



**HAL**  
open science

# Écologie des populations bactériennes associées aux eucaryotes photosynthétiques: de la rhizosphère à la phycosphère

Odile Berge

► **To cite this version:**

Odile Berge. Écologie des populations bactériennes associées aux eucaryotes photosynthétiques: de la rhizosphère à la phycosphère. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2011. tel-02804155

**HAL Id: tel-02804155**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02804155>**

Submitted on 5 Jun 2020

**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.



**INRA**



Document de synthèse pour attribution  
d'une Habilitation à Diriger des Recherches

**Odile BERGE**

**Chargée de recherches au CNRS**

Mars 2011

**Écologie des populations bactériennes associées  
aux eucaryotes photosynthétiques:  
de la rhizosphère à la phycosphère**

### **Jury provisoire**

Mme Pascale Klett, DR INRA Nancy (Rapportrice)

Mme Gisèle Laguerre, DR INRA Montpellier (Examinatrice)

Mr Marc Trousselier, DR CNRS Montpellier (Président, examinateur)

Mr Matthieu Arlat, Professeur U. Toulouse 3 (Rapporteur)

Mr Frédéric Garabetian, Professeur U. Bordeaux 1 (Rapporteur)

## SOMMAIRE

<b>1. Présentation du dossier</b>	<b>p 4</b>
<b>1 A. Curriculum Vitae</b>	<b>p 4</b>
<b>1 B. Encadrement</b>	<b>p 7</b>
<b>1 C. Publications</b>	<b>p 10</b>
<b>1 D. Congrès</b>	<b>p 13</b>
<b>2. Résumé des travaux : parcours de recherche</b>	<b>P 20</b>
<b>2 A. DEA et thèse (1983-1988)</b>	<b>p 20</b>
1 - Isolement et identification de bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère du maïs.	P 20
2 - Inoculation bactérienne du blé et du maïs : effet sur la croissance et le rendement.	P 21
<b>2 B. Contrat post-doc (1989-1991)</b>	<b>p 21</b>
1 - Inoculation bactérienne du riz au champ. Transfert aux pays de riziculture.	P 21
2 - Caractérisation des bactéries fixatrices d'azote du blé et du maïs.	P 22
<b>2 C. Recrutement au CNRS, Nancy (1991-1996)</b>	<b>p 22</b>
1 - Structure des populations de <i>Paenibacillus polymyxa</i> de la rhizosphère du blé.	P 22
2 - Effet de la production d'exopolysaccharides par <i>P. polymyxa</i> sur le sol rhizosphérique.	p 23
3 - Taxonomie systématique et diversité bactérienne.	P 24
<b>2 D. Mobilité à Cadarache (1996-2009)</b>	<b>p 25</b>
1 - Diversité et rôle des bactéries productrices d'EPS de la rhizosphère.	p 25
2 - Diversité moléculaire des bactéries rhizosphériques dégradant les exsudats racinaires.	P 26
<b>2 E. Mobilité à Avignon-Montfavet (2009- aujourd'hui)</b>	<b>p 28</b>
Rôle des microalgues d'eau douce dans la structure des populations et l'évolution de la bactérie phytopathogène <i>P. syringae</i>	p 28

### 3. Quelques illustrations des recherches p 29

#### Introduction : la rhizosphère p 29

#### 3 A. Les bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère des céréales p 31

- 1 - Des nouvelles espèces fixatrices d' $N_2$  dans la rhizosphère du blé et du maïs. p 31
- 2 - Diversité des populations de *Paenibacillus polymyxa* et pratiques culturales. P 34
- 3 - Effet de l'histoire culturale des sols : de l'Algérie à l'Australie. P 38

#### 3 B. Rôle des bactéries productrices d'exopolysaccharides dans la rhizosphère des plantes p 40

- 1 - Effet de l'inoculation de *Rhizobium* sp. YAS34 sur le sol rhizosphérique des plantes. P 41
- 2 - Diversité des communautés bactériennes productrices d'exopolysaccharides. P 43

#### 3 C. Diversité moléculaire des microorganismes du sol par traçage isotopique de l'ADN p 50

- 1 - Identification des bactéries cellulolytiques d'un sol par DNA-SIP. P 51
- 2 - Traçage isotopique dans la rhizosphère. P 53

#### De la rhizosphère.....à la phycosphère p 57

### 4. Projet de recherche p 58

#### 4 A. Contexte scientifique p 58

- 1 - *P. syringae* bactérie épiphyte, pathogène des plantes. P 58
- 2 - Données récentes : *P. syringae* bactérie de l'environnement. P 59
- 3 - Les interactions biotiques dans les biofilms épilithes naturels. P 62

#### 4 B. Programme scientifique p 64

- 1 - Caractérisation des interactions *P. syringae* - algues. Étude des mécanismes impliqués. P 64
- 2 - Évaluation de l'impact de ces interactions sur la fitness de populations de *P. syringae*. P 65
- 3 - Étude de la dynamique des *P. syringae* dans les biofilms contenant des algues. P 66

### 5. Références bibliographiques p 68

### 6. Quelques publications importantes p 76

# 1. Présentation du dossier de Recherche

## 1 A. Curriculum Vitae

Odile BERGE  
577 chemin du Marderic  
84530 Villelaure  
Tel : 04 90 09 90 76

**Spécialité : Écologie microbienne**

*Née le 18 Novembre 1960 à Beauvais (60)*  
*Nationalité française*  
*Mariée, 2 enfants*

### Situation actuelle

Chargée de recherche classe 1 CNRS Section 29 (Mise à disposition à l'INRA depuis 1/02/2009)  
Chercheuse dans l'Équipe « Bactériologie » de l'Unité de Pathologie Végétale UR407, INRA-Avignon

**Thématique : Écologie des agents phytopathogènes hors des agrosystèmes :  
interaction algues - Pseudomonas syringae dans les biofilms aquatiques**

### Formation Universitaire

- 1984 - 1988:** **Doctorat** d'agronomie de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL)  
Laboratoire d'Ecologie microbienne de la Rhizosphère, CPB, CNRS, Nancy  
Direction : Thierry Heulin, Soutenance le 2/11/1988.  
*Étude et inoculation des Bacillus fixateurs d'azote de la rhizosphère du maïs*
- 1983 - 1984:** **DEA d'Agronomie** de l'INPL  
Laboratoire d'Ecologie microbienne de la Rhizosphère, CPB, CNRS, Nancy  
Direction : Thierry Heulin, Soutenance sept 1984.  
*Inoculation du blé par une souche bactérienne de Bacillus polymyxa fixatrice d'azote*
- 1981 -1984:** **Ingénieur Agronome**, spécialité "Phytotechnie", de l'ENSAIA,  
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires",  
INPL, Nancy.
- 1979 – 1981:** **DEUG B** Biologie Biochimie (*mention B*), Université Paris VI Jussieu

### Expériences de recherche après le doctorat

- 1989 - 1991:** Laboratoire d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère, CPB, CNRS Nancy  
Financement Contrat CEE.  
*Isolement et inoculation de bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère du riz. Transfert aux partenaires Vietnamiens et en Egyptiens*
- 1991 - 1996:** Laboratoire d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère (LEMIR), CPB, CNRS Nancy  
*Isolement et diversité des bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère des céréales. Structure des populations de Paenibacillus polymyxa de la rhizosphère du blé. Taxonomie et systématique bactérienne*
- 1996 – 2009** LEMIR, UMR 163, CNRS-CEA, puis UMR 6191 CNRS-CEA-Univ Mediterannee  
St Paul-Lez-Durance (13)  
*Diversité et taxonomie des Paenibacillus polymyxa de la rhizosphère du blé*  
*Diversité et rôle des bactéries productrices d'EPS de la rhizosphère des plantes*  
*Diversité des populations actives du sol et de la rhizosphère par traçage isotopique (DNA-SIP)*

## Carrière et mobilités au CNRS

<b>1991</b>	Recrutement CNRS grade CR2, CPB Nancy
<b>1995</b>	Promotion au grade de CR1, CPB Nancy
<b>1996</b>	Mobilité géographique dans une UMR CNRS-CEA à Cadarache (13)
<b>2009</b>	Mobilité géographique et thématique : mise à disposition à l'INRA d'Avignon

## Travaux d'expertise

### Relectrice des revues

ISME journal (2010)  
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) (2005, 2006, 2007, 2008, 2009)  
Research in Microbiology (Res in Mic) (2008 2009, 2010)  
Applied Soil Ecology (2008)  
Archives of Agronomy and Soil Science (2008)  
Acta Agriculturae Scandinavica Section B. Soil and Plant Science (2007)  
CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources (2007)  
European Journal of Soil Biology (2006)  
Canadian Journal of Microbiology  
FEMS Letters (2006)  
FEMS Microbiology Ecology (2010)

### Jury de thèse

A. EL SHEIKHA, Montpellier, Déc 2010  
S. GUEMOURI, Univ H. Boumedienne, Alger, Déc 2006  
T. LERCH, CNRS-INRA-Univ. Paris 6-ENS-ENSCP Thiverval-Grignon, Sept 2006  
M-H. GUINEBRETIERE. Univ d'Avignon, Examinatrice, Déc 2001  
P. VANDENKOORNHUYSE, Univ Nancy I, Examinatrice, Nov 1998  
V. TRAN VAN, 1994

### Membre de Comités de pilotage de Thèse

Lamia EL MOUJAHID, LEM, CNRS-Université Lyon1, INRA 2007-2010  
Lucie ZINGER, LECA, CNRS, Univ J. Fourier, 2008  
Bahar SHAHNAVAZ, LECA, CNRS, Univ J. Fourier, 2008  
Albert JACOBS, INRA Avignon, Bourse INRA, 2004-2007  
Olivia DARCHEVILLE IRSN, Bourse IRSN-EDF, 2004-2007  
Hélène SAUVAGE, ESITPA, Université de Rouen, 2003-2007

### Comité d'évaluation

Membre commission d'évaluation de l'UMR Agronomie-Environnement ENSAIA Nancy. Mars 2004.

### Jury de concours de recrutement

Membre du Jury de concours INRA IE 005, Décembre 2000

### Expertise de projet

Experte pour le programme CNRS Interface Physique, Chimie, Biologie  
Experte pour l'ANR  
Experte pour la Fondation Internationale pour la Science (IFS), projets de séjour de chercheur.

### **Membre de conseils**

Membre du conseil scientifique du réseau Biodiversité et Ecologie Microbienne 1994-2000

Membre élue du Conseil d'Unité du DEVM et de l'UMR 163. Février 1998-2000.

Membre élue du Conseil d'Unité (CU) du DEVM Novembre 2004-2006, Représentante du CU du DEVM au Conseil de Direction des Sciences du Vivant du CEA.

### **Enseignement vulgarisation**

Depuis 2005, 9 h de cours et TD « Introduction à la microbiologie du sol ». Master Agrosciences, 1ère année "Hydro-géologie et Environnement" Module "Microbiologie et transformation" Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UFR Sciences Exactes et de la Nature.

### **Sociétés savantes**

**Membres des** Société Française de Microbiologie (SFM)  
Société Française de Phytopathologie (SFP)  
Société Française d'Écologie (SFE)  
Association Francophone d'Ecologie Microbienne" (AFEM).  
Association "Femmes et Science"  
Association "Sauvons la Recherche"

## 1 B. Expérience d'encadrement

### Co-encadrement de Thèse,

#### 2009 Mélanie BRESSAN

Doctorat de l'Univ de la Méditerranée, Microbiologie et Biotechnologie Végétale  
*Traçage isotopique de l'ADN dans des milieux complexes : une nouvelle approche moléculaire pour identifier les microorganismes réellement actifs au sein d'une communauté.*

Co-encadrement : 60 % (W. ACHOUAK 40 %)

Financement : Bourse CEA CFR Oct 2005 - Avr 2009

**1 publication** : Bressan M. et al. **2009**. The ISME Journal 3 (11) 1243-57.

**Devenir** : Post-doc CIRAD Montpellier 2009-2010

#### 2008 Feth El Zahar HAICHAR

Doctorat de l'Univ de la Méditerranée, Microbiologie et Biotechnologie Végétale  
*Impact des exsudats racinaires dans la sélection des taxa et fonctions bactériens dans la rhizosphère*

Co-encadrement : 30 % (W. Achouak 70%)

Financement : Bourse CNRS BDI

**4 publications** : Haichar F. Z. et al. **2008**. The ISME Journal 2, 1221 - 1230

Darcheville O. et al. **2008**. *J. Env. Rad.*, 99, (6), 981-992.

Haichar F. Z. et al. **2007**. *Environ. Microbiol.* 9 (3), 625-634.

Bernard L. et al. **2007**. *Environ. Microbiol.* 9 (3), 752-764.

**Devenir** : Post-doc Univ Lausanne, Suisse 2008- 2010 – Maître de Conférence, Écologie Microbienne, Univ C. Bernard, Lyon (recrut sept 2010).

#### 2006 Souad GUEMOURI

Thèse d'Etat algérienne soutenue le 16 Décembre 2006 à Alger

*Diversité et activité des Paenibacillus de la rhizosphère du blé en Algérie*

Co-encadrement : 50 % (T. Heulin 50 %)

**1 publication** : Guemouri-Athmani S. et al. **2000**. *Eur. J. Soil Biol.*, 36, 1-11.

**Devenir** : Enseignante en Microbiologie à l'Univ Houari Boumediène d'Alger, Algérie.

### Participation à l'encadrement de Thèse

#### 2007 Muhammad Ashraff

Ph. D. de l'Univ du Punjab, Lahore

*Role of exo-polysaccharide producing (EPS) bacteria in improving fertility of the salt-affected soil*

Co-encadrement : 20 % (Stage de 6 mois en France)

**2 publications** : Ashraf M. et al. **2004**. *Biol. & Fert. Soils*, 40, (3), 157 – 162

Ashraf M. et al. **1999**. *Pak. J. of Biol. Sciences*, 2 (1), 201-206.

**Devenir** : Chercheur, Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), Faisalabad, Pakistan.

#### 1994 Tran Van Van

Doctorat de l'Univ de Nancy

*Burkholderia vietnamensis sp. nov : taxonomie et effets de l'inoculation sur le riz au Viêt-nam*

Participation à l'encadrement : 20 %

**5 publications** : Tran Van V. et al. **2000**. *Plant Soil*, 218, 273-284

Tran Van V. et al. **1997**. *Can. J. Microbiol.*, 43, 486-490.

Tran Van V. et al. **1996**. *agronomie*, 16, 479-491.

Meyer J. M. et al. **1995. BioMetals**, 8, 309-317.

Tran Van V. et al. **1994. agronomie**, 14, 697-707.

**Devenir** : Ingénieur CNRS, Écologie Microbienne, Univ C. Bernard, Lyon

#### **1987** Nabil Omar

Doctorat de l'Univ de Nancy

*Fixation d'azote dans la rhizosphère du riz. Sélection d'une souche et son inoculation en Egypte*

Participation à l'encadrement : 10 %

**1 publication** : Omar N. **1992. Symbiosis**, 13, 281-289.

Devenir : Chef de département, Soils, Water and Environment Res.Inst., ARC, Giza, Egypte.

Responsable scientifique de l'unité de production d'inoculum destiné à l'agriculture « Cerealin Biofertilizer Production Unit » Ministry of Agriculture, Egypt.

#### **Encadrement de Master 2/DEA**

2005 Jérôme JOSEPH Master Pro Univ L Pasteur Strasbourg 6 mois, encadrement 50 %

2004 Feth el Zahar HAICHAR DEA Univ Méditerranée 9 mois, encadrement 80 %

1996 Sonia CZARNES DEA de Pédologie, Univ Nancy, 6 mois encadrement 60 %

1995 Muriel BOURRAIN DEA d'Écologie Microbienne, Univ Cl Bernard, Lyon I, 6 mois encadrement 50 %

1994 Ashraf HASSAN Master of Science, Univ du Caire, Égypte 20 %

1993 Wissam ZAKARIA Master of Science, Univ du Caire, Égypte 20 %

1992 M. YAMANI Master of Science, Univ du Caire, Égypte 20 %

#### **Encadrement de Master 1/ Maitrise**

2007 Ludovic BESAURY « *Transferts bactériens dans les sols* » Master 1 Univ Pau

2005 Lauriane JAKOB « *DNA-RNA SIP* » Master 1 Univ Montpellier

2003 Justine THOMAS « *Bactéries productrices d'EPS* » Maîtrise Univ Méditerranée

2003 Feth el Zahar HAICHAR « *Aggrégation du sol par les bactéries* » Maîtrise Univ Méditerranée

2003 Julie MAUREL « *Taxonomie des Rhizobium* » Maîtrise Univ Cl Bernard, Lyon I

2001 Franck COURARD « *Bactéries productrice d'EPS* » Maîtrise Univ de Rouen

2001 Justine THOMAS « *Taxonomie des Rhizobium* » Licence Univ Méditerranée

1999 Marc TANTI « *Interaction P. polymyxa-blé* » Maîtrise Univ Méditerranée

1996 Josselin BOMONT « *Mise au point technique d'hybridation ADN :ADN* » Magister Univ Nancy

#### **Encadrement autres stagiaires**

2010 Valentin DEBREYNE « *Coculture C. reinardhtii-P. syringae* » 3<sup>e</sup> année ingénieur ISA-Lille

2006 Raphaël SAGLIOCCO « *Colmatage de gouteurs par des biofilms* » Licence Univ Louis Pasteur Strasbourg

2004 Lise RUFINO « *Microbiologie de la rhizosphère* » Licence Univ P. Cézanne

2003 Marion VALENTI « *Microbiologie des transferts dans le sol* » Licence Univ L. Pasteur Strasbourg

2002 Claire BESTAGNE « *Inoculation de bactéries productrices d'EPS* » DUT-1 IUT Alpes de Haute Provence

2002 Géraldine MARTINEZ « *Microbiologie du sol* » Licence de Biologie, Univ de Provence

1998 Marie-Hélène GUINEBRETIERE, « *Génotypage et taxonomie des Bacillus des aliments* » IE INRA-Av

1998 Eric GOUNANT « *Inoculation de P. polymyxa au blé* » DEUG 2 Univ P. Cézanne

1997 Eric GOUNANT « *Diversité intraspécifique de P. polymyxa du blé* » DEUG 1 Univ P. Cézanne

1997 Nathalie RUGANI « *Typage moléculaire des Bacillus du sol* » MC, Univ Aix-Mrs III

1995 P. HUBER « *Isolement P. polymyxa du blé* » BTS Bio Nancy

1994 Mireille Grandjean « Inoculation du blé par un mutant P. polymyxa LS- » Stage ingé. ENSAIA  
1994 Jean-François Triscos « Agrégation rhizoshérique du blé » Stage ingé. ENSAIA

#### Accueil chercheurs : études taxonomiques

2006 Céline VIDAL « *Taxonomie des Mesorhizobium de luzerne sauvage* » Doctorat INRA Montpellier  
2006 Sylvie PAGES « *Taxonomie de Xenorhabdus et Photorhabdus* » Ingénieure Univ Montpellier  
2006 Valérie GEOFFROY « *Taxonomie d'espèces de Pseudomonas* » Mait Conf Univ Louis-Pasteur, Strasbourg  
2005 Marion LESAUX « *Identification d'espèces de Pseudomonas* » Chercheuse INRA d'Angers  
2004 Muriel NICODEME « *Taxonomie de Pseudomonas lactiques* » Doctorat Univ Nancy  
2004 Yacov DAVIDOV « *Taxonomie de bactéries prédatrices* » Doctorat Univ of Jerusalem, Israël  
2004 Alvaro PEIX « *Description d'une nouvelle espèce de Pseudomonas* » Post doctorat INRA Dijon

#### Encadrement techniciens de laboratoire

2008 Agnès GASTAUD « *Microflore des sols de culture de colza* » AT CEA interim, Cadarache  
2007 Marie-Anne RONCATO « *Hybridation ADN :ADN technique froide* » T CEA, Cadarache  
2000-2004 Géraldine BRANDELET « *Taxonomie-Isolement-Inoculation-Agrégation* » T CEA, Cadarache  
1995-96 Marie-Josée BELGY, « *Hybridation ADN :ADN, technique radioactive* », T CNRS, CPB Nancy  
1995-96 Geneviève JEANDAT « *Isolement, purification de P.polymyxa du blé* » AT CNRS, CPB Nancy

## 1 C. Liste des publications

### Revue rang A

1. Bressan M. Roncato M.A., Bellvert F., Comte G., Haichar F.Z., Achouak W. & **Berge O.**, 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. **The ISME J.** 3 (11), 1243-57.
2. Vidal C., Chantreuil C., **Berge O.**, Maure L., Escarré J., Béna G., Brunel B. & Cleyet-Marel J.-C. 2009 *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a novel metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneria* growing on metalcolous soil in Languedoc, France. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59, 850-55.
3. **Berge O.**, Lodhi A., Brandelet G., Santaella C., Roncato M., Christen R., Heulin T. & Achouak W. 2009. *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres . **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59, 367-72.
4. Santaella C., Schue M., **Berge O.**, Heulin T. & Achouak W. 2008. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. **Environ. Microbiol.** 10 (8), 2150 – 2163.
5. Haichar F. Z., Marol C., **Berge O.**, Rangel-Castro J. I., Prosser J. I., Balesdent J., Heulin T. & Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME J.** 2, 1221-30.
6. Darcheville O., Février L., Haichar F.Z., **Berge O.**, Martin-Garin A. & Renault P.. 2008. Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states. **J. Env. Rad.** 99 (6), 981-92.
7. Haichar F. Z., Achouak W., Christen R., Heulin T., Marol C., Marais M. F., Mougél C., Ranjard L., Balesdent J. & **Berge O.** 2007. Identification of cellulolytic bacteria in soil by Stable Isotope Probing. **Environ. Microbiol.** 9 (3), 625-34.
8. Bernard L., Mougél C., Maron P.A., Nowak V., Lévêque J., Henault C., Haichar F.Z., **Berge O.**, Marol C., Balesdent J., Gibiat F., Lemanceau P. & Ranjard L. 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from <sup>13</sup>C labeled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. **Environ. Microbiol.** 9 (3), 752-64.
9. Lodhi-Hassan A., Heulin T., Milas M., Heyraud A., Achouak W., Berge O., Deline L., Sanhaji G., Bresin A. 2006. Nouveau polysaccharide, son procédé de préparation et ses utilisations notamment dans le domaine cosmétique. **Dépôt de Brevet n° 06/08840** le 9 octobre 2006.
10. Ehling-Schulz M., Guinebretière M.H., Monthán A., **Berge O.**, Fricker M. & Svensson B. 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 260, 232-40.
11. Peix A., **Berge O.**, Rivas R., Abril A. & Velasquez E. 2005. *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba, Argentina. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55, 1107-12.
12. Ashraf M., Hasnain S., **Berge O.** & Mahmood T. 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. **Biol. & Fert. Soils** 40 (3), 157-62.
13. Morris C. E., Bardin M., **Berge O.**, Frey-Klett P., Fromin N., G, Guinebretière M. H., Lebaron P., Thiéry J. & Trousselier M. 2002. Biodiversity of microbial ecosystems: approaches to experimental design and hypothesis testing in the primary scientific literature from 1975 to 1999. **Microbiol. and Mol. Biol. Rev.** 66(4) 592-616.
14. **Berge O.**, Guinebretière M.H., Achouak W., Normand P. & Heulin T. 2002. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52, 607-616.
15. Guinebretière M.H., **Berge O.**, Normand P., Morris C., Carlin F. & Nguyen-the C. 2001. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and

- comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. **Appl. Environ. Microbiol.** 67 (10), 4520-30.
16. Guemouri-Athmani S., **Berge O.**, Bourrain M., Mavingui P., Thiéry J. M., Bhatnagar T. & Heulin T. **2000**. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. **Eur. J. Soil Biol.** 36, 1-11.
  17. Lebuhn M., Achouak W., Schlöter M., **Berge O.**, Meier H., Barakat M., Hartmann A. & Heulin T. **2000**. Taxonomic characterisation of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50, 2207-23.
  18. Tran Van V., **Berge O.**, Ngo Ké S., Balandreau J. & Heulin T., **2000**. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant Soil**, 218, 273-84.
  19. Bezzate S., Aymerich S., Chambert R., Czarnes S., **Berge O.** & Heulin T. **2000**. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. **Environ. Microbiol.** 2 (3), 333-42.
  20. Ashraf M., **Berge O.**, Azam F. & Heulin T. **1999**. Bacterial exopolysaccharides and productivity of salt affected soils: 1. Diversity of exopolysaccharide-producing bacteria isolated from the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in normal and saline Pakistani soils. **Pak. J. of Biol. Sciences** 2 (1), 201-06.
  21. Tran Van V., Ngo Ké S., **Berge O.**, Faure D., Bally R., Hebbar P. & Heulin T. **1997**. Isolation of *Azospirillum lipoferum* from the rhizosphere of rice by a new, simple method. **Can. J. Microbiol.**, 43, 486-90.
  22. Frey P., Frey-Klett P., Garbaye J., **Berge O.** & Heulin T. **1997**. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent Pseudomonads associated with the *Douglas Fir-Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (5), 1852-60.
  23. Tran Van V., **Berge O.**, Balandreau J., Ngo Ké S. & Heulin T. **1996**. Isolement et activité nitrogénasique de *Burkholderia vietnamiensis*, bactérie fixatrice d'azote associée au riz (*Oryza sativa* L.) cultivé sur un sol sulfaté du Viêt-Nam. **agronomie** 16, 479-91.
  24. Meyer J. M., Tran Van V., Stintzi A., **Berge O.** & Winkelmann G. **1995**. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*). **BioMetals** 8, 309-17.
  25. Tran Van V., Mavingui P., **Berge O.**, Balandreau J. & Heulin T. **1994**. Promotion de croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolée d'un sol sulfaté acide du Viêt-nam. **agronomie**, 14 697-707.
  26. Heulin T., **Berge O.**, Hebbar P., Gouzou L. & Balandreau J. **1994**. *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with wheat roots in french soils. **Eur. J. Soil Biol.** 30 (1), 35-42.
  27. Omar N., **Berge O.**, El-Sayed S. A. & Balandreau J. **1992**. Whey as a growth medium for two spp. of *Azospirillum* grown in batch culture. **Zentralbl. Mikrobiol.** 148 284-88.
  28. Omar N., **Berge O.**, Shalaan S. N., Hubert J. L., Heulin T. & Balandreau J. **1992**. Inoculation of rice with *Azospirillum brasilense* in Egypt. Results of five different trials between 1985 and 1990. **Symbiosis** 13, 281-89.
  29. Omar N., **Berge O.**, Hassanein E. & Shalan S. **1992**. *In vitro* and *in situ* effects of herbicide Thiobencarb on rice-*Azospirillum* association. **Symbiosis** 13, 55-63.
  30. Mavingui P., Laguerre G., **Berge O.** & Heulin T. **1992**. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 1894-1903.
  31. Hebbar P., **Berge O.**, Heulin T. & Singh S. P. **1991**. Bacterial antagonists of sunflower (*Helianthus annuus* L.) fungal pathogens. **Plant Soil** 133, 131-40.
  32. **Berge O.**, Heulin T., Achouak W., Richard C. Bally R. & Balandreau J. **1991a**. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium abundant in the rhizosphere of wheat and maize. **Can. J. Microbiol.** 37, 195-203.

