, Berta C. Gonçalves, Helena F. Ferreira, et Carlos M. Correia. 2007. « Changes in growth, gas exchange, xylem hydraulic properties and water use efficiency of three olive cultivars under contrasting water availability regimes ». *Environmental and Experimental Botany* 60 (2): 183-92. doi:10.1016/j.envexpbot.2006.10.003.

Bacon, Mark A., Sally Wilkinson, et William J. Davies. 1998. « PH-Regulated Leaf Cell Expansion in Droughted Plants Is Abscisic Acid Dependent ». *Plant Physiology* 118 (4): 1507-15. doi:10.1104/pp.118.4.1507.

Bahrun, Andi, Christian R. Jensen, Folkard Asch, et Vagn O. Mogensen. 2002. « Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (Zea mays L.) ». *Journal of Experimental Botany* 53 (367): 251-63. doi:10.1093/jexbot/53.367.251.

Bais, Harsh P., Tiffany L. Weir, Laura G. Perry, Simon Gilroy, et Jorge M. Vivanco. 2006. « The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms ». *Annual Review of Plant Biology* 57 (1): 233-66. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.

Baker, Dennis. 2000. « Vascular Transport of Auxins and Cytokinins in Ricinus ». *Plant Growth Regulation* 32 (2-3): 157-60. doi:10.1023/A:1010749411009.

Bal, Himadri Bhusan, Lipika Nayak, Subhasis Das, et Tapan K. Adhya. 2012. « Isolation of ACC Deaminase Producing PGPR from Rice Rhizosphere and Evaluating Their Plant Growth Promoting Activity under Salt Stress ». *Plant and Soil* 366 (1-2): 93-105. doi:10.1007/s11104-012-1402-5.

Barnawal, Deepti, Nidhi Bharti, Deepamala Maji, Chandan Singh Chanotiya, et Alok Kalra. 2012. « 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect Ocimum sanctum plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation ». *Plant Physiology and Biochemistry* 58 (septembre): 227-35. doi:10.1016/j.plaphy.2012.07.008.

Barthes, Laure, Eliane Deléens, Agnès Bousser, Jackson Hoarau, et Jean-Louis Prioul. 1996. « Xylem Exudation Is Related to Nitrate Assimilation Pathway in Detopped Maize Seedlings: Use of Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase Inhibitors as Tools ». *Journal of Experimental Botany* 47 (4): 485-95. doi:10.1093/jxb/47.4.485.

Bashan, Y., J.J. Bustillos, L.A. Leyva, J.-P. Hernandez, et M. Bacilio. 2006. « Increase in Auxiliary Photoprotective Photosynthetic Pigments in Wheat Seedlings Induced by Azospirillum Brasilense ». *Biology and Fertility of Soils* 42 (4): 279-85. doi:10.1007/s00374-005-0025-x.

Bashan, Yoav, et Gina Holguin. 1997. « Azospirillum – plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996) ». *Canadian Journal of Microbiology* 43 (2): 103-21. doi:10.1139/m97-015.

Bashan, Yoav, Gina Holguin, et Luz E. de-Bashan. 2004. « Azospirillum-Plant Relationships: Physiological, Molecular, Agricultural, and Environmental Advances (1997-2003) ». *Canadian Journal of Microbiology* 50 (8): 521-77. doi:10.1139/w04-035.

Baskin, Carol C., et Jerry M. Baskin. 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography, and, Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier.

Bassi, R., G. Høyer-Hansen, R. Barbato, G. M. Giacometti, et D. J. Simpson. 1987. « Chlorophyll-Proteins of the Photosystem II Antenna System. » *Journal of Biological Chemistry* 262 (27): 13333-41.

Bau, H.-M., C. Villaume, V. Chandrasiri, J.-P. Nicolas, et L. Mejean. 1994. « Effet de la germination sur la composition et la valeur nutritive des graines de soja chez le rat ». In *Sciences des aliments*, 14:683-89. Lavoisier. http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3364295.

Bau, Hwei-Ming, Christian Villaume, Jean-Pierre Nicolas, et Luc Méjean. 1997. « Effect of Germination on Chemical Composition, Biochemical Constituents and Antinutritional Factors of Soya Bean (Glycine Max) Seeds ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73 (1): 1-9. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199701)73:1<1::AID-JSFA694>3.0.CO;2-B.

Baudoin, Ezékiel, Sylvie Nazaret, Christophe Mougel, Lionel Ranjard, et Yvan Moënne-Loccoz. 2009. « Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR Azospirillum lipoferum CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize ». *Soil Biology and Biochemistry* 41 (2): 409-13. doi:10.1016/j.soilbio.2008.10.015.

Belimov, Andrey A., Ian C. Dodd, Nikos Hontzeas, Julian C. Theobald, Vera I. Safronova, et William J. Davies. 2009. « Rhizosphere Bacteria Containing 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Increase Yield of Plants Grown in Drying Soil via Both Local and Systemic Hormone Signalling ». *New Phytologist* 181 (2): 413-23. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02657.x.

Bent, Elizabeth. 2006. « Induced Systemic Resistance Mediated by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Fungi (PGPF) ». In *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*, 225-58. Springer, Boston, MA. doi:10.1007/0-387-23266-4_10.

Bentsink, Leónie, et Maarten Koornneef. 2008. « Seed Dormancy and Germination ». *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 6 (décembre). doi:10.1199/tab.0119.

Berg, Gabriele. 2009. « Plant–microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (1): 11-18. doi:10.1007/s00253-009-2092-7.

Berg, Gabriele, Christin Zachow, Henry Müller, Jörg Philipps, et Ralf Tilcher. 2013. « Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture ». *Agronomy* 3 (4): 648-56. doi:10.3390/agronomy3040648.

Bernal-Lugo, Irma, et A. Carl Leopold. 1992. « Changes in Soluble Carbohydrates during Seed Storage ». *Plant Physiology* 98 (3): 1207-10. doi:10.1104/pp.98.3.1207.

Beulin, Xavier. 2017. « Notre agriculture est en danger - Editions Tallandier ». https://www.tallandier.com/livre-9791021019539.htm.

Bewley, JD. 1997. « Seed Germination and Dormancy. » *The Plant Cell* 9 (7): 1055-66.

Bharti, Nidhi, Deepti Yadav, Deepti Barnawal, Deepamala Maji, et Alok Kalra. 2012. « Exiguobacterium Oxidotolerans, a Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Improves Yield and Content of Secondary Metabolites in Bacopa Monnieri (L.) Pennell under Primary and Secondary Salt Stress ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (2): 379-87. doi:10.1007/s11274-012-1192-1.

Bhattacharyya, P. N., et D. K. Jha. 2011. « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (4): 1327-50. doi:10.1007/s11274-011-0979-9.

Bodirsky, B. L., A. Popp, I. Weindl, J. P. Dietrich, S. Rolinski, L. Scheiffele, C. Schmitz, et H. Lotze-Campen. 2012. « N2O emissions from the global agricultural nitrogen cycle – current state and future scenarios ». *Biogeosciences* 9 (10): 4169-97. doi:10.5194/bg-9-4169-2012.

Bodirsky, Benjamin Leon, et Christoph Müller. 2014. « Robust Relationship between Yields and Nitrogen Inputs Indicates Three Ways to Reduce Nitrogen Pollution ». *Environmental Research Letters* 9 (11): 111005. doi:10.1088/1748-9326/9/11/111005.

Booker, Katherine S., John Schwarz, Michelle B. Garrett, et Alan M. Jones. 2010. « Glucose Attenuation of Auxin-Mediated Bimodality in Lateral Root Formation Is Partly Coupled by the Heterotrimeric G Protein Complex ». *PLOS ONE* 5 (9): e12833. doi:10.1371/journal.pone.0012833.

Bottini, Rubén, Fabricio Cassán, et Patricia Piccoli. 2004. « Gibberellin Production by Bacteria and Its Involvement in Plant Growth Promotion and Yield Increase ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (5): 497-503. doi:10.1007/s00253-004-1696-1.

Bowling, D. J. F., B. T. Watson, et R. Ehwald. 1985. « The Effect of Phloem Ringing on Root Growth and Potassium Uptake by Helianthus Annuus ». *Journal of Experimental Botany* 36 (2): 290-97. doi:10.1093/jxb/36.2.290.

Braun, David M., Yi Ma, Noriko Inada, Michael G. Muszynski, et R. Frank Baker. 2006. « Tie-Dyed1 Regulates Carbohydrate Accumulation in Maize Leaves ». *Plant Physiology* 142 (4): 1511-22. doi:10.1104/pp.106.090381.

Broek, A. V., S. Dobbelaere, J. Vanderleyden, et A. Vandommelen. 2000. « Azospirillum-Plant Root Interactions: Signaling and Metabolic Interactions. » *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process.*, 761-77.

Brown, M., W. B. Dunn, P. Dobson, Y. Patel, C. L. Winder, S. Francis-McIntyre, P. Begley, *et al.* 2009. « Mass Spectrometry Tools and Metabolite-Specific Databases for Molecular Identification in Metabolomics » 134 (7): 1322-32. doi:10.1039/B901179J.

Brusamarello-Santos, Liziane Cristina, Françoise Gilard, Lenaïg Brulé, Isabelle Quilleré, Benjamin Gourion, Pascal Ratet, Emanuel Maltempi de Souza, Peter J. Lea, et Bertrand Hirel. 2017. « Metabolic profiling of two maize (Zea mays L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria Herbaspirillum seropedicae and Azospirillum brasilense ». *PLOS ONE* 12 (3): e0174576. doi:10.1371/journal.pone.0174576.

Buhtz, Anja, Anna Kolasa, Kathleen Arlt, Christina Walz, et Julia Kehr. 2004. « Xylem Sap Protein Composition Is Conserved among Different Plant Species ». *Planta* 219 (4): 610-18. doi:10.1007/s00425-004-1259-9.

Caffall, Kerry Hosmer, et Debra Mohnen. 2009. « The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides ». *Carbohydrate Research*, Pectin: Structure and Function, 344 (14): 1879-1900. doi:10.1016/j.carres.2009.05.021.

Canny, M. J., et M. E. Mccully. 1988. « The Xylem Sap of Maize Roots: Its Collection, Composition and Formation ». *Functional Plant Biology* 15 (4): 557-66. doi:10.1071/pp9880557.

Cappellari, Lorena del Rosario, Maricel Valeria Santoro, Fiorela Nievas, Walter Giordano, et Erika Banchio. 2013. « Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria ». *Applied Soil Ecology* 70: 16-22. doi:10.1016/j.apsoil.2013.04.001.

Carmo-Silva, Ana E., Stephen J. Powers, Alfred J. Keys, Maria Celeste Arrabaça, et Martin a. J. Parry. 2008. « Photorespiration in C4 Grasses Remains Slow under Drought Conditions ». *Plant, Cell & Environment* 31 (7): 925-40. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01805.x.

Cassán, Fabricio, Diego Perrig, Verónica Sgroy, Oscar Masciarelli, Claudio Penna, et Virginia Luna. 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*, Ecology and application of Azospirillum and other plant growth promoting bacteria (PGPB), 45 (1): 28-35. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005.

Cassán, Fabricio, Jos Vanderleyden, et Stijn Spaepen. 2013. « Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus Azospirillum ». *Journal of Plant Growth Regulation* 33 (2): 440-59. doi:10.1007/s00344-013-9362-4.

Cassman, K. G., S. Peng, D. C. Olk, J. K. Ladha, W. Reichardt, A. Dobermann, et U. Singh. 1998. « Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems ». *Field Crops Research*, Nutrient Use Efficiency in Rice Cropping Systems, 56 (1–2): 7-39. doi:10.1016/S0378-4290(97)00140-8.

Cevallos-Cevallos, Juan M., José I. Reyes-De-Corcuera, Edgardo Etxeberria, Michelle D. Danyluk, et Gary E. Rodrick. 2009. « Metabolomic analysis in food science: a review ». *Trends in Food Science & Technology* 20 (11–12): 557-66. doi:10.1016/j.tifs.2009.07.002.

Chamam, Amel, Hervé Sanguin, Floriant Bellvert, Guillaume Meiffren, Gilles Comte, Florence Wisniewski-Dyé, Cédric Bertrand, et Claire Prigent-Combaret. 2013. « Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the Azospirillum–Oryza sativa association ». *Phytochemistry* 87 (mars): 65-77. doi:10.1016/j.phytochem.2012.11.009.

Chang, Yao-Ming, Wen-Yu Liu, Arthur Chun-Chieh Shih, Meng-Ni Shen, Chen-Hua Lu, Mei-Yeh Jade Lu, Hui-Wen Yang, *et al.* 2012. « Characterizing Regulatory and Functional Differentiation between Maize Mesophyll and Bundle Sheath Cells by Transcriptomic Analysis ». *Plant Physiology* 160 (1): 165-77. doi:10.1104/pp.112.203810.

Chaparro, Jacqueline M., Dayakar V. Badri, Matthew G. Bakker, Akifumi Sugiyama, Daniel K. Manter, et Jorge M. Vivanco. 2013. « Root Exudation of Phytochemicals in Arabidopsis Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions ». *PLOS ONE* 8 (2): e55731. doi:10.1371/journal.pone.0055731.

Chaves, M. M., et M. M. Oliveira. 2004. « Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture ». *Journal of Experimental Botany* 55 (407): 2365-84. doi:10.1093/jxb/erh269.

Chaves, M. M., J. S. Pereira, J. Maroco, M. L. Rodrigues, C. P. P. Ricardo, M. L. Osório, I. Carvalho, T. Faria, et C. Pinheiro. 2002. « How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth ». *Annals of Botany* 89 (7): 907-16. doi:10.1093/aob/mcf105.

Chen, Li-Qing. 2014. « SWEET Sugar Transporters for Phloem Transport and Pathogen Nutrition ». *New Phytologist* 201 (4): 1150-55. doi:10.1111/nph.12445.

Cho, Ilseung, et Martin J. Blaser. 2012. « The Human Microbiome: At the Interface of Health and Disease ». *Nature Reviews Genetics* 13 (4): 260-70. doi:10.1038/nrg3182.

Cho, Song Mi, Su Hyun Kim, Young Cheol Kim, Kwang Yeol Yang, Kwang Sang Kim, Yong Soo Choi, et Baik Ho Cho. 2010. « Galactinol is Involved in Induced Systemic Resistance against Bacterial Infection and Environmental Stresses ». *Korean Journal of Plant Resources*. juin. http://www.dbpia.co.kr.

Choudhary, Devendra K., Anil Prakash, et B. N. Johri. 2007. « Induced Systemic Resistance (ISR) in Plants: Mechanism of Action ». *Indian Journal of Microbiology* 47 (4): 289-97. doi:10.1007/s12088-007-0054-2.

Choudhury, N. K., et R. K. Behera. 2001. « Photoinhibition of Photosynthesis: Role of Carotenoids in Photoprotection of Chloroplast Constituents ». *Photosynthetica* 39 (4): 481-88. doi:10.1023/A:1015647708360.

Chunhaleuchanon, S. 2008. « SCREENING OF RHIZOBACTERIA FOR THEIR PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITIES ». *KMITL SCIENCE AND TECHNOLOGY JOURNAL* 8 (1). https://www.tci-thaijo.org/index.php/kmitlstj/article/view/86545.

Cohen, Ana C., Rubén Bottini, et Patricia N. Piccoli. 2007. « Azospirillum Brasilense Sp 245 Produces ABA in Chemically-Defined Culture Medium and Increases ABA Content in Arabidopsis Plants ». *Plant Growth Regulation* 54 (2): 97-103. doi:10.1007/s10725-007-9232-9.

Cohen, Ana C., Rubén Bottini, Mariela Pontin, Federico J. Berli, Daniela Moreno, Hernán Boccanlandro, Claudia N. Travaglia, et Patricia N. Piccoli. 2015. « Azospirillum Brasilense Ameliorates the Response of Arabidopsis Thaliana to Drought Mainly via Enhancement of ABA Levels ». *Physiologia Plantarum* 153 (1): 79-90. doi:10.1111/ppl.12221.

Coll-Garcia, Danahe, Jeannine Mazuch, Thomas Altmann, et Carsten Müssig. 2004. « EXORDIUM Regulates Brassinosteroid-Responsive Genes ». *FEBS Letters* 563 (1-3): 82-86. doi:10.1016/S0014-5793(04)00255-8.

Collino, Sebastiano, François-Pierre J. Martin, et Serge Rezzi. 2013. « Clinical Metabolomics Paves the Way towards Future Healthcare Strategies ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 75 (3): 619-29. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04216.x.

Costacurta, Antonia, Veerle Keijers, et Jos Vanderleyden. 1994. « Molecular Cloning and Sequence Analysis of an Azospirilium Brasilense Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene ». *Molecular and General Genetics MGG* 243 (4): 463-72. doi:10.1007/BF00280477.

Couillerot, O., C. Prigent-Combaret, J. Caballero-Mellado, et Y. Moënne-Loccoz. 2009. « Pseudomonas Fluorescens and Closely-Related Fluorescent Pseudomonads as Biocontrol Agents of Soil-Borne Phytopathogens ». *Letters in Applied Microbiology* 48 (5): 505-12. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02566.x.

Couillerot, Olivier, Marie-Lara Bouffaud, Ezékiel Baudoin, Daniel Muller, Jesus Caballero-Mellado, et Yvan Moënne-Loccoz. 2010. « Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain Azospirillum lipoferum CRT1 on maize seedlings ». *Soil Biology and Biochemistry* 42 (12): 2298-2305. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.003.

Cramer, M. D., et O. a. M. Lewis. 1993. « The Influence of Nitrate and Ammonium Nutrition on the Growth of Wheat (Triticum Aestivum) and Maize (Zea Mays) Plants ». *Annals of Botany* 72 (4): 359-65. doi:10.1006/anbo.1993.1119.

Croes, Chris L., Sara Moens, Els van Bastelaere, Jos Vanderleyden, et Kris W. Michiels. 1993. « The polar flagellum mediates Azospirillum brasilense adsorption to wheat roots ». *Microbiology* 139 (9): 2261-69. doi:10.1099/00221287-139-9-2261.

Curzi, M. J., C. M. Ribaudo, G. D. Trinchero, J. A. Curá, et E. A. Pagano. 2008. « Changes in the content of organic and amino acids and ethylene production of rice plants in response to the inoculation with Herbaspirillum seropedicae ». *Journal of Plant Interactions* 3 (3): 163-73. doi:10.1080/17429140802255167.

Jones, D. L., Farrar, J. 2003. « Associative Nitrogen Fixation and Root Exudation - What is Theoretically Possible in the Rhizosphere? » *Symbiosis 35 (2003) 1-3* 35 (1).

Dalby, A., et C. Y. Tsai. 1976. « Lysine and Tryptophan Increases during Germination of Cereal Grains ». *Cereal Chemistry (USA)*. http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US7613824.

Davies, William J., Mark A. Bacon, D. Stuart Thompson, Wagdy Sobeih, et Luís González Rodríguez. 2000. « Regulation of Leaf and Fruit Growth in Plants Growing in Drying Soil: Exploitation of the Plants' Chemical Signalling System and Hydraulic Architecture to Increase the Efficiency of Water Use in Agriculture ». *Journal of Experimental Botany* 51 (350): 1617-26. doi:10.1093/jexbot/51.350.1617.

Degenhardt, Birgit, et Hartmut Gimmler. 2000. « Cell Wall Adaptations to Multiple Environmental Stresses in Maize Roots ». *Journal of Experimental Botany* 51 (344): 595-603. doi:10.1093/jexbot/51.344.595.

Demmig, Barbara, et Olle Björkman. 1987. « Comparison of the Effect of Excessive Light on Chlorophyll Fluorescence (77K) and Photon Yield of O2 Evolution in Leaves of Higher Plants ». *Planta* 171 (2): 171-84. doi:10.1007/BF00391092.

Dettenmaier, Erik M., William J. Doucette, et Bruce Bugbee. 2009. « Chemical Hydrophobicity and Uptake by Plant Roots ». *Environmental Science & Technology* 43 (2): 324-29. doi:10.1021/es801751x.

Díaz-Zorita, Martín, et María Virginia Fernández-Canigia. 2009. « Field performance of a liquid formulation of Azospirillum brasilense on dryland wheat productivity ». *European Journal of Soil Biology*, Ecology and application of Azospirillum and other plant growth promoting bacteria (PGPB), 45 (1): 3-11. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.07.001.

Dimkpa, Christian, Tanja Weinand, et Folkard Asch. 2009. « Plant–rhizobacteria Interactions Alleviate Abiotic Stress Conditions ». *Plant, Cell & Environment* 32 (12): 1682-94. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x.

Dobbelaere, Sofie, Anja Croonenborghs, Amber Thys, Ann Vande Broek, et Jos Vanderleyden. 1999. « Phytostimulatory Effect of Azospirillum Brasilense Wild Type and Mutant Strains Altered in IAA Production on Wheat ». *Plant and Soil* 212 (2): 153-62. doi:10.1023/A:1004658000815.

Doidy, Joan, Emily Grace, Christina Kühn, Françoise Simon-Plas, Leonardo Casieri, et Daniel Wipf. 2012. « Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi ». *Trends in Plant Science* 17 (7): 413-22. doi:10.1016/j.tplants.2012.03.009.

Dong, Hezhong, Yuehua Niu, Weijiang Li, et Dongmei Zhang. 2008. « Effects of Cotton Rootstock on Endogenous Cytokinins and Abscisic Acid in Xylem Sap and Leaves in Relation to Leaf Senescence ». *Journal of Experimental Botany* 59 (6): 1295-1304. doi:10.1093/jxb/ern035.

Doussan, Claude, Loïc Pagès, et Alain Pierret. 2003. « Soil exploration and resource acquisition by plant roots: an architectural and modelling point of view ». *Agronomie* 23 (5-6): 419-31. doi:10.1051/agro:2003027.

Drogue, Benoît, Hugo Doré, Stéphanie Borland, Florence Wisniewski-Dyé, et Claire Prigent-Combaret. 2012. « Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? » *Research in Microbiology* 163 (8): 500-510. doi:10.1016/j.resmic.2012.08.006.

Drogue, Benoît, Hervé Sanguin, Amel Chamam, Michael Mozar, Christel Llauro, Olivier Panaud, Claire Prigent-Combaret, Nathalie Picault, et Florence Wisniewski-Dyé. 2014. « Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during Azospirillum-rice cooperation ». *Frontiers in Plant Science* 5 (novembre). doi:10.3389/fpls.2014.00607.

Du, Wensheng, James R. Brown, Daniel R. Sylvester, Jianzhong Huang, Alison F. Chalker, Chi Y. So, David J. Holmes, David J. Payne, et Nicola G. Wallis. 2000. « Two Active Forms of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase in Gram-Positive Bacteria ». *Journal of Bacteriology* 182 (15): 4146-52. doi:10.1128/JB.182.15.4146-4152.2000.

Dure, Leon S. 1960. « Site of Origin and Extent of Activity of Amylases in Maize Germination 12 ». *Plant Physiology* 35 (6): 925-34.

Dursun, Atilla, Ertan Yildrim, Melek Ekinci, Raziye Kul, et Fazilet P. Karagöz. 2017. « Nitrogen fertilization and plant growth promoting rhizobacteria treatments affected amino acid content of cabbage ». *AIP Conference Proceedings* 1833 (1): 020061. doi:10.1063/1.4981709.

Dutta, Swarnalee, et Appa Rao Podile. 2010. « Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone ». *Critical Reviews in Microbiology* 36 (3): 232-44. doi:10.3109/10408411003766806.

Ebel, Robert C., Xiangrong Duan, et Robert M. Augé. 1995. « Xylem Sap Abscisic Acid Concentrations and Stomatal Conductance in Mycorrhizal Cowpea ». *HortScience* 30 (4): 838-838.

Edgington, L. V. 1981. « Structural Requirements of Systemic Fungicides ». *Annual Review of Phytopathology* 19 (1): 107-24. doi:10.1146/annurev.py.19.090181.000543.

Egorenkova, I. V., S. A. Konnova, I. M. Skvortsov, et V. V. Ignatov. 2000. « Investigation of the Initial Stages of Interaction of the BacteriumAzospirillum Brasilense with Wheat Seedling Roots: Adsorption and Root Hair Deformation ». *Microbiology* 69 (1): 103-8. doi:10.1007/BF02757265.

El Zemrany, Hamdy, Jérôme Cortet, Matthias Peter Lutz, André Chabert, Ezékiel Baudoin, Jacqueline Haurat, Nicolas Maughan, *et al.* 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 Biology and Biochemistry* 38 (7): 1712-26. doi:10.1016/j.soilbio.2005.11.025.

El Zemrany, Hamdy, Sonia Czarnes, Paul D. Hallett, Serge Alamercery, René Bally, et Lucile Jocteur Monrozier. 2007. « Early Changes in Root Characteristics of Maize (Zea Mays) Following Seed Inoculation with the PGPR Azospirillum Lipoferum CRT1 ». *Plant and Soil* 291 (1-2): 109-18. doi:10.1007/s11104-006-9178-0.

Else, M. A., K. C. Hall, G. M. Arnold, W. J. Davies, et M. B. Jackson. 1995. « Export of Abscisic Acid, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid, Phosphate, and Nitrate from Roots to Shoots of Flooded Tomato Plants (Accounting for Effects of Xylem Sap Flow Rate on Concentration and Delivery) ». *Plant Physiology* 107 (2): 377-84. doi:10.1104/pp.107.2.377.

Engels, C., L. Munkle, et H. Marschner. 1992. « Effect of Root Zone Temperature and Shoot Demand on Uptake and Xylem Transport of Macronutrients in Maize (Zea Mays L.) ». *Journal of Experimental Botany* 43 (4): 537-47. doi:10.1093/jxb/43.4.537.

Esitken, Ahmet, Lutfi Pirlak, Metin Turan, et Fikrettin Sahin. 2006. « Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry ». *Scientia Horticulturae* 110 (4): 324-27. doi:10.1016/j.scienta.2006.07.023.

Estrada, Beatriz, José Miguel Barea, Ricardo Aroca, et Juan Manuel Ruiz-Lozano. 2013. « A Native Glomus Intraradices Strain from a Mediterranean Saline Area Exhibits Salt Tolerance and Enhanced Symbiotic Efficiency with Maize Plants under Salt Stress Conditions ». *Plant and Soil* 366 (1-2): 333-49. doi:10.1007/s11104-012-1409-y.

Fages, J., et D. Mulard. 1988. « Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez Zea mays ». *Agronomie* 8 (4): 309-14.

Fallik, Elazar, Yaacov Okon, et Meir Fischer. 1988. « Growth response of maize roots to Azospirillum inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation ». *Soil Biology and Biochemistry* 20 (1): 45-49. doi:10.1016/0038-0717(88)90125-3.

Fan, Xiao-Hui, Shou-An Zhang, Xiao-Dan Mo, Yun-Cong Li, Yu-Qing Fu, et Zhi-Guang Liu. 2017. « Effect of PGPR and N Source on Plant Growth and N, P Uptake by Tomato Grown in Calcareous Soils ». *Pedosphere*, août. doi:10.1016/S1002-0160(17)60379-5.

Farag, Mohamed A., Huiming Zhang, et Choong-Min Ryu. 2013. « Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles ». *Journal of Chemical Ecology* 39 (7): 1007-18. doi:10.1007/s10886-013-0317-9.

Faramarzi, Ali, Mohammad Ali Pourgorban, Mohammad Hossein Ansari, et Reza Taghizadeh. 2012. « The effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on the yield and yield components of grain corn (Zea mays L.) in Astara, Iran ». *Journal of Food Agriculture and Environment* 10 (janvier): 299-301.

Felici, Cristiana, Lorenzo Vettori, Enrico Giraldi, Laura Maria Costantina Forino, Annita Toffanin, Anna Maria Tagliasacchi, et Marco Nuti. 2008. « Single and co-inoculation of Bacillus subtilis and Azospirillum brasilense on Lycopersicon esculentum: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community ». *Applied Soil Ecology* 40 (2): 260-70. doi:10.1016/j.apsoil.2008.05.002.

Fernandez, Olivier, Andreas Theocharis, Sophie Bordiec, Regina Feil, Lucile Jacquens, Christophe Clément, Florence Fontaine, et Essaid Ait Barka. 2012. « Burkholderia phytofirmans PsJN Acclimates Grapevine to Cold by Modulating Carbohydrate Metabolism ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25 (4): 496-504. doi:10.1094/MPMI-09-11-0245.