33. **Berge O.**, Heulin T. & Balandreau J. **1991b**. Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. **Biol. Fertil. Soils** 11, 210-15.
34. Mavingui P., **Berge O.** & Heulin T. **1990**. Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. **Symbiosis** 9, 215-21.
35. **Berge O.**, Fages J., Mulard D. & Balandreau J. **1990**. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop yield in field grown maize. **Symbiosis** 9, 259-66.

### Chapitres d'ouvrages

- **Berge O.**, Mavingui P. & Heulin T. **2010**. Exploring diversity of cultivable aerobic endospore-forming bacteria: from pasteurization to procedures without heat-shock selection. In "Aerobic, endospore-forming soil bacteria" Edited by N. A Logan & P. De Vos. Springer. Sous-presse.
- **Berge O.** & Achouak W. **2007**. Outils de biologie moléculaire pour la caractérisation des populations bactériennes des biofilms. In « Biodétérioration des matériaux. Action des microorganismes, de l'échelle nanométrique à l'échelle macroscopique ». Chapitre IX. Ed. Fritz-Feugeas F., Cornet A., Tribollet B. Ellipses, Paris.
- **Berge O.**, Brandelet G. & Heulin T. **2006**. Ratio of root-adhering soil (RAS) to root tissue (RT) dry masses (RAS/RT ratio), i.e. rhizosphere soil aggregation, In "Handbook of methods used in rhizosphere research", Chap 1.3 : Sampling of Rhizosphere soil and collection of rhizosphere soil solution . Ed A. Göttlein. (Cost 631 "Understanding and modelling Plant-soil interactions in the rhizosphere Environment)
- **Berge O.**, Balesdent J., Haichar F. Z., Marol C. & Achouak W. **2006**. Root exudate-consuming microbial community structure. in" Handbook of methods used in rhizosphere research", Chap 4.4 : Gene expression of single species and communities. Ed F. Martin-Laurent. (Cost 631 "Understanding and modelling Plant-soil interactions in the rhizosphere Environment)
- Heulin T. & **Berge O.** **1994**. Écologie des bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère des céréales : mieux décrire pour mieux comprendre. In: "*Recent Developments in Biological Nitrogen Fixation Research in Africa*". Eds : M. Sadiki and A. Hilali, IAV Hassan II, Rabat, pp. 500-30.

### Autres publications

- Balesdent J., Haichar F. Z. & **Berge O.** 2006. Couplages isotopes stables outils moléculaires en écologie microbienne. **INRA Mensuel**, dossier "Ecologie microbienne".
- Balesdent J., Haichar F. Z. & **Berge O.** 2006. Couplages isotopes stables outils moléculaires en écologie microbienne. **Biofutur** 268, 33 - 36.

## 1 D. Communications dans les congrès

### Conférences invitées

- Berge O.**, Haichar F. E. Z., Derrien D., Santaella C., Péan M., Marol C., Heulin T., Achouak W., & Balesdent J. **2006**. Traçage matières organiques en France. Etat de l'art et perspectives. Réseau Matières Organiques – Groupe français de l'IHSS (22 au 24 janvier 2006 à Toulon)
- Bezzate S., Aymerich S., Chambert R., Czarnes S., **Berge O.** & Heulin T. **1999**. Role of exopolysaccharide production by *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere soil aggregation. Conférence invitée au Workshop : « Microbial functions and soil quality ». EU-COST-action 831. Working group 2. Munich, 6-7 may 1999.

### Communications (orales ou affiches) dans les congrès

#### 2011

- Berge O.**, Monteil C., Glaux C., Guilbaud C., Morris C. E. **2011**. Biodiversité microbienne dans les cours d'eau du bassin de la Durance : conséquences de la présence de bactéries phytopathogènes dans les biofilms. Colloque International, « Usages écologiques, économiques et sociaux de l'eau agricole en Méditerranée ». Univ de Provence, Marseille, 20-21 janv. (Affiche)

#### 2010

- Berge O.**, Monteil C., Glaux C., Guilbaud C., Leyronas C., Moudjahidou D. D., Rimet F., Morris C. E. **2010**. Évolution du pouvoir pathogène d'une bactérie phytopathogène en dehors des zones agricoles. *Impact des biofilms aquatiques sur la structure des populations de Pseudomonas syringae* « Écologie 2010 » Colloque national d'Écologie scientifique, Montpellier 2-4 sept 2010. (Affiche).
- Ashraf M. and **Berge O.** **2010**. Bacterial exo-polysaccharides: A biological tool for reclamation of the salt-affected soils. In: Abstracts Book "International Conference on Soil Classification and Reclamation of Degraded Lands in Arid Environments and Launching of Abu Dhabi Soil Survey Report. Abu Dhabi, UAE, May 17-19, 2010. 71p. (Affiche).

#### 2008

- Bardy M., **Berge O.**, Haichar F. Z., Derenne S., Fritsch E. **2008**. Changes in bacterial communities along a Latosol-Podzol sequence of the upper Amazon basin. Poster de MB au congrès EUROSOL, Vienne, Autriche 25 août 2008. (Affiche).
- Bressan M., Achouak W., Marol C., Haichar F.Z., Santaella C., Krouti M. & **Berge O.** **2008**. Effet d'un nouveau glucosinolate produit par *Arabidopsis thaliana* sur les communautés microbiennes actives de la rhizosphère. Une approche par traçage isotopique de l'ADN (DNA-SIP). 4è Rencontres Plante-bactéries, Aussois 14-18 janvier. (Communication orale, M. Bressan).
- Vidal C., Brunel B., Chantreuil C, Maure L., **Berge O.**, Heulin K., Escarré J. & Cleyet-Marel J-C. **2008**. Mise en évidence d'une bactérie symbiotique particulièrement adaptée à une plante métallicole. 4è Rencontres Plante-bactéries, 14-18 janvier Aussois. (Com orale de C. Vidal).

#### 2007

- Derrien, D., Marol, C., Haichar, F.Z., **Berge, O.** & Balesdent J. 2007. Contribution of microbial recycling versus stabilization mechanisms to the formation of the carbohydrate pool in soils. ESF Final Conferenc, the Role of Soils in the Terrestrial Carbon Balance. 20.-22. November 2007, Abbaye des Prémontrés, Pont-à-Mousson, France (Affiche).

- Haichar FZ., Christen R., Marol C., **Berge O.**, Balesdent J., Heulin T. & Achouak W. **2007**. Plant Host habitat and root exudates shape soil microbial community structure. Com orale de FZ Haichar, au troisième colloque d'Écologie Microbienne de l'AFEM, La Grande-Motte 15-18 Octobre 2007. (Com orale de FZ Haichar).
- Bressan M., Achouak W., Marol C., Santaella C., Krouti M., & **Berge O.** **2007**. Effet d'un nouveau glucosinolate produit par *Arabidopsis thaliana* sur les communautés microbiennes actives de la rhizosphère. 3ème colloque d'Écologie Microbienne de l'AFEM, La Grande-Motte 15-18 Octobre 2007 (Affiche).
- Vidal C., Brunel B., Chantreuil C, Maure L., **Berge O.**, Heulin K., Lefèvre C., Escarré J. & Cleyet-Marel J-C. **2007**. Mise en évidence d'une bactérie symbiotique particulièrement adaptée à un milieu riche en métaux. Com orale de C. Vidal au troisième colloque d'Écologie Microbienne de l'AFEM, La Grande-Motte 15-18 Octobre 2007 (Com orale de C. Vidal).
- Bernard L., Mougél C., Maron A., Nowak V., Lévêque J., Henault C., Haichar FZ., **Berge O.**, Marol C., Balesdent J., Gibiat F., Lemanceau P., Ranjard L. Analyse de la dynamique et identification des populations microbiennes impliquées dans la minéralisation d'un résidu de blé par les techniques de DNA-/RNA-SIP. POSTER de Bernard L., au troisième colloque d'Écologie Microbienne de l'AFEM, La Grande-Motte 15-18 Octobre 2007.
- Derrien, D., Marol, C., Haichar, F.Z, **Berge, O.** and Balesdent J. Stabilisation, degradation and biosyntheses of neutral carbohydrate in soil: a study on various, timescales using 13C labelling. POSTER, 3rd International Conference on Mechanisms of Organic Matter Stabilisation and Destabilisation in Soils and Sediments, in Adelaide (Australia) 23-26 September 2007
- Haichar F Z, Marol C., Christen R., **Berge O.**, Balesdent J. & Achouak W. **2007**. Stable isotope probing of active bacterial community in the rhizosphere Poster Rhizosphere 2 conference, Montpellier France, 26 au 31 aout 2007
- Bressan M, Achouak W, Marol C, F Z Haichar, Gibiat F, Krouti M, **Berge O.** **2007**. Modification of bacterial diversity by specific plant root exudates. *Novel DNA Stable-Isotope-Probing approach in Arabidopsis thaliana rhizosphere*. Poster Rhizosphere 2 conference, Montpellier France 26 au 31 aout 2007

---

## 2006

- Achouak W., **Berge O.** 2006 Outils de biologie moléculaire pour l'étude des bactéries des biofilms. Présentation orale, à l'École thématique « OBERNAI 8-13 octobre 2006.
- Haichar FEZ, Achouak W, Marol C, Heulin T, Balesdent J & **Berge O.**, 2006 Traçage isotopique de l'ADN des communautés actives de la rhizosphère. Présentation orale de FEZ Haichar 7èmes rencontres Plantes-Bactéries (20-24 Mars 2006 à Aussois)
- Bernard L., Mougél C., Maron P. A., Nowak V., Haichar F. Z., Henault C., Lévêque J., **Berge O.**, Balesdent J., Lemanceau P. et Ranjard L. **2006**. Dynamique et identification des populations microbiennes telluriques impliquées dans la dégradation des résidus végétaux par le couplage de techniques moléculaires et isotopiques. Etat de l'art et perspectives. Réseau Matières Organiques – Groupe français de l'IHSS (22 au 24 janvier 2006 à Toulon)

---

## 2005

- Balesdent J. **Berge O.** Exemple de couplages isotopes/génomique en Écologie Microbienne du sol.. Journée d'animation du réseau INRA ECOMIC Écologie Microbienne du sol et des milieux aquatiques. Dijon. 25 novembre 2005.
- Allard T, Bardy M, Benedetti M, **Berge O.**, Bueno G, Derenne S, Fritsch E, Heulin T, Nascimento N. Podzolisation des latérites du haut bassin amazonien : impacts environnementaux sur le milieu physique, biologique, et sur les exportations de matières. Poster, séminaire ECCO 4 –6 décembre 2005 à TOULOUSE.
- Jakob A., Lafolie F., **Berge O.**. Déplacement de bactéries en milieux poreux. Poster séminaire ECCO 4 –6 décembre à TOULOUSE.

- Haichar F. Z., **Berge O.**, Heulin T., Marol C., Mougél C., Ranjard L. & Balesdent J. Structure des communautés bactériennes impliquées dans la dégradation de la cellulose par traçage isotopique de l'ADN (DNA-SIP). Présentation orale au de FEZ Haichar 2<sup>ème</sup> Colloque d'Ecologie Microbienne (9-12 Mai 2005 à Obernai)
- Berge O.**, Haichar FEZ, Derrien D, Santaella C, Péan M, Marol C, Heulin T, Achouak W, & Balesdent J. Traçage isotopique moléculaire des échanges de carbone plantes-microorganismes-sol. Présentation orale d'O Berge. Les matières organiques en France. Etat de l'art et perspectives. Réseau Matières Organiques – Groupe français de l'IHSS (22 au 24 janvier 2006 à Toulon)
- Haichar FZ, Achouak W, Marol C, Heulin T, Balesdent J & **Berge O.**, Traçage isotopique de l'ADN des communautés actives de la rhizosphère. Présentation orale de FEZ Haichar 7èmes rencontres Plantes-Bactéries (20-24 Mars 2006 à Aussois)

---

## 2004

- Fromin N., Bardin M., **Berge O.**, Frey-Klett P., Girardin H., Guinebretière M.-H., Lebaron P., Thiéry J., Troussellier M. & Morris C. 2004. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in the primary scientific literature from 1975 to 1999. "First Meeting of Swiss Microbial Ecology" Neuchâtel (Suisse). Sept 2004.
- Berge O.**, Brandelet G., Heyraud A., Santaella C. & Heulin T. 2004. Diversity of EPS-producing bacteria living in *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. Their implication in soil aggregation; International congress "Rhizosphere 2004" Perspectives and Challenges. A tribute to Lorenz Hiltner. Munich, Germany, 12-17 Sept 2004.
- Santaella C., Brandelet G., Brutesco C., Profizi C., **Berge O.** & Heulin T. 2004. Biofilms of *Rhizobium* sp. YAS34 in the rhizosphere of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* : involvement in soil aggregation and plant metal uptake. International congress "Rhizosphere 2004" Perspectives and Challenges. A tribute to Lorenz Hiltner. Munich, Germany, 12-17 Sept 2004.
- Ming L., Bal A., **Berge O.**, Anand R. & Chanway C. 2004. Lodgepole pine seedlings derive significant amounts of foliar nitrogen from the atmosphere after inoculation with an endophytic diazotroph. International congress "Rhizosphere 2004" Perspectives and Challenges. A tribute to Lorenz Hiltner. Munich, Germany, 12-17 Sept 2004.
- Berge O.**, Brandelet G., Maurel J., Laguerre G., Heulin T., Heyraud A., Achouak W., Santaella C. 2004. Diversité et activité des *Rhizobium* producteurs d'exopolysaccharides de la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana*. Sixièmes rencontres Plantes-bactéries. Aussois, 17-20 Janv. 2004.

---

## 2003

- Santaella C., Profizi C., Brutesco C., Brandelet G., Heulin T. & **Berge O.**. 2003. Mobilisation des métaux par des exopolysaccharides de bactéries de la rhizosphère. Colloque "Circulation, interactions et caractérisation des processus de complexation dans les eaux naturelles", Aix en Provence, 16-17 Sept 2003.
- Berge O.**, Brandelet G., Heyraud A., Brutesco C., Heulin T., et Santaella C., 2003. Populations bactériennes productrices d'exopolysaccharides dans la rhizosphère. Colloque D'Ecologie Microbienne, Carry le Rouet, 25-28 Mai 2003.
- Morris C. E., Bardin M., **Berge O.**, Frey-Klett P., Fromin N., Girardin H., Guinebretière M.H., Lebaron P., Thiéry J.M., Troussellier M. 2003. Microbial biodiversity: an analysis of 25 years of experimental design and hypothesis testing in the primary scientific literature. Colloque d'Ecologie Microbienne, Carry le Rouet, 25-28 Mai 2003.
- Santaella C., Profizi C., Brutesco C., Brandelet G., Heulin T. & Berge O. 2003. Mobilisation des métaux par des exopolysaccharides de bactéries de la rhizosphère. Colloque "Circulation, interactions, et caractérisation des processus de complexation dans les eaux naturelles. 16-17 sept 2003.

---

**2002**

- T. Heulin, Y. Alami, **O. Berge**, G. Brandelet, C. Brutesco and C. Santaella. **2002**. Roots and rhizosphere bacteria: indirect and direct evidences for bacterial production of exopolysaccharides in the rhizosphere. NonLegume Nitrogen Fixation Meeting Louvain Sept 2002 (communication orale T. Heulin).
- A. Bal, **O. Berge**, and C. Chanway. **2002**. Gymnosperm Seedlings Derive A Large Proportion of Foliar Nitrogen From the Atmosphere After Inoculation with an Endophytic Diazotroph. NonLegume Nitrogen Fixation Meeting. Louvain, Belgique, Sept 2002. (Communication orale, C. Chanway).

---

**2001**

- Morris C.E., Bardin M., **Berge O.**, Frey-Klett P., Fromin N., Girardin H., Guinebretière M.-H., Lebaron P., Thiery J., Troussellier M., Balandreau J. 2001. Tracing the progress of research interest in microbial ecology from 1975 to present. 60ème congrès de la Société Suisse de Microbiologie, Lausanne, Suisse, 8-9 mars 2001 (Affiche).
- Berge O.**, Brandelet G., Courard F., Brutesco C., Santaella C., & Heulin T. **2001**. Inoculation d'*Arabidopsis thaliana* et du colza par une souche de *Rhizobium* productrice d'exopolysaccharide Effet sur l'agrégation du sol rhizosphérique et la croissance des plantes. 3<sup>ème</sup> colloque "Rhizosphère". Dijon Nov 2001 (Affiche).

---

**2000**

- Guemouri-Athmani S., **Berge O.**, Bourrain M., Mavingui P., Thiery J.-M., Bhatnagar T. & Heulin T. **2000**. Diversité des populations de *Paenibacillus polymyxa* isolés de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*) dans des sols algériens. "Fonctions de la Biodiversité Microbienne: comprendre pour gérer" du réseau "Biodiversité et Ecologie Microbienne". Aussois 2-5 mai 2000. (Communication orale O. Berge)
- Lebuhn M., Achouak W., Schlöter M., **Berge O.**, Hartmann A. & Heulin T. **2000**. Diversité génotypique et phénotypique à différents niveaux de résolution de souches d'*Ochrobactrum* sp. isolées du sol et des racines de blé. Colloque "Fonctions de la Biodiversité Microbienne: comprendre pour gérer" du réseau "Biodiversité et Ecologie Microbienne". Aussois 2-5 mai 2000. (Affiche).
- Morris C.E., Bardin M., **Berge O.**, Frey-Klett P., Fromin N., Girardin H., Guinebretière M.-H., Lebaron P., Pierrat J. C., Thiery J., Troussellier M., Balandreau J. 2000. Tracing the progress of research interest in microbial ecology from 1975 to present. Quatrièmes rencontres de phytobactériologie. 17-20 janvier 2000 Aussois. (Communication orale, C. Morris)
- Berge O.**; Guinebretière M.-H., Achouak W., Antinelli J.-F., Fellous R., Normand P. & Heulin T. **2000**. Description of two new nitrogen-fixing *Paenibacillus* species phylogenetically close to *Paenibacillus azotofixans* co-existing with *Paenibacillus polymyxa* in the wheat rhizosphere: Congrès : "Bacillus 2000. Applications and systematics of Bacillus and relatives". Bruges, Belgium, 30th-31st August 2000. (Affiche)
- Berge O.**, Achouak W., Allard M.-R., Edel V., Hartmann A., Heulin T., Houot S., Lemanceau P., Steinberg C., Thiery J. & Laguerre G. **2000**. Recherche de populations indicatrices de l'effet des pratiques agricoles sur la biodiversité de la microflore du sol. "Quatrièmes rencontres de Phytobactériologie". Aussois 17-20 janvier 2000. (Communication orale O. Berge)

---

**1999**

- Laguerre G., **Berge O.**, Steinberg C., Achouak W., Edel V., Hartmann A., Lemanceau P., Thiéry J., Houot S. et Heulin T., **1999**. Indicateurs microbiens de l'effet des pratiques agricoles sur la biodiversité de la microflore des sols. Colloque "Le sol, milieu vivant : fonctionnement et gestion" (INRA, IRD, CNRS, CIRAD). Versailles, 10-11 février 1999. (Communication orale : G. Laguerre)

Laguerre G., **Berge O.**, Achouak W., Allard M. R., Edel V., Hartmann A., Heulin T., Houot S., Lemanceau P., Steinberg C. and Thiéry J., **1999**. A search for sensitive indicators of long-term effects of agricultural practices on soil microbial parameters. 6<sup>th</sup> Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO). Florence, Italie, 20-24 juin 1999. (Communication orale : G. Laguerre)

---

#### 1997

Lebuhn M., Schloter M., Hartmann A., Achouak W., **Berge O.** & Heulin T. **1997**. Investigations on *Ochrobactrum* species in soil and in the wheat rhizosphere. Colloque Rhizosphère Aix'97. Aix en Provence, France, 26-27 novembre 1997. (communication orale M. Lebuhn).

---

#### 1996

Tran Van V., Mavingui P., **Berge O.**, Balandreau J. & Heulin T. **1996**. *Burkholderia vietnamiensis*, a new nitrogen-fixing species associated with rice roots, isolated from an acid sulphate soil in Viêt-nam : plant growth-promoting effects on rice. In: Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production. M. Rahman et al. (eds), Kluwer Academic Publishers, pp.181-190 .

**Berge O.**, Jeandat G. & Heulin T. **1996**. Effet de la monoculture de blé sur les populations de *Paenibacillus polymyxa* du sol. Colloque « Biodiversité et Fonctionnement des Sols », Société Française de Microbiologie. Lyon, 12-13 décembre 1996 (communication orale O. Berge).

Frey P., Frey-Klett P., Garbaye J., **Berge O.** & Heulin T. **1996**. Diversité phénotypique et génotypique des *Pseudomonas fluorescents* associés à la mycorhizosphère du Douglas. Colloque « Biodiversité et Fonctionnement des Sols », Société Française de Microbiologie. Lyon, 12-13 décembre 1996 (communication orale T. Heulin).

---

#### 1995

Guemouri-Athmani S., Bourrain M., Mavingui P., **Berge O.** & Heulin T. **1995**. Phenotypic and genotypic biodiversity of *Bacillus polymyxa* populations isolated from the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in algerian soils. Int. Symposium of the Exploration of Microbial Diversity. Gosslar (Allemagne). 12-15 juin 1995. (Communication orale : O. Berge).

---

#### 1994

Tran Van V., Mavingui P., **Berge O.**, Balandreau J. and Heulin T., **1994**. *Burkholderia vietnamiensis*, a new nitrogen-fixing species associated with rice roots, isolated from an acid sulfate soil in Vietnam : plant growth-promoting effects on rice. Int. Symposium on Nitrogen Fixation Associated with Rice, Dhaka (Bangladesh), du 28 novembre au 2 décembre 1994. (Communication orale : V. Tran Van)

Lelu A., **Berge O.** **1994**. An approach to the microbial diversity by revealing fuzzy, overlapping clusters around typical bacterial strains. "Quantification de la biodiversité microbienne". Dijon, 22-23 Nov 1994. (Communication orale, O. Berge).

Bourrain M., Mavingui P., Degraeve S., Laguerre G., **Berge O.**, Heulin T. **1994**. Genomic fingerprints of nitrogen-fixing *Bacillus polymyxa* associated with roots of wheat assessed by repetitive DNA sequences and polymerase reaction. Biological N<sub>2</sub>-fixation associated with cereal crops. Giza, Egypte, 26-28 sept 1994. (Communication orale O. Berge)

Omar N., Yamani M., **Berge O.**, Heulin T. **1994**. Identification and enumeration of *Azospirilla* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Biological N<sub>2</sub>-fixation associated with cereal crops. Giza, Egypte, 26-28 sept 1994. (Communication orale O. Berge).