Fernandez, Olivier, Lies Vandesteene, Regina Feil, Fabienne Baillieul, John Edward Lunn, et Christophe Clément. 2012. « Trehalose Metabolism Is Activated upon Chilling in Grapevine and Might Participate in Burkholderia Phytofirmans Induced Chilling Tolerance ». *Planta* 236 (2): 355-69. doi:10.1007/s00425-012-1611-4.

Fernandez-Garcia, N., M. Hernandez, J. Casada-Vela, R. Bru, F. Elortza, P. Hedden, et E. Olmos. 2011. « Changes to the proteome and targeted metabolites of xylem sap in Brassica oleracea in response to salt stress ». *Plant, Cell & Environment* 34 (5): 821–836. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02285.x.

Feussner, Ivo, et Andrea Polle. 2015. « What the transcriptome does not tell — proteomics and metabolomics are closer to the plants' patho-phenotype ». *Current Opinion in Plant Biology* 26 (août): 26-31. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.023.

Fichot, Régis, Françoise Laurans, Romain Monclus, Alain Moreau, Gilles Pilate, et Franck Brignolas. 2009. « Xylem Anatomy Correlates with Gas Exchange, Water-Use Efficiency and Growth Performance under Contrasting Water Regimes: Evidence from Populus Deltoides × Populus Nigra Hybrids ». *Tree Physiology* 29 (12): 1537-49. doi:10.1093/treephys/tpp087.

Fiehn, Oliver. 2002. « Metabolomics – the Link between Genotypes and Phenotypes ». *Plant Molecular Biology* 48 (1-2): 155-71. doi:10.1023/A:1013713905833.

Fiehn, Oliver, Joachim Kopka, Richard N. Trethewey, et Lothar Willmitzer. 2000. « Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry ». *Analytical Chemistry* 72 (15): 3573-80. doi:10.1021/ac991142i.

Francis, C., G. Lieblein, S. Gliessman, T. A. Breland, N. Creamer, R. Harwood, L. Salomonsson, *et al.* 2003. « Agroecology: The Ecology of Food Systems ». *Journal of Sustainable Agriculture* 22 (3): 99-118. doi:10.1300/J064v22n03_10.

Freundl, Elenor, Ernst Steudle, et Wolfram Hartung. 1998. « Water Uptake by Roots of Maize and Sunflower Affects the Radial Transport of Abscisic Acid and Its Concentration in the Xylem ». *Planta* 207 (1): 8-19. doi:10.1007/s004250050450.

Fristedt, Rikard, Rosalind Williams-Carrier, Sabeeha S. Merchant, et Alice Barkan. 2014. « A Thylakoid Membrane Protein Harboring a DnaJ-Type Zinc Finger Domain Is Required for Photosystem I Accumulation in Plants ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (44): 30657-67. doi:10.1074/jbc.M114.587758.

Fukushima, Atsushi, Miyako Kusano, Henning Redestig, Masanori Arita, et Kazuki Saito. 2009. « Integrated omics approaches in plant systems biology ». *Current Opinion in Chemical Biology*, Omics/Biopolymers/Model Systems, 13 (5–6): 532-38. doi:10.1016/j.cbpa.2009.09.022.

Furbank, Robert T., et Marshall D. Hatch. 1987. « Mechanism of C4 Photosynthesis The Size and Composition of the Inorganic Carbon Pool in Bundle Sheath Cells ». *Plant Physiology* 85 (4): 958-64. doi:10.1104/pp.85.4.958.

García de Salamone, Ines E, Russell K Hynes, et Louise M Nelson. 2001. « Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants ». *Canadian Journal of Microbiology* 47 (5): 404-11. doi:10.1139/w01-029.

Garvin, Naho, William J. Doucette, et Jason C. White. 2015. « Investigating differences in the root to shoot transfer and xylem sap solubility of organic compounds between zucchini, squash and soybean using a pressure chamber method ». *Chemosphere*. Consulté le janvier 6. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.075.

Gehlenborg, Nils, Seán I. O'Donoghue, Nitin S. Baliga, Alexander Goesmann, Matthew A. Hibbs, Hiroaki Kitano, Oliver Kohlbacher, *et al.* 2010. « Visualization of Omics Data for Systems Biology ». *Nature Methods* 7 (janvier): S56-68. doi:10.1038/nmeth.1436.

Ghannoum, Oula. 2009. « C4 Photosynthesis and Water Stress ». *Annals of Botany* 103 (4): 635-44. doi:10.1093/aob/mcn093.

Gholami A., Shahsavani. S., 2008. « The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of Maize ». *World Acad Sci Eng Technol* 49 (1).

Gillaspy, G. E., J. S. Keddie, K. Oda, et W. Gruissem. 1995. « Plant Inositol Monophosphatase Is a Lithium-Sensitive Enzyme Encoded by a Multigene Family. » *The Plant Cell* 7 (12): 2175-85. doi:10.1105/tpc.7.12.2175.

Glick, Bernard R. 2005. « Modulation of Plant Ethylene Levels by the Bacterial Enzyme ACC Deaminase ». *FEMS Microbiology Letters* 251 (1): 1-7. doi:10.1016/j.femsle.2005.07.030.

Glick, Bernard R. 2014. « Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world ». *Microbiological Research*, Special Issue on Plant Growth Promotion., 169 (1): 30-39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009.

Goldschmidt, Eliezer E., et Steven C. Huber. 1992. « Regulation of Photosynthesis by End-Product Accumulation in Leaves of Plants Storing Starch, Sucrose, and Hexose Sugars ». *Plant Physiology* 99 (4): 1443-48. doi:10.1104/pp.99.4.1443.

Gollan, T., U. Schurr, et E.-D. Schulze. 1992. « Stomatal Response to Drying Soil in Relation to Changes in the Xylem Sap Composition of Helianthus Annuus. I. The Concentration of Cations, Anions, Amino Acids in, and PH of, the Xylem Sap ». *Plant, Cell & Environment* 15 (5): 551-59. doi:10.1111/j.1365-3040.1992.tb01488.x.

Gong, Fangping, Le Yang, Fuju Tai, Xiuli Hu, et Wei Wang. 2014. « "Omics" of Maize Stress Response for Sustainable Food Production: Opportunities and Challenges ». *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 18 (12): 714-32. doi:10.1089/omi.2014.0125.

Goodacre, Royston, Seetharaman Vaidyanathan, Warwick B. Dunn, George G. Harrigan, et Douglas B. Kell. 2004. « Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data ». *Trends in Biotechnology* 22 (5): 245-52. doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.007.

Goodger, Jason Q. D., Robert E. Sharp, Ellen L. Marsh, et Daniel P. Schachtman. 2005. « Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques ». *Journal of Experimental Botany* 56 (419): 2389-2400. doi:10.1093/jxb/eri231.

Gopal, Murali, et Alka Gupta. 2016. « Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies ». *Frontiers in Microbiology* 7 (décembre). doi:10.3389/fmicb.2016.01971.

Goswami, Dweipayan, Janki N. Thakker, et Pinakin C. Dhandhukia. 2016. « Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review ». *Cogent Food & Agriculture* 2 (1): 1127500. doi:10.1080/23311932.2015.1127500.

Grabherr, Mg, Haas Bj, Yassour M, Levin Jz, Thompson Da, Amit I, Adiconis X, *et al.* 2011. « Full-Length Transcriptome Assembly from RNA-Seq Data without a Reference Genome., Trinity: Reconstructing a Full-Length Transcriptome without a Genome from RNA-Seq Data ». *Nature Biotechnology, Nature Biotechnology* 29, 29 (7, 7): 644, 644-52. doi:10.1038/nbt.1883, 10.1038/nbt.1883.

Grassi, G., P. Millard, R. Wendler, G. Minotta, et M. Tagliavini. 2002. « Measurement of Xylem Sap Amino Acid Concentrations in Conjunction with Whole Tree Transpiration Estimates Spring N Remobilization by Cherry (Prunus Avium L.) Trees ». *Plant, Cell & Environment* 25 (12): 1689-99. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00949.x.

Gray, E. J., et D. L. Smith. 2005. « Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes ». *Soil Biology and Biochemistry* 37 (3): 395-412. doi:10.1016/j.soilbio.2004.08.030.

Green, B. R., E. Pichersky, et K. Kloppstech. 1991. « Chlorophyll a/b-Binding Proteins: An Extended Family ». *Trends in Biochemical Sciences* 16 (5): 181-86.

Griffon, Michel. 2013. *Qu'est-ce que l'agriculture écologiquement intensive ?* Quae.

Gururani, Mayank Anand, Chandrama Prakash Upadhyaya, Venkidasamy Baskar, Jelli Venkatesh, Akula Nookaraju, et Se Won Park. 2012. « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Abiotic Stress Tolerance in Solanum Tuberosum Through Inducing Changes in the Expression of ROS-Scavenging Enzymes and Improved Photosynthetic Performance ». *Journal of Plant Growth Regulation* 32 (2): 245-58. doi:10.1007/s00344-012-9292-6.

Haber, Alan H., et Helen J. Luippold. 1960. « Separation of Mechanisms Initiating Cell Division and Cell Expansion in Lettuce Seed Germination 1 ». *Plant Physiology* 35 (2): 168-73.

Habib, Sheikh Hasna, Hossain Kausar, et Halimi Mohd Saud. 2016. « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes ». *BioMed Research International* 2016 (janvier): e6284547. doi:10.1155/2016/6284547.

Hacke, Uwe G., et John S. Sperry. 2001. « Functional and ecological xylem anatomy ». *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 4 (2): 97-115. doi:10.1078/1433-8319-00017.

Hacke, Uwe G., John S. Sperry, et Jarmila Pittermann. 2004. « Analysis of Circular Bordered Pit Function II. Gymnosperm Tracheids with Torus-Margo Pit Membranes ». *American Journal of Botany* 91 (3): 386-400. doi:10.3732/ajb.91.3.386.

Hansen, Hauke, et Karl Dörffling. 1999. « Changes of Free and Conjugated Abscisic Acid and Phaseic Acid in Xylem Sap of Drought-Stressed Sunflower Plants ». *Journal of Experimental Botany* 50 (339): 1599-1605. doi:10.1093/jxb/50.339.1599.

Hardy, P. J., et J. V. Possingham. 1969. « Studies on Translocation of Metabolites in the Xylem of Grapevine Shoots ». *Journal of Experimental Botany* 20 (2): 325-35. doi:10.1093/jxb/20.2.325.

Hare, P. D., et W. A. Cress. 1997. « Metabolic Implications of Stress-Induced Proline Accumulation in Plants ». *Plant Growth Regulation* 21 (2): 79-102. doi:10.1023/A:1005703923347.

Hartmann, Anton, Michael Rothballer, et Michael Schmid. 2007. « Lorenz Hiltner, a Pioneer in Rhizosphere Microbial Ecology and Soil Bacteriology Research ». *Plant and Soil* 312 (1-2): 7-14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z.

Hatch, Marshall D. 1987. « C4 photosynthesis: a unique elend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 895 (2): 81-106. doi:10.1016/S0304-4173(87)80009-5.

Heidari, Mostafa, Sayed Mohsen Mousavinik, et Amir Golpayegani. 2011. « Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) effect on physiological parameters and mineral uptake in basil (Ociumum basilicm L.) under water stress ». https://www.researchgate.net/publication/285249986_Plant_growth_promoting_rhizobacteria_PGPR_effect_on_physiological_parameters_and_mineral_uptake_in_basil_Ociumum_basilicm_L_under_water_stress.

Heinrich, D., et D. Hess. 1985. « Chemotactic attraction of Azospirillum lipoferum by wheat roots and characterization of some attractants ». *Canadian Journal of Microbiology* 31 (1): 26-31. doi:10.1139/m85-007.

Hématy, Kian, Candice Cherk, et Shauna Somerville. 2009. « Host–pathogen warfare at the plant cell wall ». *Current Opinion in Plant Biology*, Biotic Interactions, 12 (4): 406-13. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.007.

Herridge, David F., Mark B. Peoples, et Robert M. Boddey. 2008. « Global Inputs of Biological Nitrogen Fixation in Agricultural Systems ». *Plant and Soil* 311 (1-2): 1-18. doi:10.1007/s11104-008-9668-3.

Heuer, Bruria. 2003. « Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants ». *Plant Science* 165 (4): 693-99. doi:10.1016/S0168-9452(03)00222-X.

Hincha, Dirk K., Carmen Espinoza, et Ellen Zuther. 2012. « Transcriptomic and Metabolomic Approaches to the Analysis of Plant Freezing Tolerance and Cold Acclimation ». In *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*, édité par Narendra Tuteja, Sarvajeet Singh Gill, Antonio F. Tiburcio, et Renu Tuteja, 255-87. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi:10.1002/9783527632930.ch11.

Ho, Ying-Ning, Dony Chacko Mathew, et Chieh-Chen Huang. 2017. « Plant-Microbe Ecology: Interactions of Plants and Symbiotic Microbial Communities ». doi:10.5772/intechopen.69088.

Hoad, G. V. 1995. « Transport of Hormones in the Phloem of Higher Plants ». *Plant Growth Regulation* 16 (2): 173-82. doi:10.1007/BF00029538.

Hochmuth, George J. 1992. « Concepts and Practices for Improving Nitrogen Management for Vegetables ». *HortTechnology* 2 (1): 121-25.

Hu, Xiao-tang, Hu Chen, Jing Wang, Xiao-bin Meng, et Fu-hong Chen. 2009. « Effects of Soil Water Content on Cotton Root Growth and Distribution Under Mulched Drip Irrigation ». *Agricultural Sciences in China* 8 (6): 709-16. doi:10.1016/S1671-2927(08)60269-2.

Hua, J, Grisafi P, Cheng Sh, et Fink Gr. 2001. « Plant Growth Homeostasis Is Controlled by the Arabidopsis BON1 and BAP1 Genes. » *Genes & Development* 15 (17): 2263-72. doi:10.1101/gad.918101.

Islam, Faisal, Tahira Yasmeen, Qasim Ali, Shafaqat Ali, Muhammad Saleem Arif, Sabir Hussain, et Hina Rizvi. 2014. « Influence of Pseudomonas aeruginosa as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104 (juin): 285-93. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.008.

Ivanko, S., et J. Ingversen. 1971. « Investigation on the Assimilation of Nitrogen by Maize Roots and the Transport of Some Major Nitrogen Compounds by Xylem Sap ». *Physiologia Plantarum* 24 (1): 59-65. doi:10.1111/j.1399-3054.1971.tb06716.x.

Iwai, Hiroaki, Masako Usui, Haruko Hoshino, Hiroshi Kamada, Toshiro Matsunaga, Koichi Kakegawa, Tadashi Ishii, et Shinobu Satoh. 2003. « Analysis of Sugars in Squash Xylem Sap ». *Plant and Cell Physiology* 44 (6): 582-87. doi:10.1093/pcp/pcg075.

Ja, Martin, Johnson Nv, Gross Sm, Schnable J, Meng X, Wang M, Coleman-Derr D, *et al.* 2014. « A near Complete Snapshot of the Zea Mays Seedling Transcriptome Revealed from Ultra-Deep Sequencing. » *Scientific Reports* 4: 4519-4519. doi:10.1038/srep04519.

Jacoud, Colette, Dominique Job, Patrick Wadoux, et René Bally. 1999. « Initiation of root growth stimulation by Azospirillum lipoferum CRT1 during maize seed germination ». *Canadian Journal of Microbiology* 45 (4): 339-42. doi:10.1139/w99-023.

Jaleel, C. Abdul, P. Manivannan, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Gopi, R. Somasundaram, et R. Panneerselvam. 2007. « Pseudomonas fluorescens enhances biomass yield and ajmalicine production in Catharanthus roseus under water deficit stress ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60 (1): 7-11. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.05.012.

Jeschke, W. Dieter, et John S. Pate. 1991. « Cation and Chloride Partitioning through Xylem and Phloem within the Whole Plant of Ricinus Communis L. under Conditions of Salt Stress ». *Journal of Experimental Botany* 42 (9): 1105-16. doi:10.1093/jxb/42.9.1105.

Jha, Chaitanya Kumar, Dhara Patel, Narayanan Rajendran, et Meenu Saraf. 2010. « Combinatorial Assessment on Dominance and Informative Diversity of PGPR from Rhizosphere of Jatropha Curcas L. » *Journal of Basic Microbiology* 50 (3): 211-17. doi:10.1002/jobm.200900272.

Jha, Yachana. 2017. « Cell Water Content and Lignification in Maize Regulated by Rhizobacteria under Salinity ». *Brazilian Journal of Biological Sciences* 4 (7): 9-18. doi:10.21472/bjbs.040702.

Jia, Wensuo, et Jianhua Zhang. 1999. « Stomatal Closure Is Induced Rather by Prevailing Xylem Abscisic Acid than by Accumulated Amount of Xylem-Derived Abscisic Acid ». *Physiologia Plantarum* 106 (3): 268-75. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.106303.x.

Jones, D. L., et P. R. Darrah. 1992. « Re-Sorption of Organic Components by Roots of Zea Mays L. and Its Consequences in the Rhizosphere ». *Plant and Soil* 143 (2): 259-66. doi:10.1007/BF00007881.

Jorge Barriuso, Beatriz Ramos Solano. 2008. « Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ». *Handbook of Plant Science*, 1. doi:10.1002/9783527621989.ch1.

Junker, Björn H., Christian Klukas, et Falk Schreiber. 2006. « VANTED: A system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks ». *BMC Bioinformatics* 7: 109. doi:10.1186/1471-2105-7-109.

Kakumanu, Akshay, Madana M. R. Ambavaram, Curtis Klumas, Arjun Krishnan, Utlwang Batlang, Elijah Myers, Ruth Grene, et Andy Pereira. 2012. « Effects of Drought on Gene Expression in Maize Reproductive and Leaf Meristem Tissue Revealed by RNA-Seq ». *Plant Physiology* 160 (2): 846-67. doi:10.1104/pp.112.200444.

Kanehisa, Minoru, Susumu Goto, Shuichi Kawashima, et Akihiro Nakaya. 2002. « The KEGG databases at GenomeNet ». *Nucleic Acids Research* 30 (1): 42-46. doi:10.1093/nar/30.1.42.

Kang, Sang-Mo, Abdul Latif Khan, Young-Hyun You, Jong-Guk Kim, Muhammad Kamran, et In-Jung Lee. 2014. « Gibberellin production by newly isolated strain Leifsonia soli SE134 and its potential to promote plant growth ». *Journal Of Microbiology And Biotechnology* 24 (1): 106-12.

Kaplan, Fatma, Joachim Kopka, Dale W. Haskell, Wei Zhao, K. Cameron Schiller, Nicole Gatzke, Dong Yul Sung, et Charles L. Guy. 2004. « Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis ». *Plant Physiology* 136 (4): 4159-68. doi:10.1104/pp.104.052142.

Karlidag, Huseyin, Ahmet Esitken, Metin Turan, et Fikrettin Sahin. 2007. « Effects of Root Inoculation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield, Growth and Nutrient Element Contents of Leaves of Apple ». *Scientia Horticulturae* 114 (1): 16-20. doi:10.1016/j.scienta.2007.04.013.

Kaur, Navprabhjot, Poonam Sharma*, et Sunita Sharma. 2015. « Co-Inoculation of Mesorhizobium Sp. and Plant Growth Promoting Rhizobacteria Pseudomonas Sp. as Bio-Enhancer and Bio-Fertilizer in Chickpea (Cicer Arietinum L.) ». *Legume Research-An International Journal* 38 (3): 367-74. doi:10.5958/0976-0571.2015.00099.5.

Kaymak, Haluk Caglar. 2010. « Potential of PGPR in Agricultural Innovations ». In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, 45-79. Microbiology Monographs. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-13612-2_3.

Kaymak, Haluk Çağlar, İsmail Güvenç, Faika Yarali, et Mesude Figen Dönmez. 2009. « The Effects of Bio-Priming with PGPR on Germination of Radish (Raphanus Sativus L.) Seeds under Saline Conditions ». *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* 33 (2): 173-79.

Kehr, Julia. 2006. « Phloem Sap Proteins: Their Identities and Potential Roles in the Interaction between Plants and Phloem-Feeding Insects ». *Journal of Experimental Botany* 57 (4): 767-74. doi:10.1093/jxb/erj087.

Kehr, Julia, Anja Buhtz, et Patrick Giavalisco. 2005. « Analysis of Xylem Sap Proteins from Brassica Napus ». *BMC Plant Biology* 5 (1): 11. doi:10.1186/1471-2229-5-11.

Kell, Douglas B. 2004. « Metabolomics and systems biology: making sense of the soup ». *Current Opinion in Microbiology* 7 (3): 296-307. doi:10.1016/j.mib.2004.04.012.

Kerepesi, Ildikó, et Gábor Galiba. 2000. « Osmotic and Salt Stress-Induced Alteration in Soluble Carbohydrate Content in Wheat Seedlings ». *Crop Science* 40 (2): 482-87. doi:10.2135/cropsci2000.402482x.

Keseler, Ingrid M., Julio Collado-Vides, Socorro Gama-Castro, John Ingraham, Suzanne Paley, Ian T. Paulsen, Martín Peralta-Gil, et Peter D. Karp. 2005. « EcoCyc: A Comprehensive Database Resource for Escherichia Coli ». *Nucleic Acids Research* 33 (suppl 1): D334-37. doi:10.1093/nar/gki108.

Khalid, A., M. Arshad, et Z.a. Zahir. 2004. « Screening Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Improving Growth and Yield of Wheat ». *Journal of Applied Microbiology* 96 (3): 473-80. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x.

Khan, Mohammad Saghir, et Almas Zaidi. 2007. « Synergistic Effects of the Inoculation with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus on the Performance of Wheat ». *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* 31 (6): 355-62.

Kiirats, Olavi, Peter J. Lea, Vincent R. Franceschi, et Gerald E. Edwards. 2002. « Bundle Sheath Diffusive Resistance to CO2 and Effectiveness of C4 Photosynthesis and Refixation of Photorespired CO2 in a C4 Cycle Mutant and Wild-Type Amaranthus Edulis ». *Plant Physiology* 130 (2): 964-76. doi:10.1104/pp.008201.

Kim, Mi Seong, Song Mi Cho, Eun Young Kang, Yang Ju Im, Hoon Hwangbo, Young Cheol Kim, Choong-Min Ryu, Kwang Yeol Yang, Gap Chae Chung, et Baik Ho Cho. 2008. « Galactinol Is a Signaling Component of the Induced Systemic Resistance Caused by Pseudomonas chlororaphis O6 Root Colonization ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (12): 1643-53. doi:10.1094/MPMI-21-12-1643.

Kimball, B. A., K. Kobayashi, et M. Bindi. 2002. « Responses of Agricultural Crops to Free-Air CO2 Enrichment ». *Advances in Agronomy*, Advances in Agronomy, 77 (janvier): 293-368. doi:10.1016/S0065-2113(02)77017-X.

Kloepper, Joseph. 1980. « Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria ». http://www.nature.com/nature/journal/v286/n5776/abs/286885a0.html.

Köberl, Martina, Ruth Schmidt, Elshahat M. Ramadan, Rudolf Bauer, et Gabriele Berg. 2013. « The Microbiome of Medicinal Plants: Diversity and Importance for Plant Growth, Quality and Health ». *Frontiers in Microbiology* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00400.

Koch, Karen. 2004. « Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development ». *Current Opinion in Plant Biology* 7 (3): 235-46. doi:10.1016/j.pbi.2004.03.014.

Kogel, Karl-Heinz, Lars M. Voll, Patrick Schäfer, Carin Jansen, Yongchun Wu, Gregor Langen, Jafargholi Imani, *et al.* 2010. « Transcriptome and Metabolome Profiling of Field-Grown Transgenic Barley Lack Induced Differences but Show Cultivar-Specific Variances ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (14): 6198-6203. doi:10.1073/pnas.1001945107.

Kohler, Josef, Fuensanta Caravaca, et Antonio Roldán. 2010. « An AM fungus and a PGPR intensify the adverse effects of salinity on the stability of rhizosphere soil aggregates of Lactuca sativa ». *Soil Biology and Biochemistry* 42 (3): 429-34. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.021.

Kolb, et Sperry. 1999. « Transport Constraints on Water Use by the Great Basin Shrub, Artemisia Tridentata ». *Plant, Cell & Environment* 22 (8): 925-35. doi:10.1046/j.1365-3040.1999.00458.x.

Korovetska, Halyna, Ondřej Novák, Oldřich Jůza, et Vit Gloser. 2014. « Signalling Mechanisms Involved in the Response of Two Varieties of Humulus Lupulus L. to Soil Drying: I. Changes in Xylem Sap PH and the Concentrations of Abscisic Acid and Anions ». *Plant and Soil* 380 (1-2): 375-87. doi:10.1007/s11104-014-2101-1.

Kromkamp, Jacco C., Nicole A. Dijkman, Jan Peene, Stefan G.H. Simis, et Herman J. Gons. 2008. « Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques ». *European Journal of Phycology* 43 (4): 327-44. doi:10.1080/09670260802080895.

Kuzyakov, Y., et D. L. Jones. 2006. « Glucose uptake by maize roots and its transformation in the rhizosphere ». *Soil Biology and Biochemistry* 38 (5): 851-60. doi:10.1016/j.soilbio.2005.07.012.

L. C. van Loon, P. A. H. M. Bakker, et C. M. J. Pieterse. 1998. « Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria ». *Annual Review of Phytopathology* 36 (1): 453-83. doi:10.1146/annurev.phyto.36.1.453.

Lastdrager, Jeroen, Johannes Hanson, et Sjef Smeekens. 2014a. « Sugar Signals and the Control of Plant Growth and Development ». *Journal of Experimental Botany* 65 (3): 799-807. doi:10.1093/jxb/ert474.

Laudick, Julia Ann. 2017. « Microbial Biostimulants in Organic Farming Systems: Patterns of Current Use and an Investigation of Their Efficacy in Different Soil Environments ». The Ohio State University. https://etd.ohiolink.edu/pg_10?0::NO:10:P10_ETD_SUBID:120584.

Lavania, Meeta, Puneet Singh Chauhan, S. V. S. Chauhan, Harikesh Bahadur Singh, et Chandra Shekhar Nautiyal. 2006. « Induction of Plant Defense Enzymes and Phenolics by Treatment With Plant Growth–Promoting Rhizobacteria Serratia Marcescens NBRI1213 ». *Current Microbiology* 52 (5): 363-68. doi:10.1007/s00284-005-5578-2.

LeClere, Sherry, Eric A. Schmelz, et Prem S. Chourey. 2010. « Sugar Levels Regulate Tryptophan-Dependent Auxin Biosynthesis in Developing Maize Kernels ». *Plant Physiology* 153 (1): 306-18. doi:10.1104/pp.110.155226.

Lee, Yun Sun, Hyun-Seung Park, Dong-Kyu Lee, Murukarthick Jayakodi, Nam-Hoon Kim, Hyun Jo Koo, Sang-Choon Lee, Yeon Jeong Kim, Sung Won Kwon, et Tae-Jin Yang. 2017. « Integrated Transcriptomic and Metabolomic Analysis of Five Panax ginseng Cultivars Reveals the Dynamics of Ginsenoside Biosynthesis ». *Frontiers in Plant Science* 8 (juin). doi:10.3389/fpls.2017.01048.

Leegood, Richard C. 2002. « C4 Photosynthesis: Principles of CO2 Concentration and Prospects for Its Introduction into C3 Plants ». *Journal of Experimental Botany* 53 (369): 581-90. doi:10.1093/jexbot/53.369.581.

Leivar, Pablo, et Peter H. Quail. 2011. « PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub ». *Trends in Plant Science* 16 (1): 19-28. doi:10.1016/j.tplants.2010.08.003.

Lemoine, Remi, Sylvain La Camera, Rossitza Atanassova, Fabienne Dédaldéchamp, Thierry Allario, Nathalie Pourtau, Jean-Louis Bonnemain, *et al.* 2013. « Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors ». *Frontiers in Plant Science* 4 (juillet). doi:10.3389/fpls.2013.00272.

Liang, Jiansheng, et Jianhua Zhang. 1997. « Collection of Xylem Sap at Flow Rate Similar to in vivo Transpiration Flux ». *Plant and Cell Physiology* 38 (12): 1375-81.

Lin, Myat T., Alessandro Occhialini, P. John Andralojc, Martin A. J. Parry, et Maureen R. Hanson. 2014. « A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops ». *Nature* 513 (7519): 547-50. doi:10.1038/nature13776.