Omar N., Tran Van V., **Berge O.**, Bally R., Heulin T., Balandreau J. **1994**. Inoculation of cereals new developments and results, concepts, limiting factors, bottlenecks. Biological N<sub>2</sub>-fixation associated with cereal crops. Giza, Egypte, 26-28 sept 1994. (Communication orale J. Balandreau)

Tran Van V., Omar N., Heulin T., **Berge O.** and Balandreau J., **1994**. Selection of bacteria for enhanced growth and results of field tests 3rd International PGPR. Workshop, Adelaide (Australie), 7-11 mars 1994. (Communication orale : J. Balandreau)

---

**1993**

Meyer J.M., Stinzi A., Tran Van V., **Berge O.**, Stephan H., & Winkelmann G. **1993**. Ornibactins-biological properties. Int Conf on Iron and Microbiol iron chelates, Brugge, Belgique, 5-6 nov 1993. (Communication orale JM Meyer).

Tran Van V., Gillis M., Hebbar P., Fernandez M., Segers P., Martel M. H., **Berge O.**, Meyer J. M. and Heulin T., **1993**. Isolation from the rice rhizosphere, of a new species of nitrogen-fixing Proteobacteria, belonging to the genus *Burkholderia*. In: Nitrogen fixation with non-legume. Proceedings of the sixth international symposium on nitrogen-fixation with non legumes. Ed. Hegazi N. A., Fayez M. and Monib M., pp. 299-309. (Communication orale : T. Heulin)

---

**1992**

Heulin T., Mavingui P., Gouzou L. et **Berge O.**, **1992**. Adaptation des *Bacillus* fixateurs d'azote à la rhizosphère des graminées : une idée qui fait son chemin. In: "Comptes rendus "Interactions Plantes-Microorganismes" Colloque Fondation Internationale pour la Science /ORSTOM, pp. 68-82.

Mavingui P., Laguerre G., **Berge O.**, Heulin T. **1992**. Biodiversity of *Bacillus polymyxa* in the wheat rhizosphere. Workshop on "Root-Soil-Interactions : from basic concepts to model description". European Science Foundation (ESF), "Soil Water Processes". Scheyern (Allemagne), 22-24 oct 1992. (Affiche)

Tran Van V. **Berge O.**, Heulin T. **1992**. A new method for the isolation of *Azospirillum* associated with the rhizosphere of rice. 6<sup>th</sup> Int Symposium on Microbial Ecology (ISME-6). Barcelone, Spain, 6-11 sept 1992. (communication orale, Tran Van V.).

Heulin T. et **Berge O.**, **1992**. Ecologie des bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère des céréales : mieux décrire pour mieux comprendre. 5<sup>ème</sup> Conférence de l'Association Africaine pour la Fixation Biologique de l'Azote (AABNF), Rabat (Maroc), 14-19 sept 1992. (Communication orale T. Heulin)

Heulin T., Gouzou L., Mavingui P. et **Berge O.**, **1992**. Inoculation du blé par une souche de *Bacillus polymyxa* : dynamique de population et effet sur l'agrégation du sol rhizosphérique. 3<sup>ème</sup> Congrès SFM, Lyon 21-24 av 1992. (Affiche)

Heulin T., Mavingui P., Gouzou L. et **Berge O.**, **1992**. Adaptation des *Bacillus* fixateurs d'azote à la rhizosphère des graminées : une idée qui fait son chemin. In : **Comptes rendus "Interactions Plantes-Microorganismes" Colloque "Fondation Internationale pour la Science"/ORSTOM**, pp. 68-82. (Communication orale T. Heulin).

---

**1991**

**Berge O.**, Heulin T., Achouak W., Balandreau J., Richard C. et Bally R., **1991**. *Rahnella aquatilis*: une bactérie fixatrice d'azote associée à la rhizosphère du blé et du maïs. Colloque du Groupe "Taxonomie et épidémiologie moléculaire" (SFM). Marseille, 12 avril 1991. (Affiche)

---

**1990**

**Berge O.**, Heulin T. & Lelu A. **1990**. Adaptation des populations bactériennes de bacillus à la rhizosphère des graminées. 12th Meeting groupe de Biologie et génétique des populations Bordeaux, Interlaken, Suisse, 04-06 sept 1990. (Affiche)

Hebbar P., Heulin T., Berge O., Singh S. P. **1990**. Suppression of fungal pathogens of sunflower (*Helianthus annuus*) by antagonistic bacteria. 2<sup>nd</sup> Int Workshop on PGPR. 14-19 oct 1990

---

**1989**

Mavingui P., **Berge O.** and Heulin T., **1989**. Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. 35th Meeting de la Société Française de Phytopathologie (SFP). "Rhizosphere" Montpellier, 27-29 septembre 1989. (Affiche)

**Berge O.**, Heulin T., Scotti C., Mavingui P. and Balandreau J., **1989**. Diversity of nitrogen-fixing *Bacillus* isolates in the rhizosphere of *Graminae*. 35th Meeting de la Société Française de Phytopathologie (SFP). "Rhizosphere". Montpellier, 27-29 septembre 1989. (Affiche)

LEMIR 1989. Co-évolution des bacillus de la rhizosphère et de leur graminées-hôtes. XXèmes rencontres de Méribel, Les Arcs, 12-18 mars 1989 (Communication orale, T. Heulin)

---

**1988**

Fages, J., **Berge O.**, Mullard D., Balandreau J., **1988**. Enhancement of grain yield in maize field trials with plant growth promotong rhizobacteria. 8<sup>th</sup> Int Biotechnology symposium. Paris, 17-22 juillet 1988. (Affiche)

---

**1987**

**Berge O.**, Heulin T., Bourgaud F., Dardaine B. and Balandreau J., 1987. Les Bacillus fixateurs d'azote de la rhizosphère des céréales. Colloque de la SFM sur la "Diversité microbienne : effets des interactions et des pressions de sélection". Paris, 17-18 novembre 1987. (Communication orale : O. Berge)

---

**1986**

**Berge O.**, Heulin T., Rafidison Z., Balandreau J., Guckert A. & Balland D. **1986**. The use of a nitrogen fixing Bacillu in spring wheat cultivation. XIIIème congrès de l'ISSS Hambourg,13-20 aout 1986. (Communication orale, O. Berge)

## 2. Résumé des travaux : parcours de recherche

**Écologie des populations bactériennes associées aux eucaryotes photosynthétiques:  
de la rhizosphère à la phycosphère**

**Introduction**

Depuis mes débuts dans la recherche en 1984 et jusqu'en février 2009, j'ai exercé mon activité dans le Laboratoire d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère du CNRS dans le domaine de l'adaptation des populations bactériennes du sol à la rhizosphère des plantes. Mes travaux concernent principalement la diversité et la fonction de ces populations rhizosphériques et leur rôle dans la croissance et la santé des plantes. En 2009, j'ai réorienté mon activité dans un nouveau projet de recherche qui porte sur un type différent d'interaction eucaryote-procaryote, dans le laboratoire de Pathologie Végétale de l'INRA d'Avignon. Je m'intéresse désormais au rôle des microalgues de biofilms d'eau douce dans le maintien et la dispersion de populations bactériennes connues pour être phytopathogènes. Dans ce document, je résume tout d'abord mon parcours de recherche chronologiquement en soulignant les expériences d'encadrement et d'animation de la recherche, avant de détailler quelques résultats significatifs.

**2 A. DEA et thèse (1983-1988)**

Lors de ma formation d'ingénieur agronome à l'ENSAIA de Nancy, je suis attirée par le travail de recherche et je réalise un DEA (1983-84) dans un laboratoire du CNRS. Mon goût pour la recherche scientifique se confirme et je poursuis mon cursus en réalisant une thèse (1985-88) encadrée par Thierry HEULIN dans la continuité du DEA au Laboratoire d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère dirigé par Jacques BALANDREAU. Ces premiers travaux de recherche portent sur l'écologie des bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère des céréales avec pour objectif de pouvoir les utiliser pour améliorer la croissance et la santé des plantes.

Après le riz et le blé déjà travaillé au laboratoire, je prends en charge l'introduction des études sur le maïs à cette occasion. Ce travail comporte deux parties principales :

**1 – Isolement et identification de bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère du maïs.  
Comparaison avec le blé**

Le « modèle spermosphère » avait été mis au point au laboratoire par l'équipe de Jacques BALANDREAU, pour isoler les bactéries fixatrices d'azote les plus nombreuses se développant sur les exsudats racinaires de plantules de riz (Thomas-Bauzon et al. 1982) et de blé (Heulin et al. 1994). Je l'adapte au maïs et isole les fixateurs d'azote associés aux racines du maïs sur trois sols de maïsiculture en France. Le résultat de l'identification est remarquable sur deux points. Le premier est que les populations isolées sans a priori avec cette méthode, font partie des mêmes groupes bactériens que ceux isolés du blé (Heulin et al. 1994, Berge et al. 1991a, b), les *Paenibacillus* sp. (ex *Bacillus*) et les *Rhanelia* sp. avec toutefois des spécificités. Le deuxième point est que ces groupes bactériens sont très peu étudiés dans la rhizosphère en comparaison du groupe des *Azospirillum* (fixateurs d'azote) et de celui des *Pseudomonas* (non fixateurs, très abondants et très fréquents) (Heulin et Berge 1994). Malgré quelques travaux des suédois (Lindberg & Granhall 1984) et des canadiens (Chanway et al. 1988a, b), les *Paenibacillus* sont considérés comme étant plutôt des bactéries du sol et les rhanelles plutôt de l'eau. C'est le modèle original *Paenibacillus*-céréales qui

sera développé au laboratoire. Dans le même temps, une équipe brésilienne menée par Lucy SELDIN développe ce modèle en milieu tropical (Seldin et al. 1984).

## 2 – Inoculation bactérienne du blé et du maïs au champ : effet sur la croissance et le rendement

L'objectif de ces inoculations est, sur le modèle de l'inoculation des légumineuses par *Rhizobium*, de déplacer les populations microbiennes natives en apportant massivement une souche bactérienne au moment du semis et d'obtenir un effet de l'activité de cette bactérie sur la croissance et le rendement des plantes cultivées. D'un point de vue agronomique les espoirs sont grands à l'échelle mondiale, de substituer une partie des engrais azotés, coûteux et polluants, par ces bactéries du sol et nos programmes sont soutenus par des firmes de production d'engrais azoté (Cofaz, Norskhydro, AZF, Pioneer) avec lesquelles j'interagis à différents niveaux. Une des originalités de ces recherches est de prendre en compte les données de l'écologie microbienne montrant que des populations natives d'un environnement ont plus de chances de coloniser cet environnement que des populations introduites (Balandreau, 1983). L'isolement des bactéries de la rhizosphère de la plante à inoculer et la sélection parmi elles de souches très efficaces pour fixer l'azote de l'air aux dépens même du carbone de la plante étudiée (activité nitrogénase élevée sur exsudats racinaires) a pour but de sélectionner des souches adaptées au contexte rhizosphérique (Heulin et al. 1989) et actives pour l'alimentation azotée de la plante. Pendant mon DEA et ma thèse je réalise et encadre les premières expériences du labo qui permettent de tester au champ, l'inoculation du blé et du maïs, avec des souches de *Paenibacillus* isolées respectivement de ces deux plantes. Les cultures inoculées présentent des augmentations de rendement aux niveaux intermédiaires de fertilisation azotée (+ 10 à 15 %) et de prélèvement d'azote (+ 15 % environ), montrant l'effet positif de l'inoculation (Berge et al. 1990).

## 2 B. Contrat post-doc (1989-1991)

Mon doctorat en poche souhaitant continuer dans la recherche, je m'engage dans un contrat post-doc proposé pour la période 1989-91, par le laboratoire où j'ai fait ma thèse. Le cadre est un projet européen de coopération avec l'Égypte, le Viêt nam et le Bangladesh pour l'amélioration de la riziculture auquel je suis déjà associée pendant ma thèse (CEE-STD1 1985-88 puis STD2 1989-92).

### 1 - Inoculation bactérienne du riz au champ. Transfert aux pays de riziculture

Ces travaux de recherche portent sur l'inoculation du riz par des bactéries fixatrices d'azote avec comme objectif le transfert de connaissances et de technologie vers la recherche et l'agriculture de trois pays, l'Égypte, le Bangladesh et le Viêt-nam. Le projet est monté à l'origine par Jacques BALANDREAU qui le dirige jusqu'en 1989, date de son départ du laboratoire. Thierry HEULIN qui reprend la direction du laboratoire, supervise ce projet et assure la partie au Bangladesh. Je prends alors en charge le suivi des recherches et des expérimentations sur le terrain pour l'Égypte et le Viêt nam. Le projet s'appuie sur trois chercheurs des pays concernés accueillis en thèse au laboratoire. Il comporte un volet français pour l'isolement des bactéries à partir de sols et de variétés riz locaux et un volet sur place pour les expérimentations d'inoculation au champ. Sur l'ensemble du projet, je participe à l'encadrement de ces thèses et plus particulièrement celle de Nabil OMAR, et celle de Tran Van VAN. Je réalise trois missions en Égypte et une au Viêt-nam afin de rencontrer sur place les

partenaires financiers (ambassade de France, FERT), académiques (universitaires, organismes de recherche), et techniques (responsables des stations expérimentales). Ma mission comprend la coordination des essais au champ, le soutien des projets scientifiques, le suivi des travaux de laboratoire, la participation à l'encadrement des étudiants et le transfert de technologie. Les résultats montrent le potentiel de l'inoculation bactérienne basée sur une démarche d'écologie microbienne dans ces pays au climat favorable et ces travaux reçoivent une très bonne évaluation de la commission européenne. Des retombées économiques (production d'inoculum pour le riz, soutenue par le gouvernement égyptien), académiques (prix scientifique, organisation de congrès) et de recherches (équipement des laboratoires, formation des étudiants) s'accompagnent de nombreuses publications scientifiques (Omar et al. 1992 a, b, c ; Tran Van et al. 1994, 1996, 1997, 2000). Ceci démontre la pertinence d'allier la recherche sur les équilibres écologiques dans la rhizosphère et des mécanismes qui les sous-tendent et l'expérimentation de terrain, les deux approches se nourrissant et se validant mutuellement.

## 2 – Caractérisation des bactéries fixatrices d'azote du blé et du maïs

Pendant cette période, je continue, à travailler sur la diversité des *Paenibacillus* dans la rhizosphère des céréales. La contrainte rhizosphérique est forte et étudier la diversité des bactéries qui s'y développent permet de révéler ces contraintes. La caractérisation phénotypique des populations de *Paenibacillus* isolées du blé et du maïs sur plusieurs sols montre un regroupement des souches du blé qui apparaissent très homogènes comparées à celles du maïs formant plusieurs groupes. Une hypothèse de coévolution des populations rhizosphériques avec leur plante-hôte est posée.

## 2 C. Recrutement au CNRS, chargée de recherche à Nancy (1991-1996)

### 1 - Structure des populations de *Paenibacillus polymyxa* de la rhizosphère du blé

L'hypothèse de coévolution des bactéries rhizosphériques dites « libres » en opposition aux bactéries symbiotiques telles que *Rhizobium* postule que la culture du blé, ancienne de plusieurs millénaires sur les sols français a eu le temps de faire évoluer les cortèges microbiens rhizosphériques vers une plus grande spécialisation et donc une moins grande diversité que ceux du maïs d'introduction plus récente. Le modèle *Paenibacillus* retrouvé à la fois dans la rhizosphère du blé et dans celle du maïs en France est donc une opportunité d'explorer cette hypothèse ce que je propose lors de ma candidature au CNRS. Je suis donc recrutée au CNRS pour explorer la diversité des populations de *Paenibacillus* de la rhizosphère en fonction de l'ancienneté de culture de la plante.

Dans le même temps, les thèses de Patrick MAVINGUI et Laurent GOUZOU au laboratoire, confortent le modèle *Paenibacillus*-blé. Ils montrent respectivement d'une part que la racine du blé sélectionne une population de *P. polymyxa* plus homogène que celle de la rhizosphère et que celle du sol non cultivé (Mavingui et al. 1990, 1992), et d'autre part que l'inoculation d'une souche de *P. polymyxa* au blé peut entraîner des effets bénéfiques sur sa croissance, par un prélèvement d'azote plus important et une production d'exopolysaccharide (EPS) modifiant la porosité au voisinage de la racine (Gouzou et al. 1993). C'est le temps où arrivent au laboratoire les techniques sérologiques (ELISA, immunopréciipitation) et moléculaires (RFLP, rep-PCR) permettant de mesurer et de quantifier la diversité génétique et ceci jusqu'au niveau intraspécifique (encadrement de W. ZAKARIA, Master of

science ; M. BOURRAIN, DEA). Ces techniques me permettent d'étudier ce modèle *Paenibacillus*-blé dans différents contextes pédologiques sur des sols de types différents et/ou avec une histoire de culture du blé plus ou moins ancienne (encadrement M. YAMANI, Master of science ; E. GOUNANT, DEUGB ; M. TANTI Maîtrise). Ces travaux sont illustrés par la situation remarquable du blé dur en Algérie dans le cadre de la thèse d'état algérienne de Souad GUEMOURI que je co-encadre. Elle montre que pour les populations de *P. polymyxa* de la racine de blé, il existe un gradient croissant de diversité qui suit le gradient décroissant d'ancienneté de culture du blé dur, pour les sols cultivés depuis les Romains, jusqu'à ceux qui sont mis en culture récemment pour répondre aux besoins alimentaires de la population (Guemouri-Athmani et al. 2000). L'ensemble de ces travaux montrent que *P. polymyxa* est bien une espèce compétente de la rhizosphère du blé (capable de coloniser l'environnement racinaire), mais seules certaines souches peuvent s'y développer sans que les déterminants de cette compétence soit clairement élucidés.

En dehors de la fixation d'azote ciblée au départ, *P. polymyxa* présente des atouts pour l'agronomie puisqu'elle produit des molécules biocides à activité antifongique (Mavingui & Heulin 1994), des facteurs de croissance de plantes (Lebhun et al. 1997) et des exopolysaccharides. Ces propriétés sont autant de traits qui traduisent les adaptations à la vie rhizosphérique et leur fonction dans la rhizosphère fait l'objet d'une nouvelle thématique au laboratoire : il s'agit d'étudier le rôle des exopolysaccharides produits par les bactéries de la rhizosphère, sur la structure des sols et la croissance des plantes.

## 2 – Effet de la production d'exopolysaccharides par *P. polymyxa* sur le sol rhizosphérique

Cette thématique était née de l'observation des quantités de sol adhérent aux racines du blé cultivé au champ. Dans des expérimentations d'inoculation en parcelles, ces quantités augmentent significativement quand la plante est inoculée avec une souche de *P. polymyxa* (Gouzou et al. 1993). L'hypothèse du rôle de la production d'exopolysaccharide bactérien dans l'augmentation de la quantité de sol rhizosphérique est avancée. Les *P. polymyxa* sont connus pour leur production de lévane, synthétisé par la lévane-saccharase qui hydrolyse le saccharose, polymérise les résidus fructose et libère les résidus glucose utilisable par d'autres voies métaboliques. On sait également que le saccharose est présent dans les exsudats racinaires du blé. Pour tester notre hypothèse, un mutant de *P. polymyxa* dans cette enzyme est construit par Samira BEZZATE et Stéphane AYMERICH (INRA, Grignon) spécialistes du métabolisme des glucides chez *Bacillus subtilis*. Je prends en charge les essais d'inoculation qui montrent que la quantité de sol adhérent aux plantules de blé inoculées par ce mutant EPS- n'est pas différente de celle du témoin non inoculé, alors qu'elle est augmentée par l'inoculation de la souche sauvage EPS+ sur deux sols de texture différente (Bezzate et al. 2000) (encadrement S. CZARNES, DEA). La deuxième hypothèse que nous formulons alors est que cette augmentation de sol rhizosphérique a un effet bénéfique sur la croissance des plantes cultivées. Elle sera vérifiée sur un autre modèle développé au laboratoire, le tournesol et son cortège de *Rhizobium* rhizosphériques producteurs d'EPS, dans la thèse de Younes ALAMI. La production d'EPS bactérien change la porosité du sol dans la rhizosphère avec pour conséquence, une meilleure alimentation en eau et en nutriment de la plante (Alami et al. 2000). Enfin, une troisième hypothèse est celle du rôle des bactéries rhizosphériques productrices d'EPS dans la structuration globale des sols (rhizosphérique ou pas), et sera explorée dans des sols martiniquais par Wafa ACHOUAK chercheure CNRS au laboratoire (Achouak et al. 1999a).

D'autres modèles (plantes et bactéries) sont alors étudiés au laboratoire avec le même objectif que pour la fixation d'azote : améliorer les fonctions microbiennes qui existent dans la rhizosphère au bénéfice de la santé et de la croissance des plantes cultivées. Ces travaux mènent à la découverte de nouveaux exopolysaccharides bactériens qui intéressent des partenaires privés comme la société ARD (Pomacle, 51) spécialisée dans la raffinerie végétale. Un partenariat industriel accompagné d'un partenariat de recherche avec le CERMAV laboratoire dédié aux polysaccharides à Grenoble conduit au dépôt de brevets, dont un auquel je participe (Lodhi-Hassan et al. 2006).

### 3 - Taxonomie systématique et diversité bactérienne.

L'étude des facteurs de la rhizosphère qui génèrent la diversité infraspécifique fait appel à la notion d'espèce bactérienne, concept très controversé jusqu'à présent (Philippot et al. 2010). Dans les années 80 un consensus est toutefois établi par les experts en taxonomie autour de la technique d'hybridation ADN:ADN (Brenner 1978), associée à l'étude phylogénétique du gène codant pour l'ADNr 16S qui établit empiriquement la limite de l'espèce à 70 % d'hybridation hétérologue (Wayne et al. 1987). Je prends en charge au laboratoire l'introduction, le développement et la diffusion de cette technique qui permettra de délimiter les espèces bactériennes nouvelles dans la rhizosphère (encadrement, Marie-Josée BELGY T CNRS ; Jocelin BOMONT, Maîtrise). Un exemple est celui des souches de *Paenibacillus* fixatrices d'azote, isolées du maïs et du blé au laboratoire. Par une étude de phylogénie moléculaire, Wafa ACHOUAK, montre que dans le groupe des *Bacillus sensu lato*, les seules espèces fixatrices d'azote appartiennent au genre *Paenibacillus* (Achouak et al. 1999b), et que nos souches sont des représentants de trois espèces nouvelles dont deux, *P. graminis* et *P. odorifer* que je décris grâce à cette méthode (Berge et al. 2002). Les chercheurs brésiliens décrivent *P. brasilensis*, présent dans la rhizosphère du maïs au Brésil (von der Weid et al. 2002). La diversité des espèces de *Paenibacillus* fixateurs d'azote qui colonisent la rhizosphère des graminées se précise.

Peu de labos en France maîtrisent la technique d'hybridation ADN:ADN et je suis sollicitée pour des études taxonomiques variées que je traite en collaboration en encadrant les chercheurs au laboratoire. La technique est très lourde au début puisqu'elle utilise du tritium radioactif (Berge et al. 2002 ; Leuhn et al. 2000) puis les technologies froides utilisant la photo-biotinilation de l'ADN (Ezaki et al. 1989, Willems et al. 2001) la rendent plus facile à mettre en œuvre permettant une diffusion plus large dans les laboratoires (Vidal et al. 2009 ; Berge et al. 2009 ; Peix et al. 2005) (Encadrement Géraldine BRANDELET T CEA ; Marie-Anne RONCATO, T CEA ; Julie MAUREL, Maîtrise ; Justine THOMAS, Maîtrise).

Pendant toutes ces années, ma recherche est connectée à des études de diversité microbienne (Frey et al. 1997 ; Guinebretière et al. 2001 ; Ehling-Schulz et al. 2006 ; Berge & Achouak 2007 ; Darcheville et al. 2008). Ce domaine est révolutionné par les techniques moléculaires dans les années 90 conduisant à une augmentation très forte des publications. La communauté française des écologistes microbiens, se constitue en réseau à cette époque ce qui permet l'émergence de groupes de travail comme celui auquel je participe avec une dizaine d'autres chercheurs sur « l'échantillonnage dans les études de diversité microbienne ». Après 2 ans de travail bibliographique coordonné par Cindy MORRIS (INRA), nous produisons un article de synthèse qui montre les limites de la plupart des résultats obtenus dans ce domaine où l'échantillonnage est souvent négligé, et nous proposons de recommandations pour une meilleure pratique (Morris et al. 2002).