Liu, Y. F., M. F. Qi, et T. L. Li. 2012. « Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery ». *Plant Science* 196 (novembre): 8-17. doi:10.1016/j.plantsci.2012.07.005.

Ljung, Karin, Jennifer L Nemhauser, et Pierdomenico Perata. 2015. « New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks ». *Current Opinion in Plant Biology* 25 (juin): 130-37. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.022.

Loewus, Frank A., et Pushpalatha P. N. Murthy. 2000. « myo-Inositol metabolism in plants ». *Plant Science* 150 (1): 1-19. doi:10.1016/S0168-9452(99)00150-8.

Lommen, Arjen, et Harrie J. Kools. 2012. « MetAlign 3.0: performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware ». *Metabolomics* 8 (4): 719-26. doi:10.1007/s11306-011-0369-1.

Long, Joanne C., Wei Zhao, Aaron M. Rashotte, Gloria K. Muday, et Steven C. Huber. 2002. « Gravity-Stimulated Changes in Auxin and Invertase Gene Expression in Maize Pulvinal Cells ». *Plant Physiology* 128 (2): 591-602. doi:10.1104/pp.010579.

Long, Stephen P., Amy Marshall-Colon, et Xin-Guang Zhu. 2015. « Meeting the Global Food Demand of the Future by Engineering Crop Photosynthesis and Yield Potential ». *Cell* 161 (1): 56-66. doi:10.1016/j.cell.2015.03.019.

López-Millán, Ana Flor, Fermín Morales, Anunciación Abadía, et Javier Abadía. 2000. « Effects of Iron Deficiency on the Composition of the Leaf Apoplastic Fluid and Xylem Sap in Sugar Beet. Implications for Iron and Carbon Transport ». *Plant Physiology* 124 (2): 873-84. doi:10.1104/pp.124.2.873.

Lovisolo, Claudio, et Andrea Schubert. 1998. « Effects of Water Stress on Vessel Size and Xylem Hydraulic Conductivity in Vitis Vinifera L. » *Journal of Experimental Botany* 49 (321): 693-700. doi:10.1093/jxb/49.321.693.

Luedemann, Alexander, Katrin Strassburg, Alexander Erban, et Joachim Kopka. 2008. « TagFinder for the Quantitative Analysis of Gas Chromatography—mass Spectrometry (GC-MS)-Based Metabolite Profiling Experiments ». *Bioinformatics* 24 (5): 732-37. doi:10.1093/bioinformatics/btn023.

Ma, Yi, Thomas L. Slewinski, R. Frank Baker, et David M. Braun. 2009. « Tie-Dyed1 Encodes a Novel, Phloem-Expressed Transmembrane Protein That Functions in Carbohydrate Partitioning ». *Plant Physiology* 149 (1): 181-94. doi:10.1104/pp.108.130971.

Maherali, Hafiz, Catarina F. Moura, Maria C. Caldeira, Cynthia J. Willson, et Robert B. Jackson. 2006. « Functional Coordination between Leaf Gas Exchange and Vulnerability to Xylem Cavitation in Temperate Forest Trees ». *Plant, Cell & Environment* 29 (4): 571-83. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01433.x.

Malhotra, Mandira, et Sheela Srivastava. 2008. « Organization of the IpdC Region Regulates IAA Levels in Different Azospirillum Brasilense Strains: Molecular and Functional Analysis of IpdC in Strain SM ». *Environmental Microbiology* 10 (5): 1365-73. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01529.x.

Malik, K. A., Rakhshanda Bilal, Samina Mehnaz, G. Rasul, M. S. Mirza, et S. Ali. 1997. « Association of Nitrogen-Fixing, Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) with Kallar Grass and Rice ». In *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes*, 37-44. Developments in Plant and Soil Sciences. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-011-7113-7_5.

Manjunath, Mallappa, Radha Prasanna, Pratima Sharma, Lata Nain, et Rajendra Singh. 2011. « Developing PGPR consortia using novel genera Providencia and Alcaligenes along with cyanobacteria for wheat ». *Archives of Agronomy and Soil Science* 57 (8): 873-87. doi:10.1080/03650340.2010.499902.

Marschner, H., V. Römheld, et I. Cakmak. 1987. « Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere ». *Journal of Plant Nutrition* 10 (9-16): 1175-84. doi:10.1080/01904168709363645.

Martínez-Morales, Luis Javier, Lucía Soto-Urzúa, Beatriz Eugenia Baca, et José Antonio Sánchez-Ahédo. 2003. « Indole-3-Butyric Acid (IBA) Production in Culture Medium by Wild Strain Azospirillum Brasilense ». *FEMS Microbiology Letters* 228 (2): 167-73. doi:10.1016/S0378-1097(03)00694-3.

Martínez-Viveros, O., M. A. Jorquera, D. E. Crowley, G. Gajardo, et M. L. Mora. 2010. « Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria ». *Journal of soil science and plant nutrition* 10 (3): 293-319. doi:10.4067/S0718-95162010000100006.

Mason, Michael G., John J. Ross, Benjamin A. Babst, Brittany N. Wienclaw, et Christine A. Beveridge. 2014. « Sugar Demand, Not Auxin, Is the Initial Regulator of Apical Dominance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (16): 6092-97. doi:10.1073/pnas.1322045111.

Mattoo, Autar K., Maria-Teresa Giardi, Alexander Raskind, et Marvin Edelman. 1999. « Dynamic Metabolism of Photosystem II Reaction Center Proteins and Pigments ». *Physiologia Plantarum* 107 (4): 454-61. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.100412.x.

Maury Lechon, G., F. Corbineau, et D. Come. 1982. « Données préliminaires sur la germination des graines et la conservation des plantules de Symphonia globulifera L.F. (Guttifère) ». *Ecosystème Forestier Guyanais : Bulletin de Liaison du Groupe de Travail ECEREX*, nº 6: 137-47.

Mayer, A. M., et A. Poljakoff-Mayber. 1982. *The Germination of Seeds: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies*. Elsevier.

McGrath, Justin M., et Stephen P. Long. 2014. « Can the Cyanobacterial Carbon-Concentrating Mechanism Increase Photosynthesis in Crop Species? A Theoretical Analysis ». *Plant Physiology* 164 (4): 2247-61. doi:10.1104/pp.113.232611.

Meena, Kamlesh K., Sukumar Mesapogu, Manish Kumar, Mahesh S. Yandigeri, Geeta Singh, et Anil K. Saxena. 2010. « Co-Inoculation of the Endophytic Fungus Piriformospora Indica with the Phosphate-Solubilising Bacterium Pseudomonas Striata Affects Population Dynamics and Plant Growth in Chickpea ». *Biology and Fertility of Soils* 46 (2): 169-74. doi:10.1007/s00374-009-0421-8.

Mehnaz, Samina, Brian Weselowski, et George Lazarovits. 2007. « Azospirillum canadense sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (3): 620-24. doi:10.1099/ijs.0.64804-0.

Melnyk, Charles W. 2017. « Connecting the Plant Vasculature to Friend or Foe ». *New Phytologist* 213 (4): 1611-17. doi:10.1111/nph.14218.

Menendez, Esther, et Paula Garcia-Fraile. 2017. « Plant Probiotic Bacteria: Solutions to Feed the World ». *Microbiology 2017, Vol. 3, Pages 502-524*, juin. doi:10.3934/microbiol.2017.3.502.

Mercier, J., et S. E. Lindow. 2000. « Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes ». *Applied and Environmental Microbiology* 66 (1): 369-74.

Mertz, Edwin T., Lynn S. Bates, et Oliver E. Nelson. 1964. « Mutant Gene That Changes Protein Composition and Increases Lysine Content of Maize Endosperm ». *Science* 145 (3629): 279-80. doi:10.1126/science.145.3629.279.

Metzner, Ralf, Heike Ursula Schneider, Uwe Breuer, Michael Robert Thorpe, Ulrich Schurr, et Walter Heinz Schroeder. 2010. « Tracing Cationic Nutrients from Xylem into Stem Tissue of French Bean by Stable Isotope Tracers and Cryo-Secondary Ion Mass Spectrometry ». *Plant Physiology* 152 (2): 1030-43. doi:10.1104/pp.109.143776.

Miller, David M. 1985. « Studies of Root Function in Zea Mays III. Xylem Sap Composition at Maximum Root Pressure Provides Evidence of Active Transport into the Xylem and a Measurement of the Reflection Coefficient of the Root ». *Plant Physiology* 77 (1): 162-67. doi:10.1104/pp.77.1.162.

Mirshekari, Bahram. 2012. « Seed Priming with Iron and Boron Enhances Germination and Yield of Dill (Anethum Graveolens) ». *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* 36 (1): 27-33.

Mishra, Bhuwaneshwar S., Manjul Singh, Priyanka Aggrawal, et Ashverya Laxmi. 2009. « Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling Arabidopsis thaliana Seedlings Root Growth and Development ». *PLOS ONE* 4 (2): e4502. doi:10.1371/journal.pone.0004502.

Mittler, Ron. 2006. « Abiotic stress, the field environment and stress combination ». *Trends in Plant Science* 11 (1): 15-19. doi:10.1016/j.tplants.2005.11.002.

Mohamed, H. I., et E. Z. Gomaa. 2012. « Effect of Plant Growth Promoting Bacillus Subtilis and Pseudomonas Fluorescens on Growth and Pigment Composition of Radish Plants (Raphanus Sativus) under NaCl Stress ». *Photosynthetica* 50 (2): 263-72. doi:10.1007/s11099-012-0032-8.

Molina-Favero, Celeste, Cecilia Mónica Creus, María Luciana Lanteri, Natalia Correa-Aragunde, María Cristina Lombardo, Carlos Alberto Barassi, et Lorenzo Lamattina. 2007. « Nitric Oxide and Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Common Features Influencing Root Growth and Development ». In , édité par BT - Advances in Botanical Research, 46:1-33. Academic Press. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229607460013.

Moore, Brandon, Li Zhou, Filip Rolland, Qi Hall, Wan-Hsing Cheng, Yan-Xia Liu, Ildoo Hwang, Tamara Jones, et Jen Sheen. 2003a. « Role of the *Arabidopsis* Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling ». *Science* 300 (5617): 332-36. doi:10.1126/science.1080585.

Morrison, W. R. 1995. « Starch Lipids and How They Relate to Starch Granule Structure and Functionality ». *Cereal Foods World* 40 (6): 437-46.

Mortel, Judith E. van de, Ric C. H. de Vos, Ester Dekkers, Ana Pineda, Leandre Guillod, Klaas Bouwmeester, Joop J. A. van Loon, Marcel Dicke, et Jos M. Raaijmakers. 2012. « Metabolic and Transcriptomic Changes Induced in Arabidopsis by the Rhizobacterium Pseudomonas Fluorescens SS101 ». *Plant Physiology* 160 (4): 2173-88. doi:10.1104/pp.112.207324.

Moueium, Ziad S. Abdel, Abdullahi H El Tinay, et Abdel Wahab H Abdalla. 1996. « Effect of germination on protein fractions of corn cultivars ». *Food Chemistry* 57 (3): 381-84. doi:10.1016/S0308-8146(96)00006-4.

Mueller, U. G., et J. L. Sachs. 2015. « Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health ». *Trends in Microbiology* 23 (10): 606-17. doi:10.1016/j.tim.2015.07.009.

Mungur, R., A. D. M. Glass, D. B. Goodenow, et D. A. Lightfoot. 2005. « Metabolite Fingerprinting in Transgenic Nicotiana tabacum Altered by the Escherichia coli Glutamate Dehydrogenase Gene ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2005 (2): 198-214. doi:10.1155/JBB.2005.198.

Murphy, D. V., A. J. Macdonald, E. A. Stockdale, K. W. T. Goulding, S. Fortune, J. L. Gaunt, P. R. Poulton, J. A. Wakefield, C. P. Webster, et W. S. Wilmer. 2000. « Soluble Organic Nitrogen in Agricultural Soils ». *Biology and Fertility of Soils* 30 (5-6): 374-87. doi:10.1007/s003740050018.

Mustafa, H. 2017. « Role of seed priming to enhance growth and development of crop plants against biotic and abiotic stresses | Hafiz Saad Bin H S B M Mustafa - Academia.edu ». http://www.academia.edu/32451455/Role_of_seed_priming_to_enhance_growth_and_development_of_crop_plants_against_biotic_and_abiotic_stresses.

Nain, Lata, Anuj Rana, Monica Joshi, Shrikrishna D. Jadhav, Dinesh Kumar, Y. S. Shivay, Sangeeta Paul, et Radha Prasanna. 2010. « Evaluation of Synergistic Effects of Bacterial and Cyanobacterial Strains as Biofertilizers for Wheat ». *Plant and Soil* 331 (1-2): 217-30. doi:10.1007/s11104-009-0247-z.

Nardini, Andrea, Maria A. Lo Gullo, et Sebastiano Salleo. 2011. « Refilling embolized xylem conduits: Is it a matter of phloem unloading? » *Plant Science* 180 (4): 604-11. doi:10.1016/j.plantsci.2010.12.011.

Nasrolahzadeh, Safar, Ali Shirkhani, et Saeid Zehtab Salmasi. 2017. « Agronomic responses of maize to de cit and adequate irrigation and levels of chemical fertilizers and bio fertilizers ». http://bbrc.in/bbrc/2017jan-MarchHTML/BBRC10_032/BBRC10_032.html.

Navarre, William Wiley, et Olaf Schneewind. 1999. « Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (1): 174-229.

Nelson, L. M., et R. Knowles. 1978. « Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by Azospirillum brasilense grown in continuous culture ». *Canadian Journal of Microbiology* 24 (11): 1395-1403. doi:10.1139/m78-223.

Netting, Andrew G., Julian C. Theobald, et Ian C. Dodd. 2012. « Xylem Sap Collection and Extraction Methodologies to Determine in Vivo Concentrations of ABA and Its Bound Forms by Gas

Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ». *Plant Methods* 8 (1): 1-14. doi:10.1186/1746-4811-8-11.

Nicholson, J. K., J. C. Lindon, et E. Holmes. 1999. « "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data ». *Xenobiotica* 29 (11): 1181-89. doi:10.1080/004982599238047.

Nielsen, Jens, et Stephen Oliver. 2005. « The next Wave in Metabolome Analysis ». *Trends in Biotechnology* 23 (11): 544-46. doi:10.1016/j.tibtech.2005.08.005.

Nomura, Takeo, Yasuhiro Kono, et T. Akazawa. 1969. « Enzymic Mechanism of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds II. Scutellum as the Site of Sucrose Synthesis1 ». *Plant Physiology* 44 (5): 765-69.

Noumavo, Pacôme A., Eméric Kochoni, Yédéou O. Didagbé, Adolphe Adjanohoun, Marcellin Allagbé, Rachidatou Sikirou, Emma W. Gachomo, Simeon O. Kotchoni, et Lamine Baba-Moussa. 2013. « Effect of Different Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Maize Seed Germination and Seedling Development » 2013 (mai). doi:10.4236/ajps.2013.45125.

Ohshima, Toshiyuki, Hiroaki Hayashi, et Mitsuo Chino. 1990. « Collection and Chemical Composition of Pure Phloem Sap from Zea Mays L. » *Plant and Cell Physiology* 31 (5): 735-37.

Okon, Yaacov. 1993. *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press.

Okon, Yaacov, et Carlos A. Labandera-Gonzalez. 1994. « Agronomic applications of azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation ». *Soil Biology and Biochemistry* 26 (12): 1591-1601. doi:10.1016/0038-0717(94)90311-5.

Ona, Ositadinma, Ilse Smets, Peter Gysegom, Kristel Bernaerts, Jan Van Impe, Els Prinsen, et Jos Vanderleyden. 2003. « The effect of pH on indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis of Azospirillum brasilense Sp7 ». In *Symbiosis*, 35:199-208. Balaban. http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14707955.

Orhan, Emine, Ahmet Esitken, Sezai Ercisli, Metin Turan, et Fikrettin Sahin. 2006. « Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry ». *Scientia Horticulturae* 111 (1): 38-43. doi:10.1016/j.scienta.2006.09.002.

Overvoorde, Paul, Hidehiro Fukaki, et Tom Beeckman. 2010. « Auxin Control of Root Development ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (6): a001537. doi:10.1101/cshperspect.a001537.

Paparella, S., S. S. Araújo, G. Rossi, M. Wijayasinghe, D. Carbonera, et Alma Balestrazzi. 2015. « Seed Priming: State of the Art and New Perspectives ». *Plant Cell Reports* 34 (8): 1281-93. doi:10.1007/s00299-015-1784-y.

Passioura, JB. 1988. « Root Signals Control Leaf Expansion in Wheat Seedlings Growing in Drying Soil ». *Functional Plant Biology* 15 (5): 687-93.

Patonnier, M.P., J.P. Peltier, et G. Marigo. 1999. « Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of Fraxinus excelsior L. stomata ». *Journal of Experimental Botany* 50 (336): 1223-29. doi:10.1093/jxb/50.336.1223.

Patti, Gary J., Oscar Yanes, et Gary Siuzdak. 2012. « Innovation: Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (4): 263-69. doi:10.1038/nrm3314.

Paul, Matthew J., et Till K. Pellny. 2003. « Carbon Metabolite Feedback Regulation of Leaf Photosynthesis and Development ». *Journal of Experimental Botany* 54 (382): 539-47. doi:10.1093/jxb/erg052.

Paul, Matthew, Till Pellny, et Oscar Goddijn. 2001. « Enhancing photosynthesis with sugar signals ». *Trends in Plant Science* 6 (5): 197-200. doi:10.1016/S1360-1385(01)01920-3.

Pego, Jónatas V., Anne J. Kortstee, Casper Huijser, et Sjef C. M. Smeekens. 2000. « Photosynthesis, Sugars and the Regulation of Gene Expression ». *Journal of Experimental Botany* 51 (suppl 1): 407-16. doi:10.1093/jexbot/51.suppl_1.407.

Peiffer, Jason A., Aymé Spor, Omry Koren, Zhao Jin, Susannah Green Tringe, Jeffery L. Dangl, Edward S. Buckler, et Ruth E. Ley. 2013. « Diversity and Heritability of the Maize Rhizosphere Microbiome under Field Conditions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (16): 6548-53. doi:10.1073/pnas.1302837110.

Phelix, C. F., et F. A. Feltus. 2015. « Plant Stress Biomarkers from Biosimulations: The Transcriptome-To-Metabolome™ (TTM™) Technology – Effects of Drought Stress on Rice ». *Plant Biology* 17 (1): 63-73. doi:10.1111/plb.12221.

Podile, A. R., et V. D. V. Laxmi. 1998. « Seed Bacterization with Bacillus Subtilis AF 1 Increases Phenylalanine Ammonia-Lyase and Reduces the Incidence of Fusarial Wilt in Pigeonpea ». *Journal of Phytopathology* 146 (5-6): 255-59. doi:10.1111/j.1439-0434.1998.tb04687.x.

Porcel, Rosa, Ángel M. Zamarreño, José M. García-Mina, et Ricardo Aroca. 2014. « Involvement of Plant Endogenous ABA in Bacillus Megaterium PGPR Activity in Tomato Plants ». *BMC Plant Biology* 14 (1): 36. doi:10.1186/1471-2229-14-36.

Prasanna, Radha, Monica Joshi, Anuj Rana, Yashbir Singh Shivay, et Lata Nain. 2012. « Influence of Co-Inoculation of Bacteria-Cyanobacteria on Crop Yield and C–N Sequestration in Soil under Rice Crop ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (3): 1223-35. doi:10.1007/s11274-011-0926-9.

Price, G. Dean, et Susan M. Howitt. 2014. « Plant Science: Towards Turbocharged Photosynthesis ». *Nature* 513 (7519): 497-98. doi:10.1038/nature13749.

Puga-Freitas, Ruben, et Manuel Blouin. 2015. « A review of the effects of soil organisms on plant hormone signalling pathways ». *Environmental and Experimental Botany*, Plant signalling mechanisms in response to the environment, 114 (Supplement C): 104-16. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.07.006.

R Development Core Team. 2008. « R: A language and environment for statistical computing ». R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rahmoune, Bilal, Abdelkader Morsli, Madjda Khelifi-Slaoui, Lakhdar Khelifi, Andrew Strueh, Alexander Erban, Joachim Kopka, Jürgen Prell, et Joost T. van Dongen. 2017. « Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of Arabidopsis and Datura plants ». *Journal of Plant Interactions* 12 (1): 1-6. doi:10.1080/17429145.2016.1269215.

Raj, S. Niranjan, N. P. Shetty, et H. S. Shetty. 2004. « Seed bio-priming with Pseudomonas fluorescens isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew ». *International Journal of Pest Management* 50 (1): 41-48. doi:10.1080/09670870310001626365.

Ramakrishnan, Balasubramanian, Simranjit Kaur, Radha Prasanna, Kunal Ranjan, Amrita Kanchan, Firoz Hossain, Yashbir Singh Shivay, et Lata Nain. 2017. « Microbial Inoculation of Seeds Characteristically Shapes the Rhizosphere Microbiome in Desi and Kabuli Chickpea Types ». *Journal of Soils and Sediments* 17 (8): 2040-53. doi:10.1007/s11368-017-1685-5.

Reddy, P. Parvatha. 2012. « Bio-Priming of Seeds ». In *Recent Advances in Crop Protection*, 83-90. Springer, New Delhi. doi:10.1007/978-81-322-0723-8_6.

Rehman, Hafeez Ur, Shahzad Maqsood Ahmed Basra, et Muhammad Farooq. 2011. « Field Appraisal of Seed Priming to Improve the Growth, Yield, and Quality of Direct Seeded Rice ». *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* 35 (4): 357-65.

Reimand, Jüri, Tambet Arak, Priit Adler, Liis Kolberg, Sulev Reisberg, Hedi Peterson, et Jaak Vilo. 2016. « g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update) ». *Nucleic Acids Research* 44 (W1): W83-89. doi:10.1093/nar/gkw199.

Reinbothe, Christiane, Sandra Bartsch, Laura L. Eggink, J. Kenneth Hoober, Judy Brusslan, Ricardo Andrade-Paz, Julie Monnet, et Steffen Reinbothe. 2006. « A Role for Chlorophyllide a Oxygenase in the Regulated Import and Stabilization of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4777-82. doi:10.1073/pnas.0511066103.

Reinhold, B., T. Hurek, et I. Fendrik. 1985. « Strain-Specific Chemotaxis of Azospirillum Spp. » *Journal of Bacteriology* 162 (1): 190-95.

Rep, Martijn, H. Charlotte Van Der Does, Michiel Meijer, Ringo Van Wijk, Petra M. Houterman, Henk L. Dekker, Chris G. De Koster, et Ben J. C. Cornelissen. 2004. « A Small, Cysteine-Rich Protein Secreted by Fusarium Oxysporum during Colonization of Xylem Vessels Is Required for I-3-Mediated Resistance in Tomato ». *Molecular Microbiology* 53 (5): 1373-83. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x.

Richardson, Alan E., José-Miguel Barea, Ann M. McNeill, et Claire Prigent-Combaret. 2009. « Acquisition of Phosphorus and Nitrogen in the Rhizosphere and Plant Growth Promotion by Microorganisms ». *Plant and Soil* 321 (1-2): 305-39. doi:10.1007/s11104-009-9895-2.

Riefler, Michael, Ondrej Novak, Miroslav Strnad, et Thomas Schmülling. 2006. « Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination,

Root Development, and Cytokinin Metabolism ». *The Plant Cell* 18 (1): 40-54. doi:10.1105/tpc.105.037796.

Rivard, Paul G., et Paul M. Woodard. 1989. « Light, ash, and pH effects on the germination and seedling growth of Typha latifolia (cattail) ». *Canadian Journal of Botany* 67 (9): 2783-87. doi:10.1139/b89-358.

Robin, A., G. Vansuyt, P. Hinsinger, J. M. Meyer, J. F. Briat, et P. Lemanceau. 2008. « Chapter 4 Iron Dynamics in the Rhizosphere: Consequences for Plant Health and Nutrition ». In , édité par BT - Advances in Agronomy, 99:183-225. Academic Press. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211308004045.

Roessner, Ute, Alexander Luedemann, Doreen Brust, Oliver Fiehn, Thomas Linke, Lothar Willmitzer, et Alisdair R. Fernie. 2001. « Metabolic Profiling Allows Comprehensive Phenotyping of Genetically or Environmentally Modified Plant Systems ». *The Plant Cell* 13 (1): 11-29. doi:10.1105/tpc.13.1.11.

Rohn, Hendrik, Astrid Junker, Anja Hartmann, Eva Grafahrend-Belau, Hendrik Treutler, Matthias Klapperstück, Tobias Czauderna, Christian Klukas, et Falk Schreiber. 2012. « VANTED v2 : A Framework for Systems Biology Applications ». *BMC Systems Biology* 6 (1). doi:10.1186/1752-0509-6-139.

Rolland, F., et J. Sheen. 2005. « Sugar Sensing and Signalling Networks in Plants ». *Biochemical Society Transactions* 33 (1): 269-71. doi:10.1042/BST0330269.

Romanowska, Elżbieta, Anna Drożak, Berenika Pokorska, Brian J. Shiell, et Wojtek P. Michalski. 2006. « Organization and activity of photosystems in the mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize ». *Journal of Plant Physiology* 163 (6): 607-18. doi:10.1016/j.jplph.2005.06.007.

Rook, Fred, et Michael W. Bevan. 2003. « Genetic Approaches to Understanding Sugar-response Pathways ». *Journal of Experimental Botany* 54 (382): 495-501. doi:10.1093/jxb/erg054.

Rothwell, Shane A., et Ian C. Dodd. 2014. « Xylem Sap Calcium Concentrations Do Not Explain Liming-Induced Inhibition of Legume Gas Exchange ». *Plant and Soil* 382 (1-2): 17-30. doi:10.1007/s11104-014-2118-5.

Roy Chowdhury, Ananya, Anindita Bagchi, et Chandan Sengupta. 2016. « Isolantion and characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) from agricultural field and their potential role on germination and growth of Spinach (Spinacia oleracea L.) plants ». https://www.researchgate.net/publication/318596529_ISOLATION_AND_CHARACTERIZATION_OF_PLANT_GROWTH_PROMOTING_RHIZOBACTERIA_PGPR_FROM_AGRICULTURAL_FIELD_AND_THEIR_POTENTIAL_ROLE_ON_GERMINATION_AND_GROWTH_OF_SPINACH_Spinacia_oleracea_L_PLANTS.

Rozier, Camille, Alexander Erban, Jihane Hamzaoui, Claire Prigent-Combaret, Gilles Comte, Joachim Kopka, Sonia Czarnes, et Laurent Legendre. 2016. « Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, Azospirillum lipoferum CRT1 ». *Metabolomics:Open Access*, juillet. doi:10.4172/2153-0769.1000182.

Rozier, Camille, Jihane Hamzaoui, Damien Lemoine, Sonia Czarnes, et Laurent Legendre. 2017. « Field-Based Assessment of the Mechanism of Maize Yield Enhancement by Azospirillum Lipoferum CRT1 ». *Scientific Reports* 7 (1): 7416. doi:10.1038/s41598-017-07929-8.

Ruan, Yong-Ling. 2014. « Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling ». *Annual Review of Plant Biology* 65 (1): 33-67. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-040251.

Sadras, Victor O., et Gilles Lemaire. 2014. « Quantifying crop nitrogen status for comparisons of agronomic practices and genotypes ». *Field Crops Research* 164: 54-64. doi:10.1016/j.fcr.2014.05.006.

Sage, Rowan F., Tammy L. Sage, et Ferit Kocacinar. 2012. « Photorespiration and the Evolution of C4 Photosynthesis ». *Annual Review of Plant Biology* 63 (1): 19-47. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105511.

Sah, Stuti, Nahar Singh, et Rajni Singh. 2017. « Iron Acquisition in Maize (Zea Mays L.) Using Pseudomonas Siderophore ». *3 Biotech* 7 (2): 121. doi:10.1007/s13205-017-0772-z.

Salleo, S., M. A. Lo Gullo, P. Trifilò, et A. Nardini. 2004. « New Evidence for a Role of Vessel-Associated Cells and Phloem in the Rapid Xylem Refilling of Cavitated Stems of Laurus Nobilis L. » *Plant, Cell & Environment* 27 (8): 1065-76. doi:10.1111/j.1365-3040.2004.01211.x.