## 2 D. Mobilité de Nancy à Cadarache (1996-2009)

En 1995 notre équipe (3 chercheurs, 3 doctorants) effectue une mobilité à Cadarache (13) dans une unité de la direction des Sciences du Vivant du CEA, avec la création d'une UMR CNRS-CEA qui s'élargit par la suite à l'Université de Méditerranée (Aix-Marseille II). Pour faciliter ce changement géographique qui impliquait aussi le reste de ma famille, je rejoins la nouvelle UMR un an plus tard en 1996, passant du contexte scientifique plutôt « sol » à Nancy, à un environnement plutôt « plante » à Cadarache avec une incitation à utiliser la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, outil de choix pour élucider les mécanismes moléculaires. Dans cette nouvelle organisation de thématiques au laboratoire, mon activité évolue et je passe progressivement du modèle *Paenibacillus*-Blé à celui de *Rhizobium*-Arabette en prenant la responsabilité avec Catherine SANTAELLA, chercheuse CNRS, de la thématique traitant des « Exopolysaccharides bactériens dans la rhizosphère » de 2000 à 2004.

### 1 - Diversité et rôle des bactéries productrices d'EPS de la rhizosphère

Entre 2000 à 2004 nous partageons la responsabilité de l'animation de ce thème avec Catherine SANTAELLA. Nous élaborons un projet qui vise à comprendre d'une part quelles sont les caractéristiques de la production d'EPS bactériens dans la rhizosphère et d'autre part quels sont les acteurs bactériens et leur diversité dans une situation « modèle » partagée au laboratoire. Les composants de ce « modèle » sont, **un sol** limo-argileux représentatif des sols de grandes cultures en France, **la plante** *A. thaliana* avec ses nombreux mutants et **une bactérie** produisant un polymère abondant et biorésistant, *Rhizobium* sp. YAS34.

Dans des essais d'inoculation bactérienne en sol, la technicienne que j'encadre Géraldine BRANDELET, montre que l'arabette bien que colonisée par YAS34, reste insensible à cette souche pour l'agrégation rhizosphérique. Elle montre alors que l'effet de YAS34 dépend de la plante hôte : seuls le blé et le colza voient leur agrégation rhizosphérique augmentée, contrairement au maïs, au tournesol et aux luzernes sauvage et cultivée. L'utilisation de techniques de co-localisation, de la bactérie et de son polymère *in situ* par microscopie confocale à balayage laser élaborées par Catherine SANTAELLA, permet alors de mettre en relation l'augmentation de l'agrégation rhizosphérique à l'échelle macroscopique et la production d'exopolysaccharide de la bactérie à l'échelle microscopique dans la rhizosphère de ces plantes. Nous démontrons de façon directe pour la première fois que les polymères bactériens ont un rôle prépondérant dans l'agrégation du sol au voisinage de la racine (Santaella et al. 2008).

Après cette première étape, j'oriente mes recherches vers l'étude de la diversité des populations sauvages cultivables produisant des exopolysaccharides dans la rhizosphère d'*A. thaliana* sur le sol de Versailles. Je lance avec Géraldine BRANDELET, une campagne d'isolement sans *a priori* et la caractérisation des isolats montre qu'on trouve des bactéries productrices d'EPS affiliées au groupe de *Rhizobium* auquel appartient YAS34, confirmant ainsi une étude précédente effectuée par Asma LODHI. Cette chercheuse en séjour au laboratoire isole parmi d'autres une souche qui produit un polysaccharide aux propriétés originales qui fait l'objet d'un brevet (Lodhi-Hassan et al. 2006). Ce groupe de *Rhizobium* constitue une nouvelle espèce, proche de l'espèce *R. sulae*, nommée *R. alamii* (Berge et al. 2009). Elles produisent différents types d'exopolysaccharides aux structures originales élucidées par Alain HEYRAUD (CERMAV), dont les plus fréquents sont les plus efficaces sur la stabilité des agrégats du sol (encadrement F. Z. HAICHAR, Maîtrise, C. BESTAGNE, DUT).

Le rôle de ces exopolysaccharides produits dans la rhizosphère par des bactéries, dans le transfert de métaux ou de radionucléides, du sol à la plante est recherché dans le cadre de l'appel

d'offre Toxicologie Nucléaire du CEA. Je participe aux aspects liés aux effets de l'inoculation bactérienne en sol ainsi qu'à l'isolement des bactéries productrices d'EPS de la *Brassicaceae* accumulatrice, *Brassica juncea*, sur des sols pollués avec des radionucléides. J'encadre Valérie CHAIGNON et Jérôme JOSEPH, (respectivement Post-doc et Maîtrise au LTME de la DEN du CEA à Cadarache avec Claire SAHUT) qui montrent que cette rhizosphère est dominée par *Rhizobium radiobacter* (ex *Agrobacterium radiobacter*) dont les souches produisent des EPS abondants de type succinoglycanes. Les spécificités structurales de ces EPS seront étudiées en collaboration avec le CERMAV (A. HEYRAUD) et leur rôle dans le transfert de métaux au LTME.

Dans cette thématique, en continuité avec les travaux du laboratoire sur le blé, j'ai l'occasion d'encadrer Muhamad ASHRAFF chercheur, pour un travail de coopération franco-pakistanaise qui porte sur l'isolement et l'utilisation de bactéries productrices d'EPS du blé dans des sols salés du Pakistan. À nouveau la rhizosphère est très enrichie en bactéries productrices d'EPS par rapport au sol non rhizosphérique (Ashraff et al. 1999). C'est une souche de *Microbacterium* sp. très muqueuse produisant un lévane qui est sélectionnée pour tester en inoculation sur le blé et qui montre des effets promoteurs de croissance sur cette plante (Ashraff et al. 2004) montrant ainsi l'intérêt de cette approche dans les sols salés. Muhamad Ashraff soutient son PHD avec entre-autre ce travail, au Pakistan en 2007.

**En résumé**, il semble qu'émerge une nouvelle hypothèse du rôle des bactéries du genre *Rhizobium* dans la rhizosphère des plantes. Au-delà de la capacité symbiotique bien connue de certaines souches avec les légumineuses, il existe d'autres souches dont la croissance est fortement stimulées dans la rhizosphère des plantes, y compris non-légumineuses, qui contribueraient entre-autre à la stabilité du sol et seraient des déterminants importants de son fonctionnement et sa fertilité.

Le déterminisme de cette diversité bactérienne comme tout ce qui concerne la rhizosphère est intimement lié au phénomène d'exsudation racinaire et tout en participant à cette thématique, je m'intéresse progressivement au développement du traçage isotopique de l'ADN (DNA-SIP) dans la rhizosphère. En 2005, Wafa ACHOUAK, devient cheffe du laboratoire et réorganise un groupe « Rhizosphère » qui comprend les activités sur les EPS que Catherine SANTAELLA continue de coordonner et développer seule, ainsi qu'une thématique sur l'exploration de la diversité des bactéries « actives » de la rhizosphère dans laquelle je m'investis.

## 2 – Diversité moléculaire des bactéries rhizosphériques dégradant les exsudats racinaires

J'ai jusque-là étudié la diversité de populations rhizosphériques cultivables et dont la fonction est susceptible *a priori* d'intervenir dans la croissance et la santé des plantes (fixation, d'azote, production d'EPS). Dans ces études, la dépendance de ces populations isolées de la rhizosphère vis à vis des exsudats racinaires est toujours montrée par des observations indirectes. En 2003, avec mes collègues chercheurs du labo, nous décidons de nous lancer dans l'identification des bactéries du sol directement impliquées dans l'utilisation du carbone issu des racines des plantes en développant la nouvelle technique de traçage isotopique des acides nucléiques par isotope stable (DNA/RNA-SIP). En effet l'analyse des populations microbiennes et de leur fonction dans des environnements aussi complexes que le sol fait toujours partie des défis de l'écologie microbienne à cause de la très grande diversité des populations et de la prédominance parmi elles de bactéries non-cultivables. Je prends en charge la partie microbiologique, Jérôme BALESSENT, chercheur INRA au laboratoire, la partie isotopique. J'encadre Feth el Zahar HAICHAR en Master 2, qui met en œuvre le DNA-SIP dans un sol avec une macromolécule modèle : la cellulose. Après la mise au point délicate de la séparation

physique d'ADN plus ou moins enrichi en  $^{13}\text{C}$  (encadrement L. JAKOB, Master 1), l'analyse moléculaire de la diversité bactérienne est réalisée par empreintes génétiques ARISA puis DGGE. L'identification révèle le développement de populations cellulolytiques dont on ne soupçonnait pas le rôle dans ce sol, ainsi que de bactéries inconnues dont il reste à comprendre le fonctionnement (Haichar et al. 2007). Une collaboration avec un laboratoire de l'INRA permettra le transfert de compétence pour tracer les microorganismes du sol impliqués dans la dégradation de matières organiques (Bernard et al. 2007)

Puis, lors de sa thèse (financée par le CNRS), que je co-encadre avec Wafa ACHOUAK, nous réalisons une première en montrant que le marquage continu de cinq espèces végétales en condition de fort  $^{13}\text{CO}_2$  permet d'enrichir suffisamment en  $^{13}\text{C}$  les communautés microbiennes de la rhizosphère pour qu'elles puissent être tracées (Berge et al. 2006a). Ces expériences sont réalisées grâce à l'expertise de notre département (DEVM) en matière d'installations phytotroniques. Dans la suite de sa thèse Feth el Zahar HAICHAR montre que les exsudats des espèces végétales testées, blé, maïs, colza et luzerne, façonnent la structure de la communauté bactérienne dans la rhizosphère (Haichar et al. 2008).

Après avoir montré ce modelage des communautés microbiennes par des exsudats de plantes différentes, nous nous intéressons à des changements induits par des différences plus fines au niveau moléculaire dans les exsudats. Pour cela, je coencadre la thèse de Mélanie BRESSAN financée par le CEA. Nous exploitons le système « glucosinolate-myrosinase » spécifique aux *Brassicaceae*. Les glucosinolates (GS) composés soufrés présents dans la plante sont hydrolysés par la myrosinase lors de blessures et produisent des composés biologiquement actifs. Nous testons leur effet sur la rhizosphère par traçage isotopique de l'ADN avec un mutant d'*A. thaliana* produisant un taux important d'un glucosinolate (p-OHBG), naturellement absent chez la plante sauvage. Pendant sa thèse, Mélanie BRESSAN montre que les populations microbiennes du compartiment « racine » proches de la source de glucosinolates sont plus largement influencées par les glucosinolates que dans le sol rhizosphérique. Dans le compartiment « rhizosphère » seules les populations actives, spécifiquement enrichies en  $^{13}\text{C}$ , ayant donc assimilé des exsudats, sont influencées par le contenu en glucosinolates des plantes (Bressan et al. 2009). Les mécanismes avancés sont la sensibilité aux propriétés anti-microbiennes, à l'inverse la capacité à les utiliser comme source de nutriments ou la réponse à une molécule-signal. Nous pouvons aussi penser à des effets indirects sur des antagonistes ou les compétiteurs des populations microbiennes influencées. Il apparaît que même de petites modifications dans la nature des exsudats, ici un seul glucosinolate exogène conduisent à la sélection de certaines populations dans cet environnement.

Ces études ouvrent la voie au RNA-SIP mis en œuvre par Feth el Zahar HAICHAR et Wafa ACHOUAK pour rechercher dans la rhizosphère l'expression de gènes dont l'importance dans l'interaction plante-bactéries a été mise en évidence dans des modèles au laboratoire.

Pendant cette dernière période, je ressens un besoin de changement professionnel et je construis un nouveau projet dans un autre laboratoire pour réinvestir mon expérience de recherche dans un nouveau contexte scientifique. Je choisis de rejoindre l'équipe de Cindy MORRIS de l'Unité de Pathologie végétale de l'INRA-PACA en Février 2009 pour travailler sur l'écologie d'un autre modèle bactérien qui interagit avec des eucaryotes dont certains photosynthétiques.

## 2 E. Mobilité de Cadarache à Avignon-Montfavet (2009- aujourd'hui)

Je connais Cindy MORRIS, phytopathologiste de l'INRA, spécialiste des bactérioses et de phyllosphère. Nous avons fait ensemble un gros travail de revue dans le groupe « échantillonnage » (années 90) qui était très enrichissant et a débouché sur une publication. Je trouve donc intéressant de rejoindre son équipe ce qui me permet de changer de niche écologique, en restant dans l'interaction bactéries-eucaryote. Cindy MORRIS a fait un travail précurseur pour l'élargissement des concepts de la phytopathologie, en proposant un nouveau paradigme de l'évolution des agents phytopathogènes en dehors des zones cultivées (Morris et al. 2009). Mon expérience scientifique oriente mon projet vers l'étude du rôle des biofilms épilithes, dans la sélection et l'évolution des populations d'agents phytopathogènes. En effet, la bactérie phytopathogène très étudiée au labo *Pseudomonas syringae* est fréquemment retrouvée dans ces biofilms qui tapissent le fond des rivières (Morris et al. 2007) et leur impact sur le pouvoir pathogène de la bactérie et les conséquences pour l'agriculture sont inexplorées actuellement. Ce projet m'enthousiasme par son originalité et son ouverture, et il est accepté pour une mise à disposition de trois ans à l'INRA à partir de 2009.

### Rôle des microalgues d'eau douce dans la structure des populations et l'évolution de la bactérie phytopathogène *P. syringae*

*P. syringae* est une espèce bactérienne phytopathogène, épiphyte, et glaçogène dont l'impact est très important en agronomie. Elle peut provoquer des maladies chez un grand nombre d'espèces de plantes en établissant une interaction spécifique avec chacune d'elles. Cette espèce « modèle » possède un arsenal de facteurs de virulence très vaste parmi lesquels des toxines synthétisées par des voies non-ribosomiques et un système de sécrétion de type III qui permet la translocation d'une grande variété d'effecteurs protéiques qui peuvent conduire à la suppression des défenses de la plante hôte. L'évolution des gènes impliqués dans la virulence est le résultat combiné de transferts horizontaux et d'adaptation liée au statut pathogène. Les déterminants de la spécificité d'hôte sont complexes et variés et restent toutefois pour leur grande part mal identifiés.

*P. syringae* a été considérée jusqu'à récemment comme une bactérie épiphyte inféodée aux cultures qu'elle est capable d'attaquer. Or, des données récentes montrent que des populations peuvent être isolées en dehors des agrosystèmes. Elles sont présentes dans les habitats en amont de l'agriculture : rivières, lacs, biofilms épilithes, plantes sauvages, eaux de ruissellement, nuages et précipitations et sont étroitement liées au cycle de l'eau douce (Morris et al. 2008a). *P. syringae*, à l'image des pathogènes humains dits « environnementaux » pourrait donc être soumise à des pressions de sélection autres que celles de l'interaction avec les plantes cultivées. Étant données sa présence dans un grand spectre d'habitats et ses diverses propriétés, elle pourrait également jouer un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes naturels. Il apparaît alors important de connaître l'écologie globale de *P. syringae* pour développer des stratégies de lutte efficaces et durables qui prennent en compte l'ensemble des fonctions (positives, négatives ou neutres pour l'homme). Le laboratoire de Cindy MORRIS avec sa collection de plus de 5000 souches caractérisées de *P. syringae* isolées d'habitats naturels offre une opportunité unique d'aborder cette problématique.

Les biofilms épilithes qui tapissent le lit des rivières représentent un habitat important des *P. syringae*, tant par leur étendue que par leur nature puisqu'ils sont le siège d'une vie microbienne intense et spécifique. L'assemblage complexe de microorganismes très variés au sein des biofilms

offre à *P. syringae* la possibilité d'interactions biologiques différentes de celles typiques des agrosystèmes. Dans les biofilms épilithes, les microalgues sont la composante biotique la plus importante et elles pourraient jouer un rôle dans la sélection de traits liés au pouvoir phytopathogène de *P. syringae* en raison de leur proximité phylogénétique avec les plantes. Ce projet est donc centré sur l'étude de l'interaction microalgues-*P. syringae*. Pour *P. syringae* en particulier, et pour les bactéries phytopathogènes de façon générale, leurs interactions avec les algues sont complètement inconnues à l'heure actuelle. En milieu aquatique, il semble que par différents mécanismes directs ou indirects, certaines algues inhibent la croissance de bactéries quand d'autres la favorisent et ceci conduit à une régulation des populations microbiennes. Les bactéries peuvent aussi influencer la croissance des algues.

Je propose un projet centré sur l'étude de la nature des interactions bactéries-algues et leur conséquence sur la structure des populations naturelles de *P. syringae* en l'articulant en trois parties:

1. Déterminer le rôle de certains facteurs de virulence de *P. syringae* sur la croissance des microalgues. Rechercher l'effet des gènes présents sur l'îlot de pathogénicité et de la production de molécules biocides sur la croissance algale.

2. Identifier les caractères liés au pouvoir pathogène qui favorisent la fitness de *P. syringae* en présence de microalgues.

3. Quantifier et caractériser les *P. syringae* dans les biofilms de rivière et modéliser les dynamiques de populations au sein de ces biofilms.

Les sorties de terrain depuis mon intégration à l'équipe ont permis d'isoler plus de 400 souches de *P. syringae* de biofilms de torrents de montagne et d'identifier les populations de diatomées. Les modèles de coculture en laboratoire sont à l'étude. J'ai mis en place des collaborations scientifiques dans le domaine de l'algologie et de la microbiologie des eaux douces (INRA Thonon-Les-Bains). Un poster a été présenté au premier colloque d'Écologie scientifique à Montpellier en septembre 2010 et au colloque sur les usages écologiques, économiques et sociaux de l'eau agricole en Méditerranée (Marseille, Janvier 2011). J'ai encadré Valentin DEBREYNE, stagiaire élève ingénieur en été 2010. Un financement 2010-11 de la fédération Eccorev a été obtenu pour étudier les populations des canaux d'irrigations à l'aval de la Durance et j'ai recruté Frédéric AZAN (T INRA, stage licence pro, formation continue) qui viendra participer à ce travail pendant 4 mois à partir de mars 2011.

Ce projet innovant ouvre des perspectives dans la compréhension du rôle du pouvoir pathogène dans l'interaction bactéries-microalgues, dans la modélisation de l'évolution des bactéries phytopathogènes et de leurs populations et dans la gestion des ressources en eau d'irrigation. Il s'insère dans une thématique plus large développée au laboratoire qui vise à connaître mieux ce versant « sauvage » de la vie de *P. syringae* le long de son parcours cyclique au fil l'eau pour mieux lutter contre les épidémies qu'elle déclenche.

## **Conclusion** .....

J'ai présenté dans ce résumé le cheminement que j'ai suivi depuis mes débuts dans la recherche en insistant sur les éléments de cohérence et d'encadrement de la recherche. Dans la suite du document, je détaille quelques résultats concrets que j'ai choisis pour illustrer ce résumé.

### **3. Quelques illustrations des recherches**

## Introduction : la rhizosphère

Améliorer la culture des plantes est un domaine en continuelle évolution dont l'objectif principal est de nourrir la planète. Les critères utilisés pour cette amélioration ont été principalement liés aux observations des parties aériennes végétales et ceci depuis la domestication des plantes par l'homme. Le système racinaire des plantes se développant dans le sol est moins accessible à l'observation alors qu'il joue un rôle primordial dans l'alimentation en éléments minéraux, la santé des plantes et leur maintien physique. En plus d'un accès limité comparé à celui des parties aériennes, les parties souterraines des végétaux font partie d'un environnement composite, le sol. Celui-ci formé de minéraux, de matières organiques et d'organismes vivants très variés formant des assemblages en perpétuelle dynamique, complexifie l'étude du fonctionnement des racines et sa prise en compte pour améliorer la culture des plantes. Ce n'est donc qu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle quand sont maîtrisées les méthodes de sciences du sol, que cette interface entre le végétal vivant et la matrice « sol » est conceptualisée par Lorenz Hiltner au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Hartmann 2008). Il définit la rhizosphère comme la zone de sol influencée par la présence des racines de plantes. La présence de la racine modifie l'état du sol à travers de nombreux mécanismes physico-chimiques et biologiques comme la poussée, le prélèvement massif d'eau et d'éléments minéraux et l'apport de molécules organiques comme les acides organiques, les sucres simples ou polymérisés et le relargage de molécules actives issues du métabolisme secondaire. En retour, les constituants du sol modifient les caractéristiques des racines en exerçant des contraintes physiques, chimiques et biologiques, dans un feedback permanent. Comprendre ces dynamiques en action dans la rhizosphère est alors devenu un enjeu important pour maîtriser la croissance des plantes. La composante biologique de la rhizosphère revêt un attrait particulier du fait de sa grande diversité taxonomique et fonctionnelle. En effet, le sol est un des milieux ayant une diversité microbienne parmi les plus élevées de la planète et déjà Hiltner notait que cette diversité dans la rhizosphère était différente de celle du sol non rhizosphérique adjacent. Ainsi, la dynamique microbienne de la rhizosphère est fortement influencée par la présence de racines et de ses exsudats et les fonctions exercées par ces cortèges microbiens ont été modelées par cette niche particulière. Les quelques illustrations qui suivent montrent comment durant ces quelques années de recherche, les connaissances sur la rhizosphère issues de mon travail au LEMIR, ont pu se construire autour de questions de recherches, d'enjeux sociétaux et de techniques en perpétuelle évolution.

### 3 A. Les bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère des céréales

**Participants** : T. Heulin (CR CNRS) ; P. Mavingui (Thèse) ; L. Gouzou (Thèse) ; S. Guemouri (Thèse) ; W. Achouak (CR CNRS) ; M. Tanti, J. Bomont, E. Gounant, P. Huber, M. Bourrain (Stagiaires) ; M. J Belgy (T CNRS), G. Jeandat (T CNRS).

**Collaborations** : P. Normand (DR CNRS Lyon) ; G. Laguerre (CR INRA Dijon) ; J. Balandreau (DR CNRS Lyon) ; F. Allard (I API, LA Balme les Grottes) ; MH. Guinebretière (IE INRA Avignon).

**Financements** : ACCSV n°7, Systématique et biodiversité (coordonateur T. Heulin, CNRS) ; AIP Ecosol de l'INRA (coordonatrice, G. Laguerre, INRA). Programme International de Coopération scientifique (PICS, (coordonateur J. Balandreau, CNRS). Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne d'Alger.

#### 1 – Des nouvelles espèces bactériennes fixatrices d'azote dans la rhizosphère du blé et du maïs

##### Contexte

Parmi les populations rhizosphériques, celles possédant la propriété de fixer librement l'azote de l'air (sans formation de nodosité) ont fait l'objet de recherches importantes dans les années 80-90, en particulier au LEMiR. L'enjeu était de diminuer l'utilisation d'engrais azotés coûteux et polluant en céréaliculture. Cela a conduit à l'isolement de souches bactériennes provenant de sols et de plantes variées et a révélé leur grande diversité taxonomique. Dans ce domaine, un travail important auquel j'ai participé, avait été fait au laboratoire, sur la rhizosphère des graminées et plus particulièrement des céréales. Dans le cas du blé et du maïs, nous avons montré par identification biochimique classique (API50CH) que les populations fixatrices d'azote les plus abondantes et les plus actives, appartenaient au genre *Bacillus* et plus particulièrement aux espèces *Bacillus polymyxa* et *Bacillus circulans*. Bien que ces bactéries sporulantes à Gram positif soient plutôt considérées comme telluriques, nos résultats ont été confortés par ceux d'autres laboratoires travaillant dans le même domaine qui avaient également décrit ces *Bacillus* au sens large peuplant la rhizosphère de plantes variées, dans des environnements pédo-climatiques très divers. Dans les années qui ont suivi ces découvertes, la classification de ce genre *Bacillus* est profondément remaniée grâce aux méthodes moléculaires (séquençage du gène de l'ADNr16S) et le genre *Bacillus* redécoupé en sept genres nouveaux. Parmi les souches de *Bacillus* fixatrices d'azote que nous avons isolées, les *B. polymyxa* sont reclassés en *Paenibacillus polymyxa* alors que les *Bacillus circulans*, restent dans le genre *Bacillus sensu stricto*. Cependant, Achouak et al (1999b) au laboratoire étudient la phylogénie moléculaire des gènes de l'ADNr16S (*rrs*) et de la nitrogénase enzyme de la fixation d'azote (*nifH*) et montrent que le genre *Paenibacillus* est le seul à héberger des espèces contenant des bactéries fixatrices d'azote. Ils montrent aussi que les deux souches de *Bacillus circulans* fixatrices d'azote du maïs, RSA19 et TOD45 appartiennent au genre *Paenibacillus*. Ces souches sont proches de l'espèce *Paenibacillus azotofixans* tout en étant éloignées l'une de l'autre. Nous avons donc effectué le travail de taxonomie pour démontrer que les souches isolées de la rhizosphère du maïs apparentées à *Paenibacillus azotofixans* représentent deux nouvelles espèces ce qui nécessite quatre conditions :

1 – Représentativité de l'espèce : obtenir un nombre d'isolats en nombre suffisant. Choisir un isolat représentatif du groupe, qui sera la souche type de l'espèce. Déposer cette souche dans au moins deux collections internationales reconnues.

2 – Homogénéité de l'espèce : démontrer que ces isolats partagent une homologie forte de leur ADN avec celui de la souche type.

3 – Nouveauté de l'espèce : s'assurer qu'on ne décrit pas une espèce déjà existante en démontrant que les isolats sont éloignés des espèces les plus proches phylogénétiquement.

4 – Possession de phénotypes « diagnostiques » : trouver les phénotypes ou les combinaisons de phénotypes permettant de distinguer la nouvelle espèce des espèces déjà décrites.

## Résultats

Pour l'étape n°1, nous avons choisi les souches RSA19 et TOD45 comme souche-type des deux nouvelles espèces et les avons déposés dans deux collections internationales (ATCC, LMG). Nous avons rassemblé 80 souches de *Bacillus* au sens large dont l'identification biochimique était proche des *Paenibacillus* RSA19 et TOD45. Ces souches provenaient d'une part de notre laboratoire (isolées de la rhizosphère des plantes), et d'autre part ont été fournies par Françoise Allard (sources cliniques, Recherche et Développement API-bioMérieux, La Balme les grottes) et Marie-Hélène Guinebretière (isolées de purées de légumes, UMR A408 INRA d'Avignon).

Nous avons utilisé la méthode des empreintes génétique (rep-PCR) pour repérer les isolats identiques (clônes) et réduire le travail aux isolats bien différents les uns des autres. Les méthodes de séquençages étant très lourdes, ces isolats sont criblés par l'analyse des profils de restriction du gène de l'ADNr16S amplifié (ARDRA), à l'aide de trois enzymes. Une étude ARDRA préliminaire portant sur les souches-types de 15 espèces de *Paenibacillus* avec 12 enzymes a conduit au choix de ces 3 enzymes discriminantes pour les espèces d'intérêt. Parmi les 80 souches étudiées, l'ARDRA classe 9 souches avec RSA19 (1 de la rhizosphère du maïs, 5 de celle du blé, et 3 du sol non rhizosphérique) et 4 souches avec TOD45 (toutes de purées de légumes). Les autres isolats étudiés sont classés pour certains avec des espèces de *Paenibacillus* connues et pour d'autres forment des classes (espèces) nouvelles qu'il reste à décrire. Une de ces souches, *Paenibacillus* TRO4, nous intéresse particulièrement car elle a été isolée de la rhizosphère du maïs dans la même étude que RSA19. Le séquençage total de l'ADNr16S (gène *rrs*) a montré sa proximité avec RSA19 (Fig. 1) mais parmi les 80 testés aucun autre isolat ne partage son profil ARDRA. On note qu'aucune souche clinique n'est classée avec RSA19 ou TOD45.

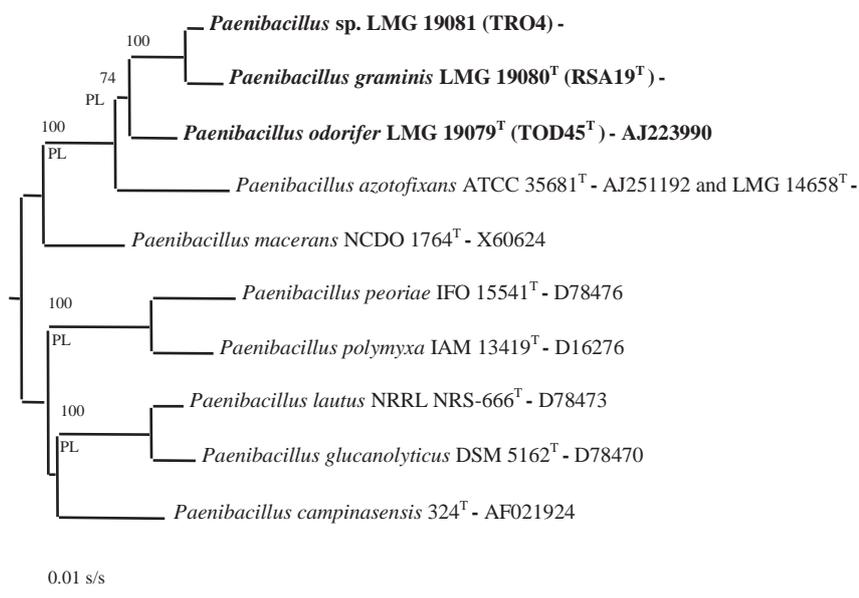


Fig 1. Phylogénie du gène *rrs* (codant l'ARNr16S) des souches fixatrices d' $N_2$  isolées de la rhizosphère de maïs (RSA19, TOD45, TRO4) et des souche-types des espèces de *Paenibacillus* apparentées.

Pour les étapes n°2 et 3, nous avons mis en œuvre la technique des hybridations ADN:ADN utilisant le marquage au tritium et la nucléase S1. Il apparaît clairement que les souches classées avec RSA19 ou TOD45 partagent entre elles plus de 70 % d'homologie entre leur ADN total alors qu'elles montrent moins de 20 % avec les souches des groupes hétérologues. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'ARDRA, et démontrent que RSA19, TOD45 et TRO4 appartiennent bien à trois espèces génomiques distinctes.

Pour l'étape n°4, des tests biochimiques discriminants ont été identifiés et deux espèces nouvelles ont été décrites que l'on a nommées : *Paenibacillus graminis*, souche type RSA19<sup>T</sup> et *Paenibacillus odorifer*, souche type TOD45<sup>T</sup>. *Paenibacillus* sp. TRO4 très proche phylogénétiquement de *Paenibacillus graminis*, ne pourra être décrite que lorsque d'autres souches homogènes auront été isolées. Les souches de l'espèce *Paenibacillus odorifer* ont la particularité de produire une odeur fruitée en culture. Nous avons établi une collaboration avec le laboratoire de Rolland FELLOUS (Laboratoire de Chimie des Arômes, Faculté des Sciences de Nice), afin d'identifier les volatils produits par ces souches et de les comparer à ceux produits par les souches des espèces voisines. L'analyse en SPME, chromatographie gaz et spectrométrie de masse, effectuée par Jean-François ANTINELLI, doctorant à l'époque des analyses (actuellement, Ingénieur AFSA), montre une très forte production de méthyl-2-butyrate d'éthyl spécifique à cette espèce bactérienne. Cette molécule est connue, car elle entre dans la composition des arômes de fraise.

**Ces résultats sont publiés dans l'article: "*Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food" Berge O., Guinebretière M.H., Achouak W., Normand P. & Heulin T. 2002. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 607-16.**

Ce travail de taxonomie nous a conduits à établir une collaboration étroite et fructueuse avec Marie-Hélène Guinebretière (INRA d'Avignon) qui travaille sur les bactéries sporulantes qui survivent à la pasteurisation dans des purées industrielles de 5<sup>ème</sup> gamme conditionnées sous vide. Le typage rep-PCR ainsi que le séquençage partiel ou total de l'ADNr16S de souches représentatives des flores des purées conservées à différentes températures pendant des temps plus ou moins longs, a permis une identification beaucoup plus fiable que celle obtenue classiquement et en routine par les méthodes biochimiques (API50CH) dont nous connaissions les limites. La problématique de cette étude est de comprendre dans quelles conditions les populations de *Bacillus cereus*, indissociables taxonomiquement des espèces *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus anthracis* et potentiellement pathogènes se développent dans ces produits. Cette étude montre qu'à 4 °C, des populations spécifiques de *Paenibacillus* psychrophiles se développent de façon importante sans qu'on puisse isoler de *Bacillus cereus* alors qu'à 10 ou 20 °C les *Bacillus cereus* sont isolés et pas les *Paenibacillus* psychrophiles. Certaines souches appartiennent à l'espèce que nous venons de décrire *Paenibacillus odorifer*, ce qui n'est pas surprenant car le travail de Marie-Hélène GUINEBRETIERE a aussi consisté à montrer que la provenance des souches des purées était essentiellement le sol transporté par les légumes. Ce travail représente une partie du travail de thèse de Marie-Hélène Guinebretière soutenue en décembre 2001.

**Ces résultats sont publiés dans l'article : "Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées" Guinebretière M.H., Berge O., Normand P., Morris C., Carlin F. & Nguyen-the C. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67 (10), 4520-30**

### **Conclusions - Perspectives**

Ce travail illustre la diversité des espèces de *Paenibacillus* dans la rhizosphère du maïs, mais aussi du blé, même si dans la rhizosphère de ce dernier l'espèce *P. polymyxa* est toujours dominante par rapport aux autres espèces de *Paenibacillus*. Ces espèces représentent un certain potentiel fonctionnel qui nous a conduits à collaborer avec d'autres laboratoires sur ce sujet. En effet, il est maintenant admis que les conditions pédo-climatiques de la plupart des sols cultivés en pays tempérés ne sont pas favorables à la fixation libre de l'azote car les quantités d'azote introduites par inoculation de souches bactériennes sont faibles. Cependant des pays tropicaux plus favorables, s'y intéressent et continuent la recherche pour valoriser la fixation d'azote des *Paenibacillus* ainsi que d'autres propriétés comme la production d'antibiotiques destinés à la lutte biologique, et s'attachent à comprendre leur écologie.

## 2- Diversité des populations de *Paenibacillus polymyxa* et pratiques culturales

### Contexte

D'après nos résultats, il semble que *P. polymyxa* soit toujours associée aux racines de blé où elle représente environ 1 % des bactéries cultivables. Cette bactérie présente un intérêt pour ses capacités à fixer l'azote, à produire des exo-polysaccharides, des antibiotiques et des auxines. D'autre part il a été démontré sur un sol cultivé dans l'est de la France que les populations sur la racine de blé sont beaucoup moins diverses que celles du sol suggérant une sélection de certaines populations par la plante. Suite à ces travaux, nous avons envisagé d'étudier les composantes de cette diversité à plusieurs niveaux : diversité de plantes individuelles, effet d'une monoculture de blé par rapport à une rotation et effet de l'ancienneté de la culture de blé.

### Résultats

#### **Diversité des populations de *P. polymyxa* sur des plantules de blé individuelles, cultivées sur un sol issu de monoculture de blé ou d'une rotation blé/maïs**

La variabilité du patron de colonisation des génotypes de l'espèce *P. polymyxa* sur le rhizoplan de plantes de blé individuelles (obtenues à partir de graines stérilisées pour éliminer toute provenance éventuelle de *P. polymyxa* des graines) a été étudiée sur un sol différent du sol de Lorraine déjà étudié. Ceci permettait de savoir si le phénomène d'homogénéité des populations du rhizoplan de blé était plus général. Nous nous sommes intéressés également à la diversité de cette espèce dans le sol non-rhizosphérique pour tester l'hypothèse de l'empreinte de la culture de blé sur les populations telluriques. On compare alors un sol sur lequel le blé est cultivé en monoculture avec un sol où il est en rotation une année sur deux en supposant que l'empreinte « blé » sera plus forte dans le premier. En effet la racine du blé semble colonisée uniquement par certains génotypes de *P. polymyxa* et on peut penser que ces génotypes peuvent progressivement dominer la population « réservoir » de *P. polymyxa*, c'est à dire celle du sol non-rhizosphérique. La station expérimentale de Grignon a été sélectionnée afin de travailler sur un dispositif agronomique pour lequel sur le même sol des placettes disposées en bloc, sont cultivées d'une part en monoculture de blé et d'autre part en rotation blé/maïs depuis plus de 20 ans.

Cette étude rencontrait plusieurs obstacles inhérents aux études de diversité, en particulier la nécessité d'avoir des méthodes d'investigation adaptées au traitement d'un grand nombre de souches : méthode d'isolement de populations minoritaires, mise en évidence de la diversité au niveau intra-spécifique et comparaison de populations. C'est pourquoi certaines étapes du travail ont nécessité des approches méthodologiques.

#### Accès aux populations de *P. polymyxa*

La méthode d'immunopréciipitation ou l'isolement direct sur milieu riche en saccharose ont d'abord été utilisés pour isoler les populations sans distinction entre spores et bactéries végétatives (Berge et al. 2010) mais n'ont pas donné de bons résultats dans ce sol. Cette espèce n'est pas dominante dans le sol et nous avons dû choisir une méthode d'isolement permettant d'avoir accès à un nombre suffisant d'individus par parcelles (l'objectif était de 30 par parcelle). La pasteurisation est pour l'instant la seule qui ait répondu à cette contrainte et cela implique de faire l'hypothèse qu'une population de *P. polymyxa* du sol est bien représentée par la population de ses spores. Cette hypothèse paraît probable, car la majorité des individus de la population du sol en absence de source de carbone et d'énergie est en dormance. La sélection des spores de *P. polymyxa* parmi l'ensemble des spores du sol est ensuite réalisée sur la base de leur capacité à fermenter l'amidon, à l'aide d'un

système de cloches de Durham. La purification est alors effectuée sur milieu gélosé riche en saccharose sur lequel *P. polymyxa* forme des colonies muqueuses typiques et reconnaissables.

Grace à la mise en oeuvre de cette méthode d'isolement, les populations de *P. polymyxa* ont été obtenues dans toutes les parcelles du dispositif de Grignon et dans les deux compartiments ce qui confirme son caractère ubiquiste dans les sols cultivés. Dans le sol non-rhizosphérique, trois séries d'isolement ont permis d'isoler 250 souches (entre 21 et 58/parcelles). Pour l'étude des populations du rhizoplan, 7 expériences (7 plantules par parcelle) ont permis d'isoler 330 souches (31 à 76/parcelles). L'appartenance de ces souches à l'espèce *P. polymyxa* est confirmée par un test phénotypique fiable et rapide (API 50CH) et pour quelques isolats par PCR-RFLP du gène codant pour l'ARNr 16S.

### Diversité génotypique

Les empreintes génétiques obtenues par rep-PCR ont été choisies pour caractériser génétiquement chaque souche. L'avantage de cette technique est d'être très discriminante, l'inconvénient est qu'aucune hypothèse génétique ne peut-être faite sur la signification de la présence ou de l'absence d'une bande dans un profil. C'est pourquoi ces profils sont caractérisés globalement. Les indices de diversité génétique de Shannon et de Simpson ont été calculés à titre indicatif pour quantifier la diversité de chaque échantillon ou de chaque compartiment.

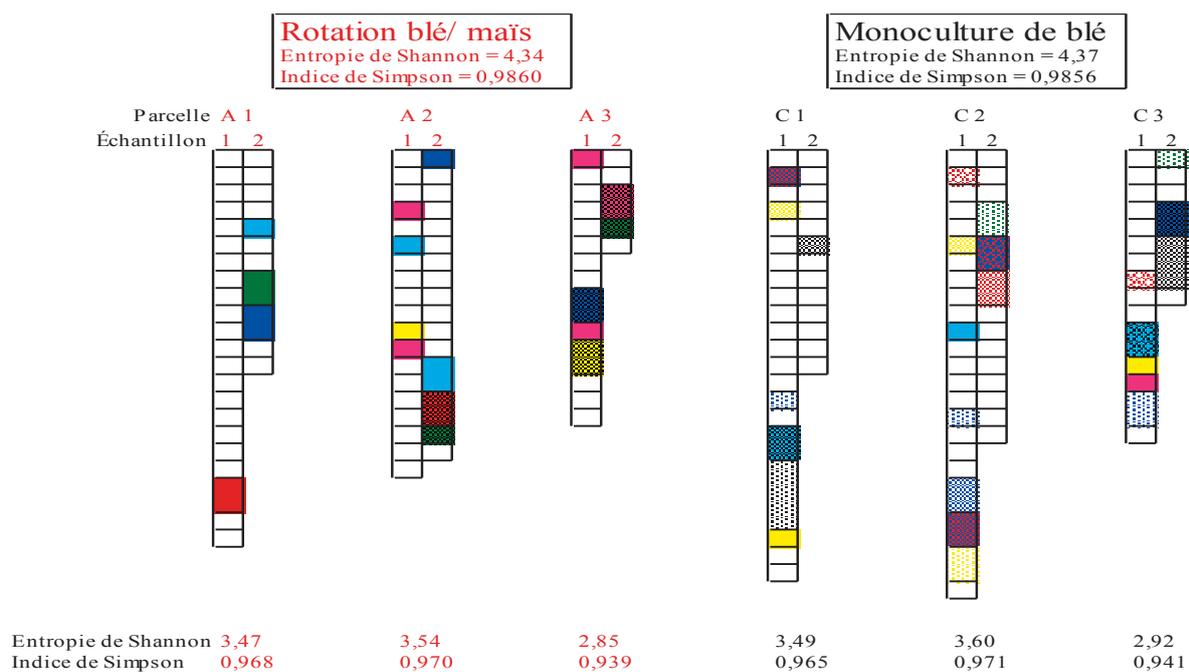


Figure 2 : Représentation schématique de la diversité des populations de *P. polymyxa* isolées de la fraction de sol non-rhizosphérique. Les sols provenant de parcelles cultivées en rotation blé/maïs sont comparés à ceux obtenus de parcelles cultivées en monoculture de blé dans un dispositif de la ferme expérimentale de Grignon (AgroParisTech). Les isolats sont caractérisés par leur empreinte génétique REP-PCR. Chaque colonne représente un échantillon et chaque rectangle un isolat. Les isolats représentés par des rectangles incolores ont des profils uniques dans ce compartiment de sol non-rhizosphérique (plus il y a des rectangles incolores, plus il y a de diversité). Les rectangles colorés représentent les isolats qui partagent leur profil REP avec au moins un autre isolat de ce compartiment. A une couleur correspond un profil REP-PCR.

Sur la figure 2 sont présentés les résultats obtenus pour les populations isolées du sol non-rhizosphérique. Il apparaît que la diversité est très importante, puisque la majorité des profils sont uniques (rectangles blancs). Ceci se traduit par des indices de diversité génétique de Shannon supérieurs à quatre quand ils sont calculés pour toute la population d'une pratique culturale. La même représentation schématique des souches du rhizoplan est présentée sur la figure 3. Les populations isolées des racines n'ont pas la même structure que celles du sol nu : dans la majorité des expériences on obtient une assez grande diversité mais dans 1 cas sur 8, la population de spores isolées est clonale au moins en partie. Ceci n'a été observé dans aucun des isolements sur sol non-rhizosphérique.

L'observation des populations de spores du rhizoplan confirme donc que la diversité de ces populations est réduite sur la racine par rapport au sol non-rhizosphérique (indices de diversité plus faibles), par contre les populations clonales ne sont pas génétiquement identiques d'un échantillon à l'autre contrairement à ce qui avait été montré sur le sol de l'est de la France. Il semble probable que ces populations sont la conséquence de la colonisation des racines de blé par un clone qui a sporulé suite à une forte croissance. L'effet rhizosphère serait donc différentiel selon le pool génétique des souches.

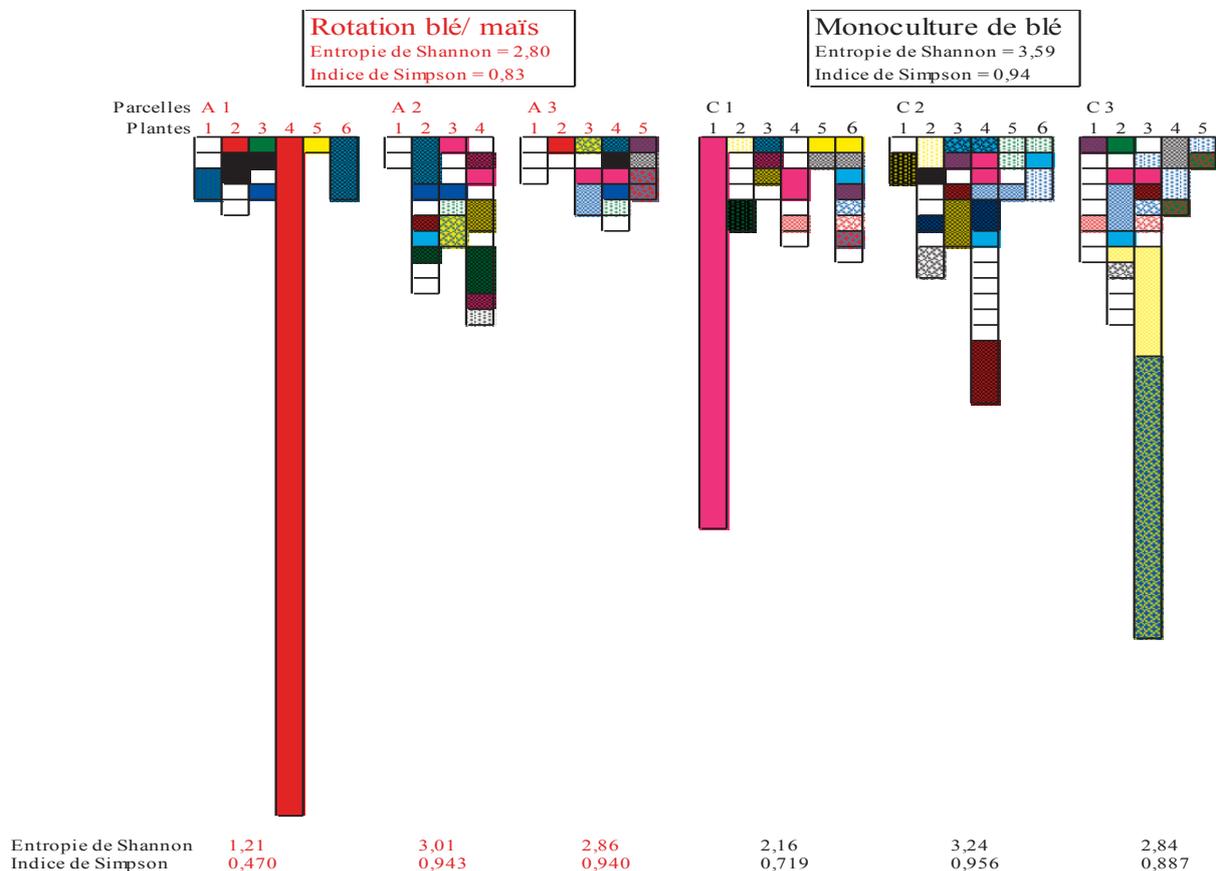


Figure 3 : Représentation schématique de la diversité des populations de *P. polymyxa* isolées du rhizoplan de plantules de blé. Les plants de blé sont obtenus au laboratoire par semis de graines stériles sur les sols provenant de parcelles cultivées en rotation blé/maïs ou en monoculture de blé prélevés dans un dispositif de la ferme expérimentale de Grignon (AgroParisTech). Chaque colonne représente un échantillon et chaque rectangle un isolat. Les isolats représentés par des rectangles incolores ont des profils uniques dans le sol rhizosphérique (plus il y a des rectangles incolores, plus il y a de diversité). Les rectangles colorés représentent les isolats qui partagent leur profil REP avec au moins un autre isolat de ce compartiment. A une couleur correspond un profil REP-PCR.

Tout se passe comme si, quelques génotypes sont plus aptes que les autres à se développer sur le rhizoplan et à se développer seul. En effet la racine a accès à plusieurs génotypes puisqu'on retrouve une diversité importante sur les racines non colonisées par des populations clonales, et malgré cela, un seul (ou deux dans un seul cas) génotype colonise la racine. Leurs capacités métaboliques, la vitesse de croissance sur les substrats contenus dans les exsudats ou la production d'antibiotiques ou de bactériocines pourraient expliquer ce résultat. Malgré le potentiel à coloniser de certaines souches, leur présence n'est pas suffisante pour qu'elles se développent puisqu'on retrouve ces mêmes génotypes sur d'autres racines sans qu'il y ait eu colonisation. D'autres facteurs comme le moment de la rencontre de la racine avec ce génotype, les antagonismes microbiens ou des facteurs physico-chimiques doivent gouverner aussi cette interaction.

La comparaison monoculture de blé, rotation blé/maïs montre que la pratique culturale n'a pas d'effet significatif sur la taille des populations, le nombre d'isolats obtenus ni sur les indices de diversité des populations de *P. polymyxa* du sol non-rhizosphérique (Fig. 2). Le développement de populations clonales importantes sur le rhizoplan, ne se répercute pas de façon significative sur la composition des populations du sol non-rhizosphérique. Il n'apparaît pas non plus de génotype de *P. polymyxa* spécifique d'une parcelle ou d'une pratique culturale. A l'opposé des résultats obtenus sur le sol non rhizosphérique, la différence de pratique culturale a un effet significatif sur la structure des populations isolées de la rhizosphère du blé étudiées par AMOVA (Analyse Moléculaire de Variance). Contrairement à ce qu'on attendait, il y a une plus grande diversité des *P. polymyxa* des parcelles en monoculture blé, que de ceux des parcelles en rotation blé/maïs. Ces analyses sont cohérentes avec les valeurs d'indice de diversité (Fig. 2 et 3). On peut expliquer ce résultat en considérant que la culture du maïs avec ses modalités (traitements spécifiques) pourrait avoir un effet global de pression de sélection assez important sur la flore rhizosphérique et en particulier sur les populations de *P. polymyxa* qui serait plus forte que la simple pression de sélection opérée par le blé et ses exsudats. Un petit nombre de souches seraient adaptées à supporter ces pressions. Un travail identique a été conduit par les partenaires de l'AIP ecosol INRA, cadre de ce travail, sur d'autres types de populations (*Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescents*, *Fusarium*, *Rhizobium leguminosarum*) isolées des mêmes parcelles qui montre que seule la diversité des populations de *Rhizobium* est affectée par la pratique culturale de la même façon que pour les *P. polymyxa* (diversité plus grande sous monoculture). Pour les *R. leguminosarum*, l'effet maïs sera confirmé par une étude sur parcelle de monoculture de maïs, qui diminuera encore leur diversité (Depret et al. 2005). Pour les populations de *P. corrugata*, si la diversité est équivalente, la structure des populations est différente entre les deux pratiques culturales et il existe une population « marqueur » de la monoculture de blé qui représente 10 % des *P. corrugata* isolés, qui pourrait être à la fois sélectionnée par le blé et contre-sélectionnée par les modalités de la culture de maïs (Achouak et al. 2000).