Samaniego-Gámez, Blancka Yesenia, René Garruña, José M. Tun-Suárez, Jorge Kantun-Can, Arturo Reyes-Ramírez, et Lourdes Cervantes-Díaz. 2016. « Bacillus spp. inoculation improves photosystem II

efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants ». *Chilean journal of agricultural research* 76 (4): 409-16. doi:10.4067/S0718-58392016000400003.

Sambrook, Glen A. 1990. « Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Volumes 1, 2, and 3. Current Protocols in Molecular Biology. Volumes 1 and 2 ». *Cell* 61 (1): 17-18. doi:10.1016/0092-8674(90)90210-6.

Sánchez-Linares, Luis, Marina Gavilanes-Ruíz, David Díaz-Pontones, Fernando Guzmán-Chávez, Viridiana Calzada-Alejo, Viridiana Zurita-Villegas, Viridiana Luna-Loaiza, Rafael Moreno-Sánchez, Irma Bernal-Lugo, et Sobeida Sánchez-Nieto. 2012. « Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination ». *Journal of Experimental Botany* 63 (12): 4513-26. doi:10.1093/jxb/ers130.

Sarma, B. K., D. P. Singh, S. Mehta, H. B. Singh, et U. P. Singh. 2002. « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Elicited Alterations in Phenolic Profile of Chickpea (Cicer Arietinum) Infected by Sclerotium Rolfsii ». *Journal of Phytopathology* 150 (4-5): 277-82. doi:10.1046/j.1439-0434.2002.00755.x.

Satoh, Shinobu. 2006. « Organic Substances in Xylem Sap Delivered to Above-Ground Organs by the Roots ». *Journal of Plant Research* 119 (3): 179-87. doi:10.1007/s10265-005-0257-8.

Sauer, Michael, Stéphanie Robert, et Jürgen Kleine-Vehn. 2013. « Auxin: simply complicated ». *Journal of Experimental Botany* 64 (9): 2565-77. doi:10.1093/jxb/ert139.

Sauter, A., K.-J. Dietz, et W. Hartung. 2002. « A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling ». *Plant, Cell & Environment* 25 (2): 223–228. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00747.x.

Schachtman, Daniel P., et Jason Q. D. Goodger. 2008. « Chemical Root to Shoot Signaling under Drought ». *Trends in Plant Science* 13 (6): 281-87. doi:10.1016/j.tplants.2008.04.003.

Schell, Judith. 1997. « Interdependence of PH, Malate Concentration, and Calcium and Magnesium Concentrations in the Xylem Sap of Beech Roots ». *Tree Physiology* 17 (7): 479-83. doi:10.1093/treephys/17.7.479.

Scheres, Ben, Philip Benfey, et Liam Dolan. 2002. « Root Development ». *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 1 (septembre). doi:10.1199/tab.0101.

Schjoerring, J. K., S. Husted, G. Mäck, et M. Mattsson. 2002. « The Regulation of Ammonium Translocation in Plants ». *Journal of Experimental Botany* 53 (370): 883-90. doi:10.1093/jexbot/53.370.883.

Schnable, Patrick S., Doreen Ware, Robert S. Fulton, Joshua C. Stein, Fusheng Wei, Shiran Pasternak, Chengzhi Liang, *et al.* 2009. « The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5956): 1112-15. doi:10.1126/science.1178534.

Scholander, P. F., Edda D. Bradstreet, E. A. Hemmingsen, et H. T. Hammel. 1965. « Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants ». *Science* 148 (3668): 339-46. doi:10.1126/science.148.3668.339.

Schröder, Florian, Janina Lisso, Peggy Lange, et Carsten Müssig. 2009. « The extracellular EXO protein mediates cell expansion in Arabidopsis leaves ». *BMC Plant Biology* 9 (février): 20. doi:10.1186/1471-2229-9-20.

Schurr, U., et E. -D. Schulze. 1995. « The Concentration of Xylem Sap Constituents in Root Exudate, and in Sap from Intact, Transpiring Castor Bean Plants (Ricinus Communis L.) ». *Plant, Cell & Environment* 18 (4): 409-20. doi:10.1111/j.1365-3040.1995.tb00375.x.

Schwachtje, Jens, Silke Karojet, Ina Thormählen, Carolin Bernholz, Sabine Kunz, Stephan Brouwer, Melanie Schwochow, Karin Köhl, et Joost T. van Dongen. 2011. « A Naturally Associated Rhizobacterium of Arabidopsis thaliana Induces a Starvation-Like Transcriptional Response while Promoting Growth ». *PLOS ONE* 6 (12): e29382. doi:10.1371/journal.pone.0029382.

Schwender, Jörg, Fernando Goffman, John B. Ohlrogge, et Yair Shachar-Hill. 2004. « Rubisco without the Calvin Cycle Improves the Carbon Efficiency of Developing Green Seeds ». *Nature* 432 (7018): 779-82. doi:10.1038/nature03145.

Sekhon, Rajandeep S., Roman Briskine, Candice N. Hirsch, Chad L. Myers, Nathan M. Springer, C. Robin Buell, Natalia de Leon, et Shawn M. Kaeppler. 2013. « Maize Gene Atlas Developed by RNA Sequencing and Comparative Evaluation of Transcriptomes Based on RNA Sequencing and Microarrays ». *PLOS ONE* 8 (4): e61005. doi:10.1371/journal.pone.0061005.

Sgroy, Verónica, Fabricio Cassán, Oscar Masciarelli, María Florencia Del Papa, Antonio Lagares, et Virginia Luna. 2009. « Isolation and Characterization of Endophytic Plant Growth-Promoting (PGPB) or Stress Homeostasis-Regulating (PSHB) Bacteria Associated to the Halophyte Prosopis

Strombulifera ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (2): 371-81. doi:10.1007/s00253-009-2116-3.

Shachar-Hill, Yair. 2007. « Quantifying Flows through Metabolic Networks and the Prospects for Fluxomic Studies of Mycorrhizas ». *New Phytologist* 174 (2): 235-40. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02057.x.

Shahzad, Sher Muhammad, Muhammad Saleem Arif, Muhammad Riaz, Zafar Iqbal, et Muhammad Ashraf. 2013. « PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (Zea mays L.) under fertilized conditions ». *European Journal of Soil Biology* 57: 27-34. doi:10.1016/j.ejsobi.2013.04.002.

Shane, M. W., M. E. McCully, et M. J. Canny. 2000. « Architecture of Branch-Root Junctions in Maize: Structure of the Connecting Xylem and the Porosity of Pit Membranes ». *Annals of Botany* 85 (5): 613-24. doi:10.1006/anbo.2000.1113.

Shao, Hong-Bo, Li-Ye Chu, Gang Wu, Jin-Heng Zhang, Zhao-Hua Lu, et Ya-Chen Hu. 2007. « Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (Triticum aestivum L.) genotypes at tillering stage ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 54 (2): 143-49. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.09.004.

Sharma, Arti, Adil Hussain, Bong-Gyu Mun, Qari Muhammad Imran, Noreen Falak, Sang-Uk Lee, Jae Young Kim, *et al.* 2016. « Comprehensive Analysis of Plant Rapid Alkalization Factor (RALF) Genes ». *Plant Physiology and Biochemistry: PPB* 106 (septembre): 82-90. doi:10.1016/j.plaphy.2016.03.037.

Sharp, Robert E., et Mary E. LeNoble. 2002. « ABA, Ethylene and the Control of Shoot and Root Growth under Water Stress ». *Journal of Experimental Botany* 53 (366): 33-37. doi:10.1093/jexbot/53.366.33.

Sharp, Robert E., Yajun Wu, Gary S. Voetberg, Imad N. Saab, et Mary E. LeNoble. 1994. « Confirmation That Abscisic Acid Accumulation Is Required for Maize Primary Root Elongation at Low Water Potentials ». *Journal of Experimental Botany* 45 (Special Issue): 1743-51. doi:10.1093/jxb/45.Special_Issue.1743.

Shi, Shengjing, Alan E. Richardson, Maureen O'Callaghan, Kristen M. DeAngelis, Eirian E. Jones, Alison Stewart, Mary K. Firestone, et Leo M. Condron. 2011. « Effects of Selected Root Exudate Components on Soil Bacterial Communities ». *FEMS Microbiology Ecology* 77 (3): 600-610. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01150.x.

Shu, Xiao-Li, Thomas Frank, Qing-Yao Shu, et Karl-Heinz Engel. 2008. « Metabolite Profiling of Germinating Rice Seeds ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (24): 11612-20. doi:10.1021/jf802671p.

Shulaev, Vladimir, Diego Cortes, Gad Miller, et Ron Mittler. 2008. « Metabolomics for Plant Stress Response ». *Physiologia Plantarum* 132 (2): 199-208. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x.

Sivasakthi, S., G. Usharani, et P. Saranraj. 2014. « Biocontrol Potentiality of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) - Pseudomonas Fluorescens and Bacillus Subtilis: A Review ». *African Journal of Agricultural Research* 9 (16): 1265-77. doi:10.5897/AJAR2013.7914.

Sobeih, Wagdy Y., Ian C. Dodd, Mark A. Bacon, Donald Grierson, et William J. Davies. 2004. « Long-Distance Signals Regulating Stomatal Conductance and Leaf Growth in Tomato (Lycopersicon Esculentum) Plants Subjected to Partial Root-Zone Drying ». *Journal of Experimental Botany* 55 (407): 2353-63. doi:10.1093/jxb/erh204.

Sonnewald, U., J. Lerchl, R. Zrenner, et W. Frommer. 1994. « Manipulation of Sink-Source Relations in Transgenic Plants ». *Plant, Cell & Environment* 17 (5): 649-58. doi:10.1111/j.1365-3040.1994.tb00156.x.

Soubeyroux, Jean-Michel, N. Kitova, M. Blanchard, J.P. Vidal, E. Martin, et P. Dandin. 2012. « Caractérisation des sècheresses des sols en France et changement climatique : Résultats et applications du projet ClimSec ». *La Météorologie* 78: 21-30. doi:10.4267/2042/47512.

Spaepen, Stijn, Jos Vanderleyden, et Roseline Remans. 2007. « Indole-3-Acetic Acid in Microbial and Microorganism-Plant Signaling ». *FEMS Microbiology Reviews* 31 (4): 425-48. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.

Sripriya, G., Usha Antony, et T. S. Chandra. 1997. « Changes in carbohydrate, free amino acids, organic acids, phytate and HCl extractability of minerals during germination and fermentation of finger millet (Eleusine coracana) ». *Food Chemistry* 58 (4): 345-50. doi:10.1016/S0308-8146(96)00206-3.

Stefan, Marius, Neculai Munteanu, Vasile Stoleru, Marius Mihasan, et Lucian Hritcu. 2013. « Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of

runner bean (Phaseolus coccineus L.) ». *Scientia Horticulturae* 151 (février): 22-29. doi:10.1016/j.scienta.2012.12.006.

Stitt, Mark, et W. Paul Quick. 1989. « Photosynthetic Carbon Partitioning: Its Regulation and Possibilities for Manipulation ». *Physiologia Plantarum* 77 (4): 633-41. doi:10.1111/j.1399-3054.1989.tb05402.x.

Stockhaus, J., U. Schlue, M. Koczor, J. A. Chitty, W. C. Taylor, et P. Westhoff. 1997. « The Promoter of the Gene Encoding the C4 Form of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Directs Mesophyll-Specific Expression in Transgenic C4 Flaveria Spp. » *The Plant Cell* 9 (4): 479-89. doi:10.1105/tpc.9.4.479.

Stokvis, Ellen, Hilde Rosing, et Jos H. Beijnen. 2005. « Stable Isotopically Labeled Internal Standards in Quantitative Bioanalysis Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Necessity or Not? » *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (3): 401-7. doi:10.1002/rcm.1790.

Su, Fan, Cedric Jacquard, Sandra Villaume, Jean Michel, Fanja Rabenoelina, Christophe Clément, Essaid Ait Barka, Sandrine Dhondt-Cordelier, et Nathalie Vaillant-Gaveau. 2015. « Burkholderia phytofirmans PsJN reduces damages to freezing temperature in Arabidopsis thaliana ». *Plant Biotic Interactions* 6: 810. doi:10.3389/fpls.2015.00810.

Subramanian, Senthil, Un-Haing Cho, Carol Keyes, et Oliver Yu. 2009. « Distinct changes in soybean xylem sap proteome in response to pathogenic and symbiotic microbe interactions ». *BMC Plant Biology* 9 (1): 119. doi:10.1186/1471-2229-9-119.

Sulpice, Ronan, Sandra Trenkamp, Matthias Steinfath, Bjorn Usadel, Yves Gibon, Hanna Witucka-Wall, Eva-Theresa Pyl, *et al.* 2010. « Network Analysis of Enzyme Activities and Metabolite Levels and Their Relationship to Biomass in a Large Panel of *Arabidopsis* Accessions ». *The Plant Cell Online* 22 (8): 2872-93. doi:10.1105/tpc.110.076653.

Sun, Wei, Nerea Ubierna, Jian-Ying Ma, Berkley J. Walker, David M. Kramer, et Asaph B. Cousins. 2014. « The Coordination of C4 Photosynthesis and the CO2-Concentrating Mechanism in Maize and Miscanthus × Giganteus in Response to Transient Changes in Light Quality ». *Plant Physiology* 164 (3): 1283-92. doi:10.1104/pp.113.224683.

Sung, Jwakyung, Yeonkyu Sonn, Yejin Lee, Seongsoo Kang, Sangkeun Ha, Hari B. Krishnan, et Taek-Keun Oh. 2015. « Compositional Changes of Selected Amino Acids, Organic Acids, and Soluble Sugars in the Xylem Sap of N, P, or K-Deficient Tomato Plants ». *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 178 (5): 792-97. doi:10.1002/jpln.201500071.

Supek, Fran, Matko Bošnjak, Nives Škunca, et Tomislav Šmuc. 2011. « REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms ». *PLOS ONE* 6 (7): e21800. doi:10.1371/journal.pone.0021800.

Szecowka, Marek, Robert Heise, Takayuki Tohge, Adriano Nunes-Nesi, Daniel Vosloh, Jan Huege, Regina Feil, *et al.* 2013. « Metabolic Fluxes in an Illuminated *Arabidopsis* Rosette ». *The Plant Cell Online* 25 (2): 694-714. doi:10.1105/tpc.112.106989.