### **Conclusion-perspectives**

Nous n'avons pas d'éléments pour savoir si la diversité des populations de *P. polymyxa* que nous avons observée était pré-existante c'est à dire héritée et la conséquence du mode de dormance sous forme de spores (qui permettrait de maintenir un plus grand nombre de génotypes) ou bien le résultat de remaniements génétiques spécifiques de cette espèce pendant la germination des spores par exemple ou par recombinaison ou transformation comme cela est connu pour d'autres espèces de *Bacillus*. Il ne semble pas que le mode de culture ait d'influence sur ces phénomènes puisque la diversité des populations du sol non-rhizosphérique est comparable dans les parcelles des deux modes de culture.

D'après les structures de populations que nous avons isolées il semble que deux alternatives existent dans l'interaction des populations de *P. polymyxa* et des racines du blé quand elles progressent dans le sol : dans la première, aucune souche rencontrée dans le sol n'a permis la colonisation massive de la racine du blé et le nombre de spores isolées est faible (< 15 / plante) et la

diversité élevée. Dans la deuxième, un type a colonisé les racines du blé en dominant la population de *P. polymyxa* et le nombre de spores isolées est élevé (> 15 / plante) et la diversité est faible. Il existe un cas intermédiaire où deux génotypes ont pu se développer à moins que l'on ait une image d'une étape intermédiaire avant la dominance par un génotype. Ces déséquilibres d'effectifs observés sur la racine, ne se retrouvent pas dans le sol non-rhizosphérique.

Cette étude met en évidence la complexité des patrons de colonisation d'une racine de plante cultivée par des populations d'une espèce rhizosphérique minoritaire. La plante est bien un moteur de réduction de la diversité bactérienne et certains génotypes sont plus aptes à coloniser ces racines que d'autres (effet souche). Un suivi au cours du temps permettrait de connaître la dynamique de la diversité de ces populations.

### 3- Effet de l'histoire culturelle des sols : de l'Algérie à l'Australie

#### Contexte

Dans le cadre d'une collaboration Franco-algérienne, des populations de *Paenibacillus polymyxa* ont été isolées de la rhizosphère du blé dur sur cinq sols algériens par immunopréciipitation. Ces sols avaient été choisis pour leur histoire de culture du blé allant de probablement plus de 2000 ans (dans les écrits, l'allusion à cette culture dans cette région du nord de l'Algérie remonte à l'époque romaine) à 5 ans pour un sol mis en culture récemment en passant par 26 et 70 ans. En effet, des nouvelles terres sont mises en cultures pour augmenter la production face à une demande croissante et la connaissance de l'écologie de ces populations associées au blé permettrait d'envisager un accompagnement microbiologique des cultures.

#### Résultats

Le nombre de souches isolées a été d'autant plus important que la culture du blé était ancienne ce qui reflète une baisse d'abondance de *P. polymyxa* dans les cultures les plus jeunes. L'appartenance des souches isolées à l'espèce *Paenibacillus polymyxa* a été validée par la méthode de l'ARDRA développée au laboratoire et les isolats ont été regroupés par typage rep-PCR. Grâce à la méthode d'isolement par immunopréciipitation, les effectifs des groupes rep-PCR sont considérés comme représentatifs des populations résidentes. Ils ont été statistiquement comparés par  $\chi^2$  pour chaque sol et les indices de diversité calculés et comparés.

Cette analyse montre que la diversité des sols cultivés les plus récemment (5 et 26 ans) est supérieure à celle des autres et non homogène statistiquement. Dans ces sols, il semble que les souches de *P. polymyxa* ne se développent pas sur le rhizoplan. Les fortes abondances de *P. polymyxa* sont reliées le plus souvent à un développement clonal, rejoignant les résultats précédents sur les sols français. L'interprétation d'une adaptation/sélection progressive des populations de *Paenibacillus polymyxa* dans les sols les plus anciennement cultivés en blé par le blé lui-même est avancée.

**Ce travail a fait l'objet d'une publication : "Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils" Guemouri-Athmani S., Berge O., Bourrain M., Mavingui P., Thiéry J. M., Bhatnagar T. & Heulin T. 2000. Eur. J. Soil Biol. 36, 1-11.**

L'interprétation de ces résultats se heurte toutefois à la difficulté de séparer les effets liés d'une part aux propriétés intrinsèques du sol différentes d'un site à l'autre et d'autre part à son histoire culturelle. Le travail effectué par l'équipe égyptienne de Nabil OMAR a permis de montrer que dans les sols égyptiens très anciennement cultivés en céréales, le blé était très fortement colonisé par *P. polymyxa* ce qui renforce notre hypothèse même si la diversité intraspécifique de ces populations n'a pu être étudiées. *P. polymyxa* est donc bien présente dans la rhizosphère du blé dans des régions où il est cultivé depuis des millénaires (Europe et Afrique du nord) et des génotypes adaptés se

développent fortement au voisinage des racines, ce qui se traduit par une baisse de diversité par rapport à celle du sol.

Contrairement à cette situation, le blé a été introduit en Australie seulement au XIX<sup>ème</sup> siècle et sa culture pose aujourd'hui le problème du maintien de la fertilité et de la structure des sols. Nous nous sommes intéressés à ces problèmes dans le cadre d'un programme International de Coopération scientifique (PICS) qui visait à vérifier la présence de *P. polymyxa* dans les sols australiens cultivés en blé et à évaluer leur diversité afin de tester l'hypothèse de réduction de la biodiversité sur les racines dans ce contexte. Des semences d'un cultivar de blé australien très utilisé « Spear » a été désinfecté en surface et semé au laboratoire sur deux sols agricoles australiens prélevés à Waite (monoculture de blé depuis 1925, baisse de rendement) et à Kapunda un sol limoneux cultivé en blé avec des problèmes d'érosion. Cent trente-quatre souches de *P. polymyxa* ont été isolées du rhizoplan de blé et du sol non-rhizosphérique par pasteurisation. La classification hiérarchique des souches sur la base de l'acidification de 49 sources de carbone montre que les souches de *P. polymyxa* du rhizoplan sont proches des souches isolées du blé en France, elles appartiennent au même groupe phénotypique. Dans chaque sol on retrouve une population assez homogène sur le rhizoplan ce qui confirme ce qui avait été obtenu sur les sols français et sur les sols algériens, en particulier la culture de blé de même ancienneté (70 ans) en Algérie qui montrait aussi le développement des populations de *P. polymyxa*. Dans le sol non-rhizosphérique les niveaux de *P. polymyxa* sont bas et ce qui caractérise ces situations australiennes, c'est que la diversité dans le sol non-rhizosphérique n'est pas aussi grande que dans les sols français et qu'on y retrouve des types identiques à ceux de la rhizosphère. Comme si c'était la rhizosphère qui était la source des souches du sol non-rhizosphérique et non l'inverse, ce qui plaiderait pour une introduction de ces *P. polymyxa* par les graines de blé apportées par les premiers colons. Des analyses génétiques permettraient d'explorer cette hypothèse.

### **Conclusions – Perspectives**

Dans ces études, on constate que dans toutes les situations des souches de *P. polymyxa* colonisent la racine du blé, la différence est la diversité plus ou moins grande des génotypes selon les situations. Certains génotypes de *P. polymyxa* semblent avoir une compétence rhizosphérique élevée car ils colonisent le mieux la racine. Ils ont probablement aussi rencontré la racine à un moment où cette compétence a pu s'exprimer. Des dynamiques de colonisation de plantes individuelles, permettraient de savoir comment s'installent les types dominants, combien de temps ils persistent, et s'il y a des successions de types dominants différents au cours de la culture. L'observation de la fréquence des types dominants sur un plus grand nombre de plantes individuelles donnerait des indications du caractère stochastique vs adaptatif de l'amplification de ces types (est-elle liée à leur compétence rhizosphérique, au hasard des rencontres ou aux deux ?). L'analyse des propriétés de ces types dominants donnerait des pistes sur les déterminants de cette compétence : vitesse de croissance sur certains substrats carbonés, production d'antibiotiques qui font baisser le niveau des compétiteurs, production d'auxine qui modifie la croissance racinaire, production d'EPS qui tamponne les stress chimiques ou hydriques, etc.... Ces déterminants sont multiples et peuvent aussi concerner des échanges de signaux moléculaires. Nous avons exploré les caractères liés à la relation trophique (acidification de 50 carbohydrates). Cependant aucun trait constant n'a pu être identifié entre les souches compétentes. Pour prolonger ces perspectives, il serait intéressant de suivre ces types de souches naturellement dominantes en les inoculant aux semences de blé, ce qui supprime le hasard des rencontres. Ces types colonisent-ils systématiquement la racine quand ils sont inoculés, la dynamique de colonisation est-elle plus rapide, dure-t-elle le même temps ? Ceci donnerait des pistes pour repérer les types qui colonisent avec le plus de succès, sachant la difficulté existante pour déplacer les populations indigènes. Enfin, il serait intéressant de connaître l'effet de certaines propriétés de ces souches comme la production de polysaccharide sur l'agrégation du sol rhizosphérique et d'évaluer l'intérêt d'une inoculation pour remédier aux problèmes d'érosion dans les sols fragiles comme en Australie ou en Algérie sur les sols sableux récemment mis en culture.

### 3 B. Rôle des bactéries productrices d'exopolysaccharides dans la rhizosphère des plantes

**Participants :** C. Santaella (CR CNRS), G. Brandelet (T CEA), C. Brutesco (T CEA), J. Thomas, J. Maurel, F.Z Haichar, F. Courard (Stagiaires), Marie-Anne Roncato (T CEA), A. Lodhi (Chercheure invitée)

**Collaborations internes:** T. Heulin (DR CNRS), W. Achouak (CR CNRS), J. Balesdent (DR INRA), Groupe de recherches Appliquées en Phytotechnologie (GRAP), DEVM.

**Collaborations extérieures:** A. Heyraud, M. Milas, M. Rinaudo (CERMAV, Grenoble) ; G. Laguerre (INRA Dijon) ; F. Thomas (CNRS Nancy) ; P. Renault, F. Lafolie (INRA Avignon) ; R. Christen (CNRS, Sofia)

**Financements :** ACI Écologie quantitative (coordonatrice : C. Santaella) ; Toxicologie nucléaire (Coordonateurs : J. Balesdent & C. Sahut). Toxicologie nucléaire environnementale (C. Santaella).

---

#### Contexte

##### **Structure des sols et rôle dans la fertilité et la durabilité**

Le sol est un écosystème fragile en particulier dans les agrosystèmes, car sa qualité et sa fertilité dépendent étroitement de la dynamique de la matière organique et du cycle des éléments nutritifs, eux-mêmes conditionnés par la structure du sol. La dynamique de l'agrégation du sol dirige donc en grande partie le fonctionnement des sols. La structure emboîtée des sols a été décrite par Tisdall & Oades (1982) par le concept de hiérarchie des agrégats, qui sépare les micro-agrégats (20 – 250µm), des macro-agrégats (> 250µm). Oades (1984) a ajouté à ce concept l'idée que les micro-agrégats se forment à l'intérieur des macro-agrégats préformés. La dynamique de formation des agrégats est sous la dépendance de cinq facteurs principaux : les racines, les microorganismes, la faune, les composés inorganiques et les processus physiques (Six et al 2004).

##### **La rhizosphère, un site de dynamique d'agrégation du sol**

Il est donc très clair que la zone d'influence des racines ou rhizosphère, par l'activité biologique qu'elle représente et le cortège microbien qu'elle entretient, constitue un site privilégié de la dynamique de l'agrégation du sol. Il est décrit que les racines (vivantes ou mortes) constituent un noyau pour la formation de micro-agrégats et stimulent la production de molécules d'origine microbiologique impliquées dans la stabilisation des particules. D'autre part les polysaccharides sont également très souvent évoqués dans la formation de micro-agrégats très stables et leur rôle crucial pour le stockage et la stabilisation du carbone du sol à long terme.

Ceci souligne l'importance d'évaluer le rôle des bactéries productrices d'exopolysaccharides (EPS) dans la rhizosphère des plantes sur la dynamique d'agrégation du sol et d'en comprendre le fonctionnement, car très peu de données sont disponibles sur ce sujet.

##### **Démarche scientifique**

La démarche originale du LEMIRE depuis le lancement de cette problématique dans les années 90, est d'avoir une approche d'écologie microbienne pour connaître les communautés bactériennes productrices d'EPS de la rhizosphère en fonction des plantes et des sols (Alami et al. 2000, Amellal et al. 1999) et étudier la production et la fonction de ces EPS *in situ*. L'inoculation de plantes par des souches bactériennes productrices d'EPS a ainsi révélé leur rôle dans l'agrégation du sol rhizosphérique et dans la modification de la macroporosité à l'échelle macroscopique (Cohen et al. 2003, Bezzate et al. 2000).

Suite à ces résultats, nous avons avec C. Santaella, coanimé un projet à partir de 2000, qui visait à comprendre certains mécanismes mis en jeu dans l'agrégation du sol autour de la racine vivante. Nous avons choisi de travailler avec un sol représentatif des sols de grandes cultures en France (sol de parcelles expérimentales de l'INRA de Versailles), une souche bactérienne produisant un

polymère aux propriétés originales (*Rhizobium* sp. YAS34) et une plante pour laquelle nous disposons de mutants dans l'exsudation ou l'architecture racinaire (*Arabidopsis thaliana*). La mise au point par C. Santaella et l'utilisation de techniques de co-localisation novatrices à l'échelle microscopique a tout d'abord permis une avancée dans le domaine de la visualisation de la bactérie et de son polymère in situ dans l'environnement de la racine ayant poussé dans un sol.

Les premiers résultats montrent que dans le modèle choisi, la quantité de sol adhérent de l'Arabette est peu ou pas modifiée par l'inoculation de YAS34, bien que la bactérie colonise le système racinaire, ce qui n'était pas attendu. Nous avons donc testé l'hypothèse d'un effet variable de YAS34 sur différentes espèces végétales. Pour cela, plusieurs types de plantes ont été inoculés par YAS34 dans les mêmes conditions que l'arabette. Nous avons également testé l'hypothèse qu'il existe dans la rhizosphère de l'arabette sur le sol modèle, des souches bactériennes productrices d'EPS plus efficaces que YAS34. Des populations natives ont été isolées sur le sol de Versailles à la recherche d'une souche plus adaptée à cette plante.

## Résultats

### 1 - Effet de l'inoculation de *Rhizobium* sp. YAS34 sur le sol rhizosphérique de différentes plantes. Relation avec la production de polysaccharide bactérien in situ

#### Effet de l'inoculation de YAS34 sur le sol adhérent de plusieurs plantes

Différentes plantes ont été cultivées pendant 3 à 6 semaines. Les traitements inoculés reçoivent la bactérie YAS34 par inoculation du sol et des graines, les témoins de l'eau. La colonisation des racines par YAS 34 est vérifiée par dénombrement sur milieu semi-sélectif et rep-PCR.

Sur la figure 4 sont représentées les valeurs de ratio SA/RA, ratio de la quantité de sol adhérent à la racine rapporté à la masse racinaire (Berge et al. 2006). Ces résultats montrent que de façon naturelle (en vert) la moyenne de ce ratio dépend des caractéristiques de la plante : de 20 à 120 dans ces conditions. On note aussi parfois une forte variabilité qui peut limiter l'interprétation et l'utilisation de ce ratio. L'inoculation par la même bactérie *Rhizobium* sp. YAS34 a entraîné une augmentation des ratios SA/RA du blé et du colza de façon significative. Pour les autres plantes il n'y a pas d'effet significatif de YAS34 sur ce ratio.

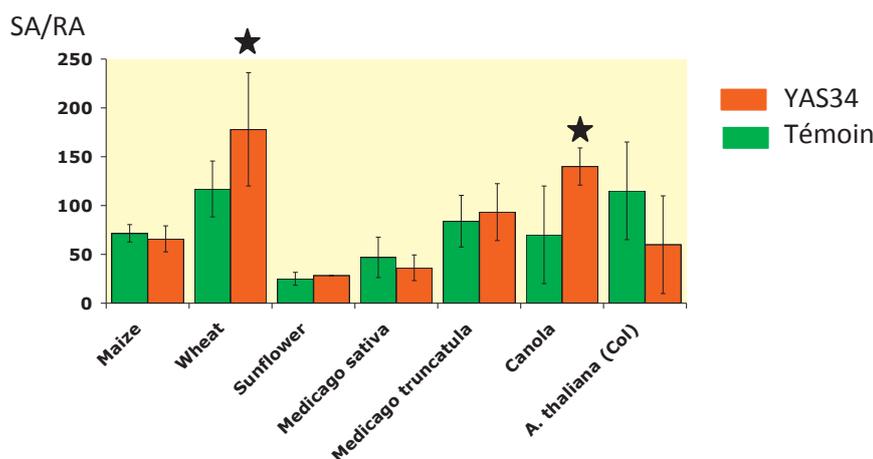


Figure 4 : Etat d'agrégation du sol rhizosphérique de différentes plantes (de g. à d. : maïs, blé, tournesol, luzerne cultivée, luzerne sauvage, colza, arabette) ayant poussé sur le sol de Versailles à un stade jeune, estimé par la mesure du ratio SA/RA, quantité de sol adhérent par unité de masse racinaire. Moyennes  $\pm$  écart-type, l'étoile marque une différence significative entre traitements inoculé (YAS34) et témoin ( $P < 0,05$ ).

L'effet de l'inoculation sur l'agrégation rhizosphérique dépend bien de l'espèce végétale. Le type de semence, la mise en place et l'architecture du système racinaire, la nature des exsudats, la production d'EPS dans la rhizosphère, sa biodégradation, les interactions moléculaires entre YAS34 et ces différentes plantes pourraient expliquer cette variabilité.

#### Visualisation in situ de la production d'exopolysaccharide de *Rhizobium* sp. YAS34

Nous avons donc choisi d'étudier le lien entre l'effet de l'inoculation sur le ratio SA/RA et la production d'EPS de YAS34 *in situ*, grâce à la microscopie confocale à balayage laser et aux outils de biologie moléculaire. Le marquage spécifique de l'EPS de la souche *Rhizobium* sp. YAS34 est réalisé par interaction avec une lectine marquée par un fluorochrome (concanavaline A-TRITC). La bactérie a été elle-même préalablement transformée par conjugaison afin d'y introduire un plasmide portant le gène de la « Green Fluorescent Protein » ou GFP exprimé de façon constitutive. Ainsi la bactérie peut être visualisée même dans le sol par sa fluorescence verte en même temps que son EPS qui est visualisé par sa fluorescence rouge (Fig. 5). Les observations d'*A. thaliana* inoculées par YAS 34, montre que l'EPS est bien produit dans la rhizosphère, mais que la synthèse de l'EPS n'est pas essentielle pour produire des biofilms sur les racines ce qui n'était pas attendu. La production d'EPS est localisée sur des parties spécifiques des racines en particulier dans la partie basale (Fig. 5A), alors que c'est dans la partie subapicale qu'on les trouve habituellement (exudation maximale). Des déterminants de cette production sont à rechercher peut-être dans la nature des exsudats. Cette production d'EPS est indispensable pour la survie de la bactérie dans la partie basale.

Ces résultats ont été publiés dans l'article : « The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization » Santaella C., Schue M., Berge O., Heulin T. & Achouak W. 2008. Environ. Microbiol. 10 (8) 2150-63.

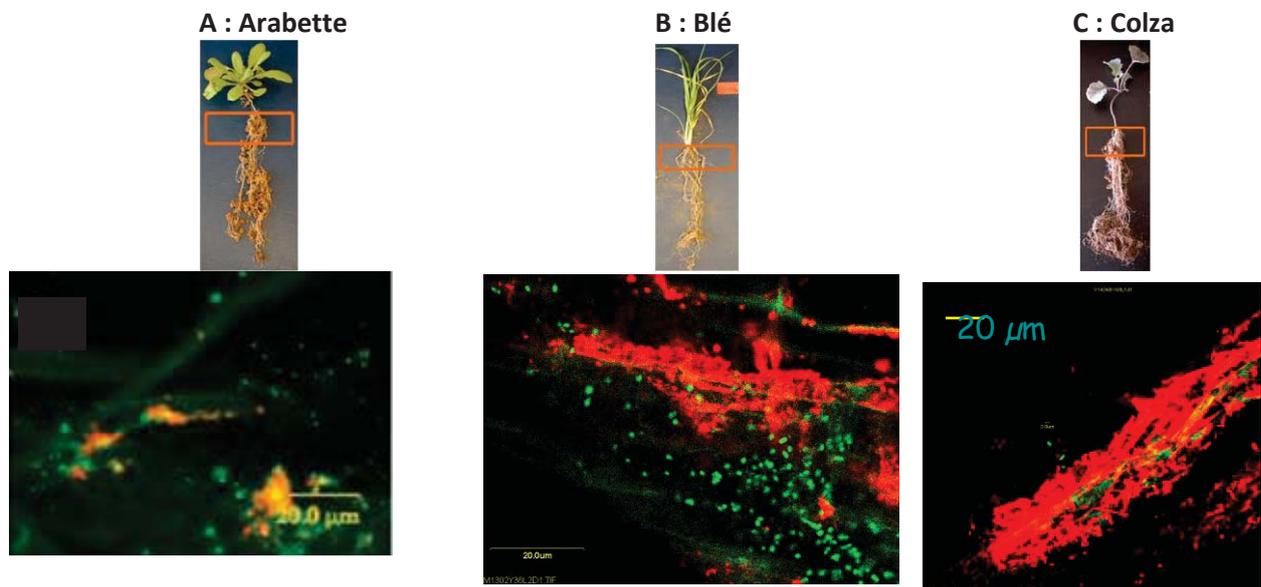


Figure 5 : Observation des parties basales des systèmes racinaires de trois plantes différentes inoculées par *Rhizobium* sp. YAS34-GFP, visualisée en fluorescence verte. L'EPS de YAS34 est visualisé spécifiquement, grâce à l'interaction avec une lectine couplée au fluorochrome TRITC (rouge).

Le blé et le colza pour lesquels YAS34 augmente le ratio SA/RA, et *A. thaliana* pour laquelle ce ratio n'est pas affecté par l'inoculation de YAS34 ont été choisis pour effectuer des observations microscopiques. Les résultats illustrés par la Figure 5 ont permis de démontrer pour la première fois

et dans le sol i) que la bactérie YAS34 inoculée au semis colonise les systèmes racinaires et produit son exopolysaccharide aux dépens des exsudats racinaires de différentes plantes, monocotylédone, dicotylédone, cultivée ou sauvage, ii) que la production d'EPS n'est abondante que dans les parties âgées du système racinaire chez toutes ces plantes iii) que la production d'EPS observée in situ à l'échelle microscopique peut-être corellée à l'effet sur le ratio SA/RA puisque c'est sur le blé et le colza qu'on visualise le plus d'EPS, et c'est sur ces plantes que l'inoculation de YAS34 entraîne une augmentation significative de sol adhérent.

Ce travail permet d'établir un lien direct entre le test d'agrégation (mesure du ratio SA/RA) et la production de polymère dans la rhizosphère reliant ainsi une observation macroscopique (masse de sol agrégé sur les racines) à une observation microscopique. La quantification de l'EPS en microscopie est pour l'instant trop biaisée pour pouvoir quantifier ces corrélations.

Le deuxième volet de cette étude ciblait la recherche des bactéries productrices d'EPS natives du sol de Versailles, dans la rhizosphère de l'arabette.

## 2 - Diversité des communautés bactériennes productrices d'exopolysaccharides colonisant la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana* dans le sol de Versailles

### Isolement, purification des souches

Une campagne d'isolement sans a priori, a été menée sur trois cultures indépendantes d'arabette sur le sol modèle. Les racines et leur sol adhérent sont prélevées après environ un mois de culture, elles sont lavées et broyées et servent à obtenir des colonies isolées sur milieux minéral contenant diverses sources de carbone (0,4%) pour isoler le plus de diversité possible. Le sol adhérent est traité de la même façon. Quarante-quatre souches produisant des colonies muqueuses ont ainsi été obtenues et typées par rep-PCR. Grâce au séquençage partiel du gène de l'ARNr16S (400 à 500 pb), une tentative d'identification a été possible pour 76 souches (Tableau 1).

Tableau 1 : Structure des communautés bactériennes productrices d'exopolysaccharides, isolées de la rhizosphère d'*A. thaliana* dans une parcelle de l'INRA de Versailles. La tentative d'identification à l'espèce a été réalisée par analyse phylogénétique de séquences partielles de gène de l'ARNr16S.

Espèce la plus proche	Effectif	Classification
<i>Rhizobium sullae</i>	37	Alpha proteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae
<i>Rhizobium galegae</i>	4	Alpha proteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5	Alpha proteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3	Alpha proteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae
<i>Ensifer adhaerens</i>	10	Alpha proteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae
<i>Caulobacter</i>	2	Alpha proteobacteria. Caulobacterales, Caulobacteraceae
<i>Variovorax paradoxus</i>	3	Beta proteobacteria, Burkholderiales, Comamonadaceae
<i>Zooglae ramigera</i>	1	Beta proteobacteria, Rhodocyclales, Rhodocyclaceae,
<i>Bacillus megaterium</i>	2	Firmicutes (Gram+, bas GC), Bacilli, Bacillales, Bacillaceae
<i>Microbacterium</i>	5	Actinobacteria (Gram+, haut GC), Actinobacteridae, Actinomycetales, Micrococcineae, Microbacteriaceae
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	1	Actinobacteria (Gram+, haut GC), Actinobacteridae, Actinomycetales, Micrococcineae, Micrococcaceae
<i>Rhodococcus</i>	1	Actinobacteria (Gram+, haut GC), Actinobacteridae, Actinomycetales, Corynebacterineae, Nocardiaceae
<i>Flexibacter</i>	1	Bacteroidetes/Chlorobi group, Bacteroidetes, Sphingobacteria, Sphingobacteriales, Flexibacteraceae
<i>Flavobacterium</i>	1	Bacteroidetes/Chlorobi group, Bacteroidetes, Flavobacteria, Flavobacteriales, Flavobacteriaceae

La structure de ces communautés montre que les bactéries appartiennent à quelques unités taxonomiques assez éloignées et diversifiées (Tableau 1). Le groupe Alpha Proteobacteries est très dominant (> 80% des souches). Le détail des identifications montre que dans les Alpha proteobactéries, la plupart des bactéries appartiennent au groupe des *Rhizobiaceae* et une majorité d'entre-elles sont taxonomiquement proches de l'espèce *Rhizobium sullae*. Ces souches sont par ailleurs très proches de la souche modèle YAS34, isolée indépendamment sur un autre sol, de la rhizosphère du tournesol ce qui n'était pas attendu.

#### Taxonomie de bactéries productrices d'exopolysaccharides dans la rhizosphère

Un travail de taxonomie a été mené pour décrire ce groupe de *Rhizobium* dominant qui constituait manifestement une (voire plusieurs) nouvelle espèce. La souche YAS34 appartenant à ce groupe avait été isolée d'une racine-pivot d'une plante de Tournesol cultivée sur un sol agricole. Elle a été sélectionnée car elle produisait un abondant polymère qui présentait une propriété « élastique » remarquable (Alami et al 1998). Sur la base de la séquence du gène de l'ARNr16S Alami et al. (2000) avaient classé YAS 34 dans le genre *Rhizobium* éloignée de toutes les espèces décrites.

Parmi des bactéries productrices d'EPS isolées d'*Arabidopsis thaliana*, la moitié des isolats (37) avaient 99,5 % d'identité de séquence de l'ADNr16S avec YAS34. Pour la description d'une nouvelle espèce bactérienne, il est fortement recommandé de rassembler un certain nombre de souches avec la plus grande diversité possible. Nous avons donc sélectionné treize souches, douze provenant de cinq plantes d'arabettes différentes dans trois expériences indépendantes et une isolée du blé et dont la séquence de l'ADNr16S était très proche de celle de YAS34 (Kaci et al. 2007). Enfin nous nous sommes procuré la souche USDA 1920 isolée de nodules de *Medicago ruthenica* par van Berkum et al. (1998) qui présentait une forte identité de séquence avec YAS34. La diversité génétique des souches a été étudiée par obtention d'empreintes REP-PCR, qui montrent que chaque souche sélectionnée a un profil unique. La souche GBV016<sup>T</sup> a été choisie pour souche-type et déposée dans deux collections internationales sous les codes CFBP 7146<sup>T</sup>, LMG 26466<sup>T</sup>.

Les analyses phylogénétiques des séquences de l'ADNr16S de trois de ces souches ont permis de confirmer l'appartenance de ces souches au phylum des *Rhizobium* et de désigner *Rhizobium sullae* comme espèce la plus proche (Fig 6).

Des mesures d'hybridation ADN:ADN sont nécessaires pour d'une part différencier le groupe de souches des espèces proches et d'autres part pour prouver que toutes les souches appartiennent à la même espèce. Les souches type des espèces *R. sullae* et *R. mongolense* hybrident 10 à 22 % de leur ADN avec nos souches ce qui étant très inférieur à la valeur seuil de 70 %, montre que ces souches appartiennent à de nouvelles espèces. Neuf des douze souches ont hybridé entre-elles leurs ADN de 70 à 100 % ce qui étant au-dessus du seuil montre qu'elles appartiennent toutes à la même espèce génomique. Les quatre souches restantes (dont celle du blé) montrent des valeurs d'hybridation de 24 à 48 % entre-elles et avec le groupe de neuf souches. Elles représentent donc quatre espèces génomiques distinctes qui n'ont pu être décrites complètement (nombre d'isolats insuffisant) contrairement à l'espèce génomique constituée de 9 souches.

Des tests biochimiques de respiration de substrats à l'aide du système BIOLOG ont permis de définir des caractéristiques phénotypiques spécifiques qui permettent de décrire formellement la nouvelle espèce et de la nommer. *Rhizobium alamii* a été choisi en l'honneur de Y. Alami découvreur de YAS34.

**Ces résultats sont publiés dans l'article " *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres " Berge O., Lodhi A., Brandelet G., Santaella C., Roncato M., Christen R., Heulin T., Achouak W. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59 (2), 367-72.**

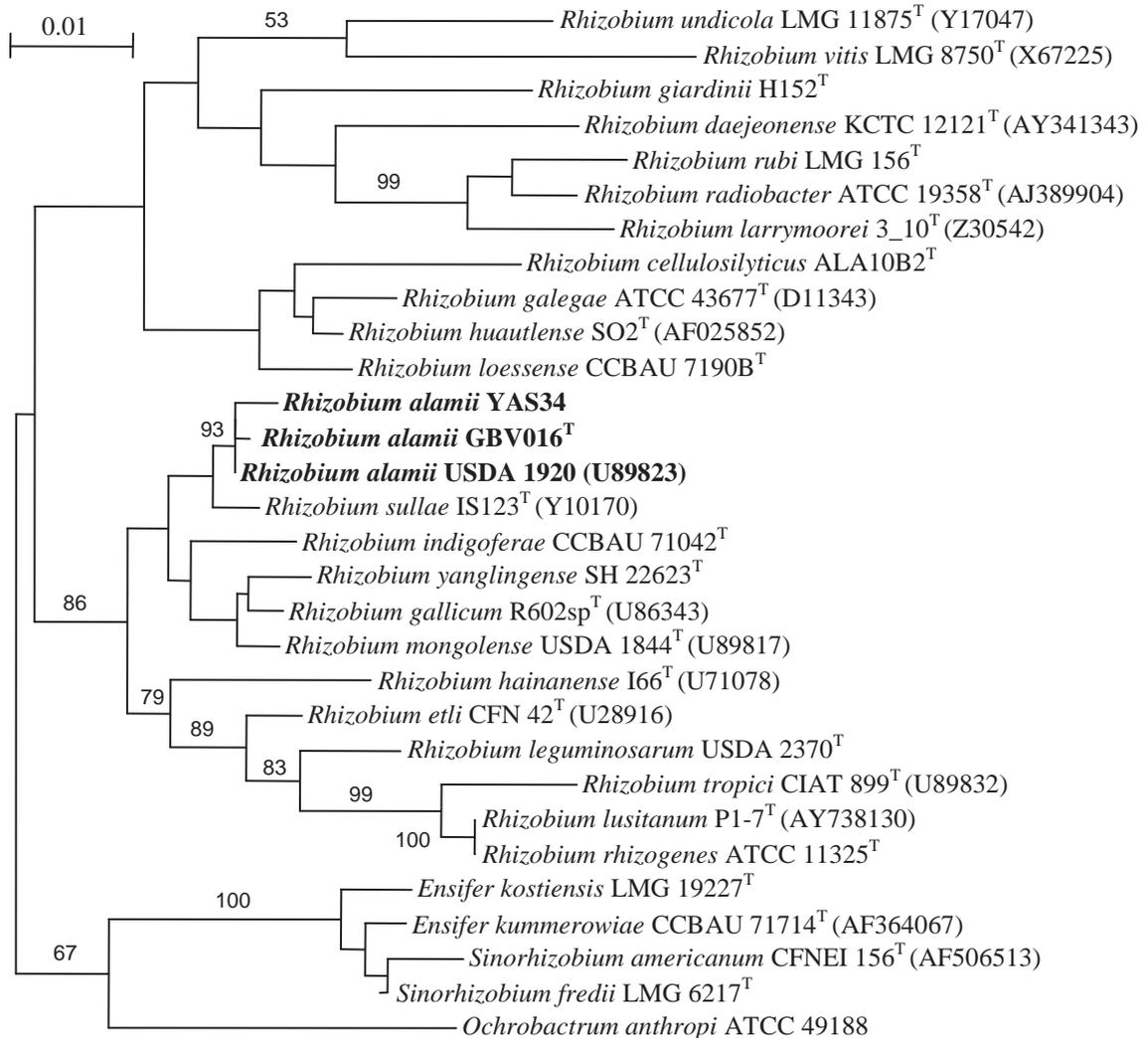


Figure 6 : Topologie basée sur les séquences du gène de l'ARNr16S des souches de *R. alamii* GBV016<sup>T</sup>, YAS34, USDA 1920 et des souches type des espèces les plus proches. Barre : 1 substitution par 100 nucléotides.

À l'origine, les espèces de *Rhizobium*, étaient décrites relativement à leur association symbiotique avec le groupe des plantes Fabacées et leur nomenclature était construite sur la base de la spécificité d'hôte. C'est pourquoi la description d'espèces de *Rhizobium* basée sur des souches isolées en dehors de nodosités de ces plantes a été relativement tardive. Elle a permis d'envisager leur fonction dans le sol sous un nouveau jour (Denison & Kiers, 2004). La description de *R. alamii*, et l'observation de quatre espèces génomiques nouvelles, s'inscrivent dans cette nouvelle vision de ce groupe bactérien dont on retrouve également des espèces en bioréacteurs (Quan et al., 2005; Hunter et al., 2007) et dans la sciure de peuplier (Garcia-Fraile et al., 2007). Contrairement à la vision habituelle de ce genre (bactéries symbiotiques des Fabacées), les espèces de *Rhizobium* sont très probablement fréquentes dans la rhizosphère de toutes les plantes y compris non-Fabacées. Ces bactéries sont connues pour leur abondante production d'EPS qui pourrait donc jouer un rôle important sur la structuration du sol rhizosphérique de nombreuses plantes et par extension de nombreux sols.

**Typage des exopolysaccharides et de leur propriété vis à vis de la stabilisation du sol.**

La fonction et les activités biologiques des EPS sont difficiles à modéliser et à prédire bien qu'elles dépendent des caractéristiques moléculaires, structurales et physico-chimiques des molécules. La structure des exopolysaccharides produits par les souches cultivées sur un milieu glucose a été étudiée au CERMAV à Grenoble par RMN du proton (A. Heyraud). Cette analyse a permis de les classer en différents types présentés dans le tableau 2. Les EPS de type inconnu, ont été nommés du nom de la souche analysée. Un travail de caractérisation de ces EPS et de leur propriété vis-à-vis du sol a alors été effectué afin de comparer leur effet sur la structuration du sol.

Tableau 2 : Diversité des exopolysaccharides (EPS) produits par les souches bactériennes issues du sol de Versailles, isolées de la rhizosphère d'*A. thaliana*

Espèce bactérienne	Nombre de souches	Type d'EPS (structure RMN)
<i>Rhizobium alamii</i>	2 3 4 2	EPS « YAS34 » <b>EPS nouveau « LEM14 »</b> <b>EPS nouveau « ALV118 »</b> <b>EPS nouveau « GBV016 »</b>
<i>Rhizobium</i> sp. (souches proches de <i>R. alamii</i> qui n'ont pas fait l'objet d'une étude taxonomique approfondie)	12 2 1 4 1	<b>EPS nouveau « LEM14 »</b> <b>EPS nouveau « ALV118 »</b> <b>EPS nouveau « GBV016 »</b> Ne produisent plus ND
Espèce génomique <i>Rhizobium</i> sp. GBV043-like	1	EPS « YAS34 »
Espèce génomique <i>Rhizobium</i> sp. GBV008-like	1	<b>EPS nouveau « GBV008 »</b>
Espèce génomique <i>Rhizobium</i> sp. GBV006-like	1	<b>EPS nouveau « GBV016 »</b>
Espèce génomique <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207-like	1	<b>EPS nouveau « ALV118 »</b>
<i>Rhizobium galegae</i>	4	<b>EPS nouveau « GBV011 »</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5	Succinoglycane
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2 1	Succinoglycane <b>EPS nouveau « GBC405 »</b>
<i>Ensifer adhaerens</i>	10	Succinoglycane
<i>Variovorax paradoxus</i>	3	Produit peu, ND
<i>Zooglae ramigera</i>	1	Produit peu, ND
<i>Bacillus megaterium</i>	2	Ne produit plus
<i>Microbacterium</i>	5	Levane

À côté de structures attendues comme les lévanes produits par les souches de *Microbacterium* sp., les succinoglycanes produits par des souches proches d'*A. tumefaciens*, de *S. meliloti* et d'*E. adhaerens*, sept EPS sont de type nouveau (Tab. 2). Parmi ces EPS inconnus, 4 sont produits par des souches de *R. alamii* ou d'espèces proches, 1 par une souche identifiée à *R. galegae* et le dernier par une souche proche de *S. meliloti*. Deux souches produisent un EPS de même structure que celui de YAS34 qui lui-même est original. Il semble qu'il existe un ensemble d'espèces autour de *R. alamii* dont les souches produisent un certain panel d'EPS, répartis horizontalement puisqu'on retrouve des souches produisant le même EPS dans des espèces différentes.

Nous avons testé certaines de ces bactéries produisant des EPS de structures variées pour leur capacité à stabiliser le sol de Versailles (non stérilisé) dans un test simplifié : le sol tamisé à 4 mm, est amendé avec un milieu minéral contenant du glucose (4 mg glucose/g sol) puis inoculé par une souche bactérienne productrice d'exopolysaccharide. Le tout est incubé à 30 °C afin que les bactéries

se développent et produisent leur EPS in situ. L'effet global de l'inoculation sur l'agrégation du sol est suivi au cours du temps par des mesures de stabilité des agrégats à l'eau sur tamis de 250 µm en agitation avec un appareil spécialement conçu pour ces mesures, par les pédologues du Centre de Pédologie Biologique du CNRS à Nancy.

La dynamique de l'agrégation du sol est représentée sur la figure 7. Le test est prévu pour obtenir environ 50 % d'agrégats stables avec le sol témoin (courbe bleue). Le sol témoin non-amandé en glucose reste à moins de 40 % d'agrégats stables pendant au moins 10 jours (courbe bleu-foncé) contrastant avec les traitements ayant reçus du glucose qui stimule la microflore indigène dès les premiers jours de l'incubation permettant l'augmentation rapide de la stabilité des agrégats. Le sol témoin amendé en glucose atteint 60 % d'agrégats stables après 5 jours (courbe rose). Cette valeur peut être significativement plus importante avec l'inoculation de la souche *R. alamii* GBV044 (EPS, LEM14) qui permet d'atteindre 90 % d'agrégats stables après 5 jours dans ce test (courbe marron). La stabilité des agrégats des traitements amendés au glucose se maintient tout au long du test et reste supérieure au sol témoin non-amandé au glucose jusqu'à au moins 3 semaines, ce qui suggère une certaine résistance des agrégats ainsi formés.

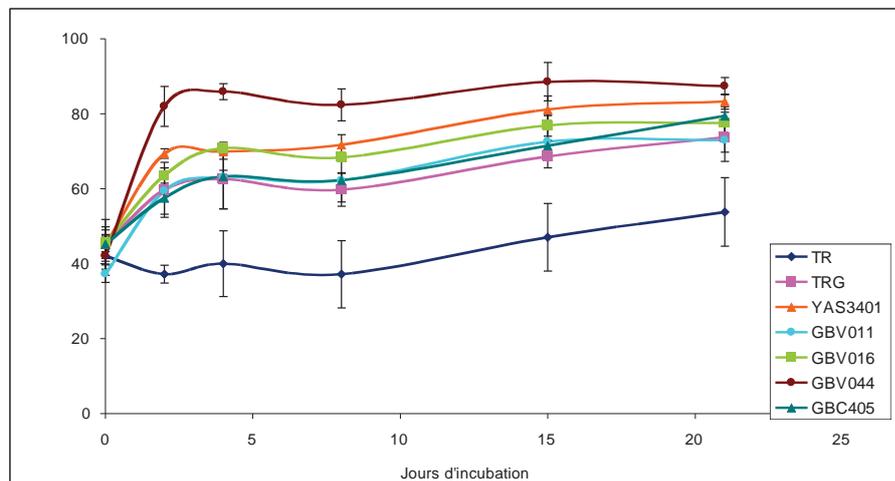


Figure 7 : Pourcentage d'agrégats stables à l'eau d'un échantillon de sol prélevé au cours de l'incubation du sol de Versailles avec des bactéries productrices d'EPS de types nouveaux. TR : sol témoin non-inoculé, sans apport de glucose ; TRG : sol témoin non-inoculé, avec le même apport de glucose que les traitements inoculés; YAS3401, GBV016, GBV044: sol inoculé par *R. alamii* (YAS3401 : YAS34 GFP). GBV011, GBC405 : sol inoculé respectivement par *R. galegae* GBV011 et *S. meliloti* GBC405.

Les EPS les plus fréquents dans la rhizosphère d'*A. thaliana*, sont les types ALV118 et LEM14 (Tableau 2). Une nouvelle expérience a été réalisée incluant ces deux souches et la comparaison des souches a été faite par analyse statistique des pourcentages d'agrégats stables après 15 jours d'incubation (Figure 8).

Les souches *S. meliloti* GBC405 et *R. galegae* GBV011 stabilisent le sol comme le témoin avec glucose. Les souches *R. alamii* ALV118, YAS34, GBV044 et LEM14, augmentent la stabilité du sol de façon significative ( $P < 0,05$ ) par rapport au témoin avec glucose. Dans ce cas, malgré la présence des populations du sol, les cellules inoculées, par leur abondance, leur état physiologique et/ou la nature de leur EPS, améliorent l'agrégation du sol. Les EPS les plus fréquents dans la rhizosphère d'*A. thaliana* sont ceux qui ont l'activité de stabilisation la plus forte du même ordre de grandeur que la souche modèle, YAS34.

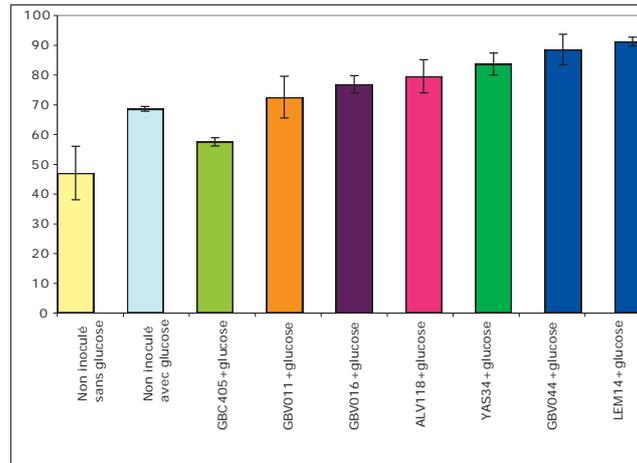


Figure 8 : Pourcentage d'agrégats stables à l'eau d'un échantillon de sol prélevé après 15 jours d'incubation du sol de Versailles avec des bactéries productrices d'EPS de types nouveaux. Les couleurs des traitements inoculés différencient les types de polysaccharides (voir tab. 2). Moyenne  $\pm$  IC 95 %.

Ces résultats nous ont conduits à tester l'inoculation de *R. alamii* GBV044 sur l'arabette sur le sol de Versailles. A l'image de ce qui était obtenu avec YAS34, les premiers résultats montrent qu'il n'y a pas d'augmentation du ratio SA/RA, alors que la bactérie a colonisé la rhizosphère. Il semble que la rhizosphère d'*A. thaliana* ne permette pas une surproduction d'EPS bactériens, dans les conditions de nos expériences.

### **Conclusions - Perspectives**

Les bactéries produisant des exopolysaccharides se développent en biofilm dans la rhizosphère de plantes variées et ce phénomène semble assez répandu. L'EPS est bien produit in situ et plutôt dans les parties âgées du système racinaire. Les déterminants de cette production localisée sont à rechercher.

L'activité de production d'EPS bactériens entretenue, voire dirigée par la plante qui exsude, est une des composantes qui module l'agrégation du sol dans la rhizosphère. Des données quantitatives seraient intéressantes à obtenir. La souche YAS34 et le blé sur le sol de Versailles constitueraient un bon modèle d'étude des mécanismes mis en jeu lors de l'agrégation du sol rhizosphérique par les EPS bactériens, bien qu'on ne dispose pas des nombreux mutants comme pour l'arabette.

Les populations productrices d'exopolysaccharides, cultivables dans la rhizosphère d'*A. thaliana*, sont dominées par les Rhizobiaceae et plus particulièrement par un ensemble d'espèces proches de *R. alamii*. Il serait intéressant de savoir si cette diversité est également présente chez d'autres espèces et en particulier le blé et le tournesol pour lesquels des souches de *R. alamii* ou proches de cette espèce, ont été isolées. Ce groupe d'espèces pourraient être assez ubiquistes dans la rhizosphère des plantes de sols cultivés et jouer un rôle majeur pour la plante, aussi bien pour sa nutrition par l'intermédiaire de la structuration du sol, que pour d'autres fonctions liées aux propriétés des polysaccharides et de leur dérivés (signalisation par les oligosaccharides, protection osmotique, complexation).

Les souches apparentées à *R. alamii* produisent différents types d'EPS en nombre finalement assez limité si on considère toutes les possibilités données par les voies de synthèse de ces macromolécules. La plante pourrait avoir un rôle de sélection, favorisant ou défavorisant certains d'entre-eux dans sa rhizosphère. Cette hypothèse conduit à penser que les EPS les plus fréquemment trouvés dans la rhizosphère sont ceux qui augmentent à la fois le pouvoir sélectif des bactéries qui les produisent et le pouvoir sélectif de la plante dans son environnement, dans une relation

mutualiste interdépendante. Les observations que nous avons obtenues sur la capacité d'agrégation du sol par les EPS les plus fréquents vont dans le sens de cette hypothèse.

Toutefois, le rôle et le fonctionnement exacts à la fois de la diversité de ces espèces bactériennes de *Rhizobium* et de leurs EPS dans la rhizosphère restent à approfondir en particulier il semble que pour l'arabette, la rhizosphère ne soit pas le support d'une importante production d'EPS ce qui pourrait être le cas de certaines plantes non cultivées. L'existence de groupes bactériens spécialisés dans cette production et cette diversification de types d'EPS reste à explorer et d'autres groupes bactériens tels que les *Microbacterium* ou d'autres sont peut-être impliqués dans une telle fonction, dans d'autres milieux, sur d'autres types de plantes ou à d'autres moments de la vie de la plante.

La rhizosphère des plantes est une source de nouvelles bactéries produisant des EPS inconnus qui ont des propriétés variées sur le sol. Au-delà de l'intérêt agronomique, ces EPS représentent aussi un fort potentiel de valorisation pour les industriels des filières de la cosmétique, de l'agro-alimentaire et de la pharmacie (trois brevets en collaboration avec la société ARD).

### 3 C. Diversité moléculaire des microorganismes du sol par traçage isotopique de l'ADN

**Participants** : F. Z. Haichar (DEA 2003 ; Doctorat, 2004-2008); W. Achouak (CR CNRS) ; M. Bressan (Doctorat, 2005-2009); J. Balesdent (DR INRA) ; M. A. Roncato (T CEA).

**Collaboration internes** : C. Santaella (CR CNRS) ; T. Heulin (DR CNRS) ; C. Brutesco (T, CEA) ; C. Marol (IE, CEA) ; Groupe de Recherches Appliquées en Phytotechnologie (GRAP, SBVME).