Tahir, M., et M. A. Sarwar. 2013. « Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production ». *Pakistan Journal of Life and Social Sciences (Pakistan)*. http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PK2013000670.

Tester, Richard F., John Karkalas, et Xin Qi. 2004. « Starch—composition, fine structure and architecture ». *Journal of Cereal Science* 39 (2): 151-65. doi:10.1016/j.jcs.2003.12.001.

Thaler, Jennifer S., et Richard M. Bostock. 2004. « Interactions Between Abscisic-Acid-Mediated Responses and Plant Resistance to Pathogens and Insects ». *Ecology* 85 (1): 48-58. doi:10.1890/02-0710.

The UniProt Consortium. 2017. « UniProt: the universal protein knowledgebase ». *Nucleic Acids Research* 45 (Database issue): D158-69. doi:10.1093/nar/gkw1099.

Thornber, J. P., et D. H. Northcote. 1961. « Changes in the chemical composition of a cambial cell during its differentiation into xylem and phloem tissue in trees ». *Biochemical Journal* 81 (3): 449-55.

Tian, Tian, Yue Liu, Hengyu Yan, Qi You, Xin Yi, Zhou Du, Wenying Xu, et Zhen Su. 2017. « agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update ». *Nucleic Acids Research* 45 (W1): W122-29. doi:10.1093/nar/gkx382.

Tilak, K. V. B. R., N. Ranganayaki, et C. Manoharachari. 2006. « Synergistic Effects of Plant-Growth Promoting Rhizobacteria and Rhizobium on Nodulation and Nitrogen Fixation by Pigeonpea (Cajanus Cajan) ». *European Journal of Soil Science* 57 (1): 67-71. doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00771.x.

Tilman, David. 1999. « Global Environmental Impacts of Agricultural Expansion: The Need for Sustainable and Efficient Practices ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (11): 5995-6000. doi:10.1073/pnas.96.11.5995.

Tilman, David, Kenneth G. Cassman, Pamela A. Matson, Rosamond Naylor, et Stephen Polasky. 2002. « Agricultural Sustainability and Intensive Production Practices ». *Nature* 418 (6898): 671-77. doi:10.1038/nature01014.

Tomczyk, Anna. 2002. « Changes in the Content of Soluble Sugars in Leaves of Cucumber Plant Infested with Tetranychus Urticae Koch and Treated with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ». In *Acarid Phylogeny and Evolution: Adaptation in Mites and Ticks*, édité par Fabio Bernini, Roberto Nannelli, Giorgio Nuzzaci, et Enrico de Lillo, 393-98. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-017-0611-7_40.

Townsend, Alan R., Robert W. Howarth, Fakhri A. Bazzaz, Mary S. Booth, Cory C. Cleveland, Sharon K. Collinge, Andrew P. Dobson, *et al.* 2003. « Human health effects of a changing global nitrogen cycle ». *Frontiers in Ecology and the Environment* 1 (5): 240-46. doi:10.1890/1540-9295(2003)001[0240:HHEOAC]2.0.CO;2.

Trapnell, Cole, Adam Roberts, Loyal Goff, Geo Pertea, Daehwan Kim, David R. Kelley, Harold Pimentel, Steven L. Salzberg, John L. Rinn, et Lior Pachter. 2012. « Differential Gene and Transcript Expression Analysis of RNA-Seq Experiments with TopHat and Cufflinks ». *Nature Protocols* 7 (3): 562-78. doi:10.1038/nprot.2012.016.

Trouverie, Jacques, Claudine Thévenot, Jean-Paul Rocher, Bruno Sotta, et Jean-Louis Prioul. 2003. « The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf ». *Journal of Experimental Botany* 54 (390): 2177-86. doi:10.1093/jxb/erg234.

Turgeon, Robert, et Shmuel Wolf. 2009. « Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking ». *Annual Review of Plant Biology* 60 (1): 207-21. doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092045.

Turner, Thomas R., Euan K. James, et Philip S. Poole. 2013. « The plant microbiome ». *Genome Biology* 14: 209. doi:10.1186/gb-2013-14-6-209.

Underwood, William. 2012. « The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion ». *Frontiers in plant science* 3 (mai). doi:10.3389/fpls.2012.00085.

United Nation. 2009. « Food Production Must Double by 2050 to Meet Demand from World's Growing Population, Innovative Strategies Needed to Combat Hunger, Experts Tell Second Committee | Meetings Coverage and Press Releases ». https://www.un.org/press/en/2009/gaef3242.doc.htm.

Urbanczyk-Wochniak, Ewa, Alexander Luedemann, Joachim Kopka, Joachim Selbig, Ute Roessner-Tunali, Lothar Willmitzer, et Alisdair R. Fernie. 2003. « Parallel Analysis of Transcript and Metabolic Profiles: A New Approach in Systems Biology ». *EMBO Reports* 4 (10): 989-93. doi:10.1038/sj.embor.embor944.

Vacheron, Jordan, Guilhem Desbrosses, Marie-Lara Bouffaud, Bruno Touraine, Yvan Moënne-Loccoz, Daniel Muller, Laurent Legendre, Florence Wisniewski-Dyé, et Claire Prigent-Combaret. 2013. « Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning ». *Frontiers in Plant Science* 4 (septembre). doi:10.3389/fpls.2013.00356.

Vaclavik, Lucas, Alexander Krynitsky, et Jeanne Rader. 2014. « Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry ». http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267013015201.

Vafadar, Farinaz, Rayhaneh Amooaghaie, et Mahmoud Otroshy. 2014. « Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of Stevia rebaudiana ». *Journal of Plant Interactions* 9 (1): 128-36. doi:10.1080/17429145.2013.779035.

Valverde, Angel, Araceli Burgos, Tiziana Fiscella, Raúl Rivas, Encarna Velázquez, Claudino Rodríguez-Barrueco, Emilio Cervantes, Manuel Chamber, et José-Mariano Igual. 2007. « Differential Effects of Coinoculations with Pseudomonas Jessenii PS06 (a Phosphate-Solubilizing Bacterium) and Mesorhizobium Ciceri C-2/2 Strains on the Growth and Seed Yield of Chickpea under Greenhouse and Field Conditions ». In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 43-50. Developments in Plant and Soil Sciences. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-1-4020-5765-6_5.

Verbruggen, Nathalie, et Christian Hermans. 2008. « Proline Accumulation in Plants: A Review ». *Amino Acids* 35 (4): 753-59. doi:10.1007/s00726-008-0061-6.

Veresoglou, Stavros D., et George Menexes. 2010. « Impact of Inoculation with Azospirillum Spp. on Growth Properties and Seed Yield of Wheat: A Meta-Analysis of Studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008 ». *Plant and Soil* 337 (1-2): 469-80. doi:10.1007/s11104-010-0543-7.

Viant, Mark R., et Ulf Sommer. 2013. « Mass Spectrometry Based Environmental Metabolomics: A Primer and Review ». *Metabolomics* 9 (1): 144-58. doi:10.1007/s11306-012-0412-x.

Wahl, Stefan, et Peter Ryser. 2000. « Root Tissue Structure Is Linked to Ecological Strategies of Grasses ». *New Phytologist* 148 (3): 459-71. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00775.x.

Walker, Vincent. 2012. « Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with Azospirillum, Pseudomonas and Glomus consortium under field conditions - Springer ». http://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-0960-2#page-1.

Walker, Vincent, Cédric Bertrand, Floriant Bellvert, Yvan Moënne-Loccoz, René Bally, et Gilles Comte. 2011a. « Host Plant Secondary Metabolite Profiling Shows a Complex, Strain-Dependent Response of Maize to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria of the Genus Azospirillum ». *The New Phytologist* 189 (2): 494-506. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03484.x.

Wang, Yan-Wen, Si-Ming Chen, Wei-Jie Wang, Xing-Qi Huang, Chang-Fang Zhou, Zhong Zhuang, et Shan Lu. 2016. « The DnaJ-Like Zinc Finger Domain Protein PSA2 Affects Light Acclimation and Chloroplast Development in Arabidopsis Thaliana ». *Frontiers in Plant Science* 7: 360. doi:10.3389/fpls.2016.00360.

Wang, Zhong, Mark Gerstein, et Michael Snyder. 2009. « RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics ». *Nature Reviews Genetics* 10 (1): 57-63. doi:10.1038/nrg2484.

Wardlaw, Ian F. 1990. « Tansley Review No. 27 The Control of Carbon Partitioning in Plants ». *New Phytologist* 116 (3): 341-81. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00524.x.

Watanabe, I., et C. C. Liu. 1992. « Improving Nitrogen-Fixing Systems and Integrating Them into Sustainable Rice Farming ». In *Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture*, édité par J. K. Ladha, T. George, et B. B. Bohlool, 57-67. Developments in Plant and Soil Sciences 49. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-017-0910-1_4.

Weinbaum, Steven A., R. Scott Johnson, et Theodore M. DeJong. 1992. « Causes and Consequences of Overfertilization in Orchards ». *HortTechnology* 2 (1): 112-21.

Werner, Tomáš, Václav Motyka, Miroslav Strnad, et Thomas Schmülling. 2001. « Regulation of Plant Growth by Cytokinin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (18): 10487-92. doi:10.1073/pnas.171304098.

Wezel, Alexander, Marion Casagrande, Florian Celette, Jean-François Vian, Aurélie Ferrer, et Joséphine Peigné. 2014. « Agroecological Practices for Sustainable Agriculture. A Review ». *Agronomy for Sustainable Development* 34 (1): 1-20. doi:10.1007/s13593-013-0180-7.

Wiehe, Wolfgang, et Gisela Höflich. 1995. « Survival of plant growth promoting rhizosphere bacteria in the rhizosphere of different crops and migration to non-inoculated plants under field conditions in north-east Germany ». *Microbiological Research* 150 (2): 201-6. doi:10.1016/S0944-5013(11)80057-1.

Williams, Lorraine E., Remi Lemoine, et Norbert Sauer. 2000. « Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation ». *Trends in Plant Science* 5 (7): 283-90. doi:10.1016/S1360-1385(00)01681-2.

Wingler, Astrid, Peter J. Lea, W. Paul Quick, et Richard C. Leegood. 2000. « Photorespiration: Metabolic Pathways and Their Role in Stress Protection ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 355 (1402): 1517-29. doi:10.1098/rstb.2000.0712.

Winter, H., et S. C. Huber. 2000. « Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and regulation of Activity of Key Enzymes ». *Critical Reviews in Plant Sciences* 19 (1): 31-67. doi:10.1080/07352680091139178.

Wishart, David S., Timothy Jewison, An Chi Guo, Michael Wilson, Craig Knox, Yifeng Liu, Yannick Djoumbou, *et al.* 2013. « HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013 ». *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D801-7. doi:10.1093/nar/gks1065.

Wu, Liang, Mlawule R. Mashego, Jan C. van Dam, Angela M. Proell, Jacobus L. Vinke, Cor Ras, Wouter A. van Winden, Walter M. van Gulik, et Joseph J. Heijnen. 2005. « Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly 13C-labeled cell extracts as internal standards ». *Analytical Biochemistry* 336 (2): 164-71. doi:10.1016/j.ab.2004.09.001.

Yan, Zhinong, M S Reddy, et Joseph W Kloepper. 2003. « Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system ». *Canadian Journal of Microbiology* 49 (6): 383-89. doi:10.1139/w03-051.

Yang, S, Yang H, Grisafi P, Sanchatjate S, Fink Gr, Sun Q, et Hua J. 2006. « The BON/CPN Gene Family Represses Cell Death and Promotes Cell Growth in Arabidopsis. » *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 45 (2): 166-79. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02585.x.

Yong, Jean W. H., S. Chin Wong, D. Stuart Letham, Charles H. Hocart, et Graham D. Farquhar. 2000. « Effects of Elevated [CO2] and Nitrogen Nutrition on Cytokinins in the Xylem Sap and Leaves of Cotton ». *Plant Physiology* 124 (2): 767-80. doi:10.1104/pp.124.2.767.

Youssefi, F., P. H. Brown, et S. A. Weinbaum. 2000. « Relationship between Tree Nitrogen Status, Xylem and Phloem Sap Amino Acid Concentrations, and Apparent Soil Nitrogen Uptake by Almond Trees (Prunus Dulcis). » *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75 (1): 62-68.

Zaeim, Abdolreza Nokhbeh, Mostafa Torkaman, et Hasan Ghasemeeyan. 2017. « Effects of Biofertilizer Application on Growth and Yield of corn (Zea mays L.) : A Review IJSRST, Volume 3, Issue 6, ISSN: 2395-6011 ». http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:ac24nga891sJ:scholar.google.com/+Effects+of+Biofertilizer+Application+on+Growth+and+Yield+of+corn+(Zea+mays+L.)+:+A+Review&hl=fr&as_sdt=0,5&as_vis=1.

Žalud, Zdeněk, Petr Hlavinka, Karel Prokeš, Daniela Semerádová, Balek Jan, et Miroslav Trnka. 2017. « Impacts of water availability and drought on maize yield – A comparison of 16 indicators ». *Agricultural Water Management* 188: 126-35. doi:10.1016/j.agwat.2017.04.007.

Zemrany, Hamdy El, Sonia Czarnes, Paul D. Hallett, Serge Alamercery, René Bally, et Lucile Jocteur Monrozier. 2007. « Early Changes in Root Characteristics of Maize (Zea Mays) Following Seed Inoculation with the PGPR Azospirillum Lipoferum CRT1 ». *Plant and Soil* 291 (1-2): 109-18. doi:10.1007/s11104-006-9178-0.

Zhang, Huiming, Xitao Xie, Mi-Seong Kim, Dmytro A. Kornyeyev, Scott Holaday, et Paul W. Paré. 2008. « Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta ». *The Plant Journal* 56 (2): 264–273. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03593.x.

Zhang, J., et W. J. Davies. 1990. « Changes in the Concentration of ABA in Xylem Sap as a Function of Changing Soil Water Status Can Account for Changes in Leaf Conductance and Growth ». *Plant, Cell & Environment* 13 (3): 277-85. doi:10.1111/j.1365-3040.1990.tb01312.x.

Zhang, Weiwen, Feng Li, et Lei Nie. 2010. « Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies ». *Microbiology* 156 (2): 287-301. doi:10.1099/mic.0.034793-0.