**Collaborations extérieures** : J. Prosser (Prof Univ Aberdeen) ; MF Marais (CERMAV) ; L. Ranjard (INRA) ; R. Christen (DR CNRS Sofia) ; C. Mougél (INRA) ; M. Krouti (CETIOM), G. Comte et F. Bellvert (CNRS Lyon)

**Financements** : MICAGRO (MICROGER), financé par ECOGER-INRA, l'ANR-ECCO et par l'ADEME.

**Bourses de thèse** : CNRS BDI-PED 2004-2007, CEA CFR (2005-2008).

---

#### Contexte

##### **Diversité microbienne dans la rhizosphère**

Les connaissances sur les communautés microbiennes du sol sont très fragmentaires. En effet, l'étude des populations reposant sur la culture préalable des microorganismes n'offre qu'une vision partielle de la diversité microbienne dans la mesure où la grande majorité (90 à 99 %) des microorganismes, n'est pas cultivable (Amann et al. 1995). Depuis quelques années grâce au développement des études de diversité moléculaire basées sur l'analyse du polymorphisme génétique de fractions d'ADN extrait directement du sol, il est possible d'avoir accès à la structure des populations et des communautés sans les cultiver (Ranjard et al., 2000). Ces approches appliquées aux gènes de l'opéron ribosomique ont révélé l'existence de phylums nouveaux et d'une diversité non soupçonnée jusqu'à présent (Hugenholtz et al., 1998). Dans quelques cas concernant surtout le cycle de l'azote, des gènes de fonction ont été également ciblés et des groupes taxonomiques ont été reliés à une activité mais dans la grande majorité des situations, en particulier pour le cycle du carbone, il est encore impossible de savoir quels microorganismes sont engagés dans quelles activités (Kent & Triplett, 2002). L'analyse des populations microbiennes de la rhizosphère dans leur diversité et leur fonction fait donc partie des challenges de l'écologie microbienne.

##### **Traçage isotopique des acides nucléiques**

C'est dans ce domaine que la méthode de traçage isotopique de l'ADN (DNA-SIP) offre des perspectives nouvelles très prometteuses (Radajewski et al., 2003). Elle est basée sur le fait que seuls les microorganismes capables de dégrader le substrat organique préalablement marqué par un isotope stable, vont incorporer cet isotope dans leurs ADN. Quand l'isotope est plus lourd comme c'est le cas pour le carbone 13, les ADN-<sup>13</sup>C plus denses peuvent être séparés des autres par centrifugation et une fois purifiés, soumis à l'analyse de la diversité microbienne à l'aide des techniques moléculaires. Cette méthode innovante est actuellement la seule qui conduit à relier la diversité des populations bactériennes à une fonction, dans une situation réelle. Cette méthode a été appliquée à l'étude de la biodégradation dans le sol, de substrats simples comme le méthanol, ou le phénol, le naphthalène ou plus complexes comme la caféine ou les hydrates de carbone polyaromatiques (PAHs) mettant en évidence des nouveaux groupes phylogénétiques.

Le couplage des techniques de traçage isotopique et de biologie moléculaire représente donc un outil élégant et prometteur pour aborder la question du rôle et du fonctionnement de ces populations qui développent une interaction avec les plantes (Boshker et al., 1998; Rangel-Castro et al., 2005). Nous avons développé cette technique pour la première fois en France au LEMIRE.

**Cette innovation fait l'objet d'un article grand public : « Couplages isotopes stables outils moléculaires en écologie microbienne » Balesdent J., Haichar F. Z. et Berge O. 2006. Biofutur 268, 33 - 36.**

### Démarche scientifique

Ce projet vise à déterminer la dynamique de la structuration des communautés bactériennes actives sur les exsudats racinaires dans un milieu complexe comme le sol par traçage isotopique de l'ADN. L'objectif est de suivre la structure des communautés et identifier les populations de la rhizosphère vraiment impliquées dans la dégradation des exsudats racinaires en s'affranchissant des étapes de culture et de rechercher au sein de ces populations actives, des gènes (ADN<sup>13</sup>C) de compétence rhizosphérique ou leur expression (ARN<sup>13</sup>C). Cette méthodologie appliquée à la rhizosphère a plusieurs étapes limitantes et nous avons organisé le travail par étape. L'optimisation de la séparation des ADN <sup>12</sup>C et <sup>13</sup>C de milieux naturels a d'abord été réalisée avec de la cellulose marquée qui permettait d'obtenir facilement un marquage de l'ADN microbien suffisamment élevé. Le marquage des exsudats de différentes plantes (dont *A. thaliana*) via la photosynthèse sous <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> a ensuite été tenté, afin de vérifier que la croissance d'une plante avec plus de 80 % de ses atomes de carbone <sup>13</sup>C n'est pas perturbée. L'étude comparative de la structure des communautés actives dans la rhizosphère des différentes plantes a été alors réalisé par traçage isotopique. L'impact de la production par *A. thaliana*, de glucosinolates et de ses produits de dégradation sur les populations actives de la rhizosphère a finalement été étudié.

### Résultats

#### 1 - Identification des bactéries cellulolytiques d'un sol par DNA-SIP

Nous avons tout d'abord mis en œuvre le DNA-SIP dans un sol avec une macromolécule modèle : la cellulose. Une cellulose marquée au <sup>13</sup>C (> 99 atome %) a été produite par la bactérie *Acetobacter xylinus* (Collaboration Marie-France Marais, CERMAV-Grenoble) purifiée et introduite dans un sol agricole. Au cours de l'incubation l'ADN total a été extrait du sol et les ADN marqués et non-marqués ont été séparés par ultracentrifugation dans un gradient de CsCl (Fig. 9).

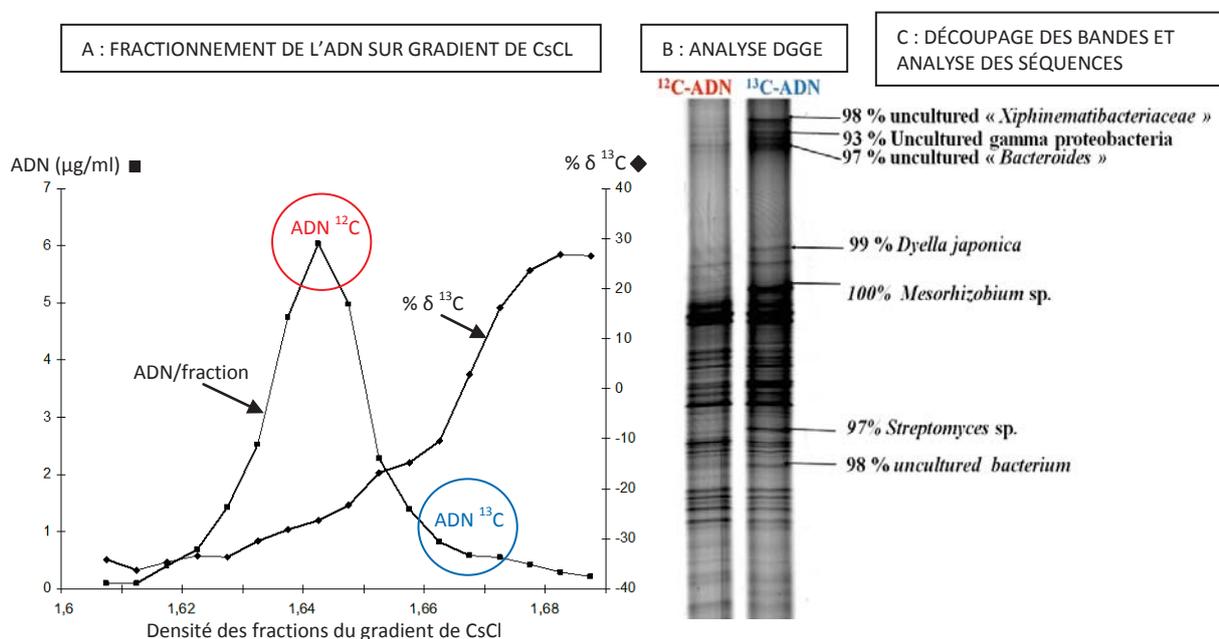


Figure 9 : Traçage isotopique de l'ADN de bactéries dégradant la cellulose. A : l'ADN extrait du sol incubé 14 j avec de la cellulose-<sup>13</sup>C est centrifugé sur gradient de CsCl. Les fractions du gradient sont analysées pour leur contenu en ADN (carrés noirs) ainsi que pour leur δ<sup>13</sup>C mesuré par IRMS (losanges noirs). L'ADN marqué est présent dans la partie dense du gradient (fort δ<sup>13</sup>C à d = 1,67). B : la structure des communautés bactériennes marquées ou non est comparée par analyse DGGE du gène codant l'ARNr16S; C : les bandes d'intérêt sont excisées et séquencées pour identification .

Par la technique de fingerprint B-ARISA (collaboration L Ranjard, INRA-Dijon), nous avons montré par ordination ACP que la structure des communautés bactériennes marquées est différente de celle des communautés non marquées et qu'elle évolue au cours du temps (DEA FZ Haichar, 2004). Nous avons introduit au laboratoire la technique d'empreintes moléculaires DGGE (Muyzer et al., 1993) afin d'identifier les bactéries cellulolytiques actives (collaboration J Prosser, Univ Aberdeen, Écosse). La comparaison de l'ADN des fractions légères (populations non actives) et lourdes (populations actives sur la cellulose) par DGGE permet d'identifier les organismes impliqués dans la cellulolyse (Fig. 9). Les prélèvements à différents temps d'incubation ont permis de suivre la dynamique des consommateurs primaires qui apparaissent entre le 7e et le 14e jour puis se développent jusqu'au 30e jour avant de décroître jusqu'au 90e jour. Les consommateurs secondaires ont une dynamique décalée dans le temps et se développent à partir du 14e jour en s'intensifiant jusqu'à la fin de l'incubation.

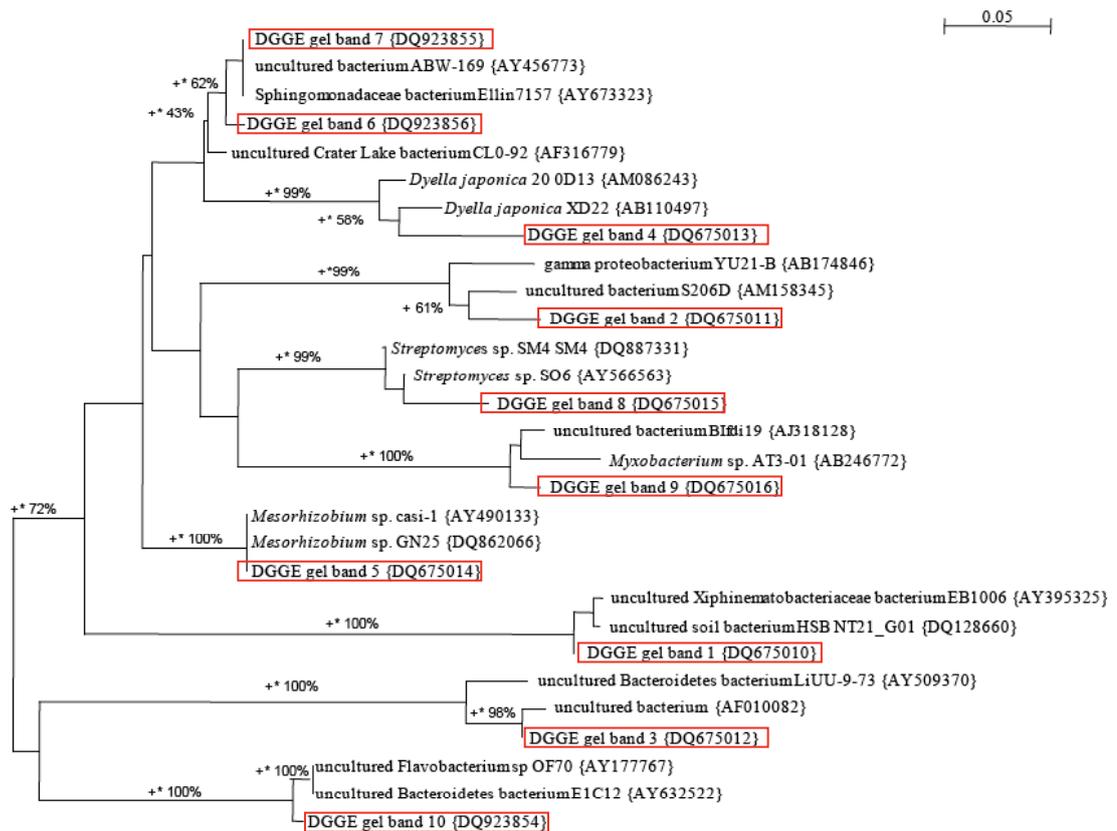


Figure 10 : Positionnement phylogénétique des bactéries impliquées dans la dégradation de la cellulose (rectangles rouges). Les bandes spécifiques des profils DGGE de l'ADN des fractions lourdes (voir Fig. 9) ont été découpées et séquencées. L'arbre phylogénétique est obtenu avec l'algorithme « neighbour-joining ».

Le positionnement des espèces impliquées dans la biodégradation de la cellulose dans un arbre phylogénétique (Fig. 10) montre la diversité des espèces impliquées et révèle le développement de populations cellulolytiques dont on ne soupçonnait pas le rôle dans ce sol, ainsi que de bactéries inconnues dont il reste à comprendre le fonctionnement.

Ces résultats sont publiés dans l'article : « Identification of cellulolytic bacteria in soil by Stable Isotope Probing ». Haichar F. Z., Achouak W., Christen R., Heulin T., Marol C., Marais M. F., Mougel C., Ranjard L' Balesdent J. & Berge O. 2007. Environ. Microbiol. 9 (3), 625-34.

## 2 - Traçage isotopique dans la rhizosphère

### Comparaison de la communauté bactérienne rhizosphérique de différentes plantes

Le traçage isotopique des microorganismes de la rhizosphère capables de consommer les exsudats racinaires nécessitait de marquer les exsudats via la photosynthèse et donc d'alimenter les plantes en  $^{13}\text{C}$  (Fig. 11). Un dispositif adapté à la croissance des plantes et étanche aux gaz a donc été conçu grâce à l'expertise du SBVME de Cadarache en matière d'installations phytotroniques et de maîtrise des techniques isotopiques. Cela nous a permis de réaliser une première en montrant que le marquage continu de cinq espèces végétales, en condition de fort  $^{13}\text{CO}_2$  (> 80 %) permet d'obtenir des plantes viables dont les biomasses sont comparables à celles des plantes cultivées en atmosphère non-enrichie. Nous avons extraits les ADN de la rhizosphère de ces plantes pour les fractionner sur CsCl et les analyser en DGGE. De différences nettes apparaissent entre les communautés marquées et non marquées de chaque plante. De plus, ces profils sont différents de ceux qui sont obtenus à partir d'ADN extrait de sol sans plante. Ces résultats montrent que l'enrichissement des ADN de la rhizosphère est suffisant pour les tracer en DNA-SIP (Fig. 11).

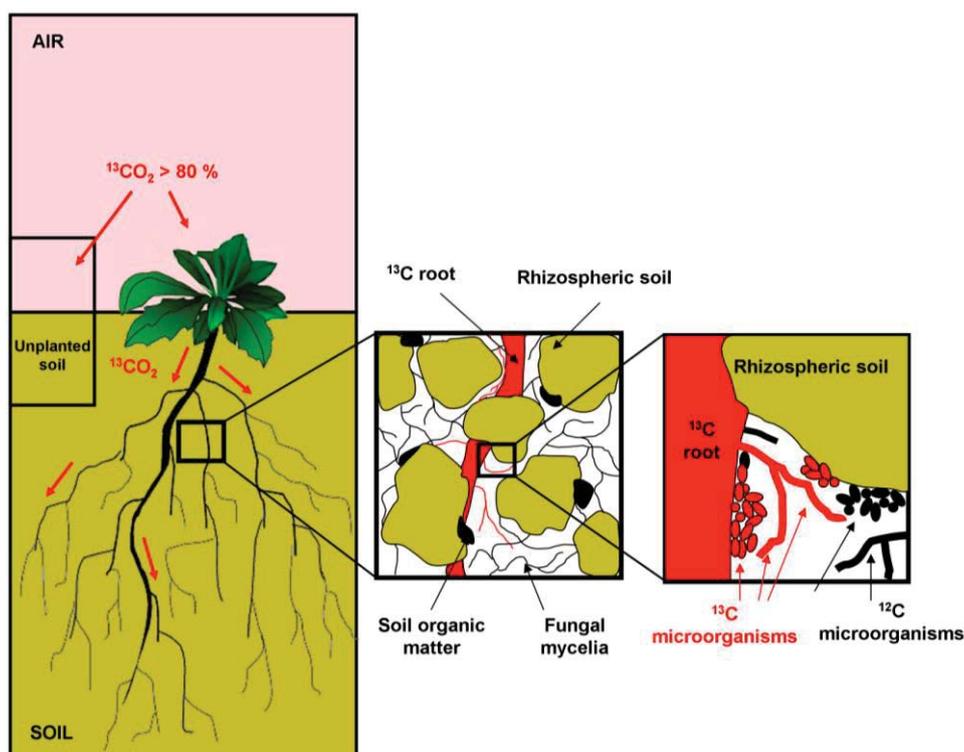


Figure 11 : Schématisation de l'approche SIP sur les microorganismes se trouvant dans la rhizosphère des plantes. Les trois fractions (racines des plantes, sol rhizosphérique et sol non planté) sont présentées durant l'enrichissement  $^{13}\text{C}$  sur une plante idéalisée. Les inserts montrent la représentation schématique des microorganismes ciblés.

Les populations actives dans la rhizosphère des différentes espèces végétales ont été identifiées par découpage de bandes spécifiques sur les gels DGGE. On postule que les bandes spécifiques des fractions lourdes donnent accès aux populations majoritaires, développées exclusivement aux dépens des exsudats de plantes, et celles spécifiques des fractions légères à celles qui sont abondantes et dormantes ou le plus souvent à celles qui se sont divisées aux dépens de la matière organique du sol.

Les résultats montrent que les exsudats des espèces végétales testées, blé, maïs, colza et luzerne, façonnent la structure de la communauté bactérienne dans la rhizosphère. Des bactéries apparentées aux Sphingobactériales et aux *Myxococcus* ont été retrouvées actives uniquement sur les exsudats racinaires mais ceci pour les quatre plantes. Les Sphingomonadales sont spécifiques des monocotylédones et peuvent être considérées comme des spécialistes, alors que des bactéries appartenant aux groupes des Enterobactéries et des Rhizobiales sont retrouvées dans tous les compartiments chez les quatre plantes et peuvent être considérées comme généralistes. Ces résultats montrent aussi un impact important des exsudats racinaires sur la dynamique globale du carbone dans le sol, par une stimulation indirecte de l'assimilation de la matière organique du sol par diverses communautés bactériennes.

Ces résultats sont publiés dans l'article « Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure » Haichar F. Z., Marol C., Berge O., Rangel-Castro J. I., Prosser J. I., Balesdent J., Heulin T. & Achouak W. 2008. The ISME J. 2, 1221-30

### Glucosinolates et populations actives de la rhizosphère

Il est clair que les espèces végétales ont des communautés microbiennes rhizosphériques différentes ce qui peut résulter de l'influence de la nature des exsudats racinaire. Nous avons voulu tester cette hypothèse à une échelle moléculaire ce qui reste encore peu exploré actuellement. Le choix d'*A. thaliana* avait deux avantages : le nombre élevé de mutants isogéniques disponibles et le système « glucosinolate-myrosinase » spécifique des *Brassicaceae*. Les glucosinolates (GS) sont des molécules soufrées présentes dans toutes les parties de la plante (Halkier et al 2006). Ils sont surtout étudiés dans les parties aériennes où ils sont un moyen de défense constitutif contre les pathogènes (Brader et al. 2006). Lors de blessures, les GS hydrolysés par une glycosidase endogène (myrosinase) produisent plusieurs composés bioactifs, comme les isothiocyanates (ITC), les thiocyanates et les nitriles. Quelques travaux montrent l'effet de ces molécules sur la diversité des microorganismes du sol ou de la rhizosphère (O'Callaghan et al. 2000 ; Rumberger & Marshner 2003 ; Gimsing & Kirkegaard 2006). Le DNA-SIP nous a permis d'aborder le rôle de la production de GS et de leurs dérivés dans la structuration des communautés microbiennes actives de la rhizosphère. Parmi les mutants d'*A. thaliana* nous avons choisi le transgène « CYP79A1 » (Bak et al 1999). Dans cette plante, l'introduction du gène *cyp79a1* issu du sorgho conduit à la production importante de p-hydroxybenzyl-glucosinolate (p-OHBG, GS aliphatique) absent de la plante sauvage (Fig. 12).

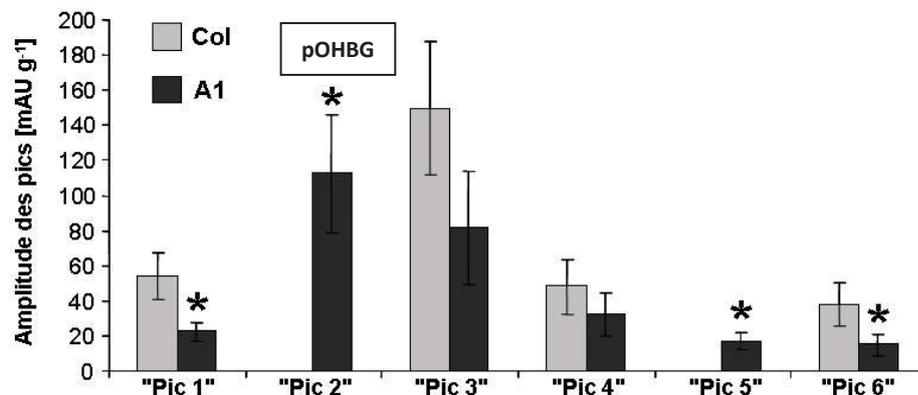


Figure 12 : Analyses HPLC des glucosinolates extraits des racines des plantules cultivées sur sol (collaboration Univ Lyon). Amplitude de chaque pic majeur détecté, par g de système racinaire des plantes sauvages de type Columbia (Col) et de plante transgénique CYP79A1 (A1) ; Les valeurs sont la moyenne des 6 réplicats avec les déviations standards. Les étoiles indiquent les différences significatives de l'amplitude des pics entre les 2 types de plante ( $p = 0.05$ ).

Dans les parties aériennes ainsi que dans les racines (ces dernières étant plus rarement étudiées surtout dans des cultures sur sol) les plantes CYP79A1 produisent bien, dans nos conditions, le glucosinolate exogène p-OHBG attendu (Bak et al 1999). D'autres modifications mineures sont observées en particulier une réduction des glucosinolates naturellement présents chez *A. thaliana*. Les phénotypes des plantules CYP79A1 sont identiques à ceux des types sauvages, ce qui est important car l'architecture racinaire peut influencer les communautés microbiennes rhizosphériques.

Il semble que les dérivés de GS soient présents aussi dans le sol rhizosphérique des *Brassicaceae* comme le montrent Rumberger & Marshner (2003) chez le colza. C'est pourquoi nous les avons recherchés dans le sol rhizosphérique d'*A. thaliana* par GC-MS après une extraction sur fibres pour les volatils (HS-SPME, Head Space Solid-Phase MicroExtraction) et une extraction directe du sol pour les autres. Jusqu'à présent nous n'avons détecté aucun ITC ni autre dérivé et il nous semble important d'améliorer ces analyses pour dépasser les limites techniques actuelles. En effet, chez *A. thaliana*, les racines des plantes sont très fines et libèrent probablement des quantités très faibles d'ITC ce qui peut rendre la caractérisation des composés plus difficile d'autant que leur turnover est assez rapide dans le sol à cause de leur dégradation par les microorganismes (Rumberger & Marshner 2003).

Ces analyses ont d'autant plus importantes que la faible concentration des GS et de leurs dérivés dans la rhizosphère ainsi que leur durée de vie courte dans cet environnement en font des molécule-signal potentielles agissant sur les communautés microbiennes. Un gradient de concentration se mettrait ainsi en place entre les racines et la rhizosphère auquel correspondrait un gradient microbien. Ainsi le système « glucosinolate-myrosinase » ne serait pas seulement un système de défense mais aussi un mode de signalisation de la plante ayant peut-être co-évolué avec les microorganismes rhizosphériques.

Les plantes Columbia et CYP79A1 avec leurs profils glucosinolates bien différenciés, ont été cultivées sur du sol en atmosphère enrichie en  $^{13}\text{CO}_2$  ce qui a permis le traçage isotopique de l'ADN dans la rhizosphère par marquage des tissus végétaux, des exsudats racinaires et donc des microorganismes vivant aux dépens de ceux-ci.

Les premières analyses ont porté sur l'analyse du gène codant l'ARNr16S des bactéries comme précédemment. Les différences étant très faibles et peu reproductibles nous avons étudié des groupes microbiens plus restreints en utilisant des amorces spécifiques en PCR nichée, qui ciblent les alpha, beta-, gamma-proteobactéries, les acidobactéries, les *Archae* et la communauté fongique. Nous avons pu identifier des populations microbiennes actives spécifiquement enrichies en  $^{13}\text{C}$ , et donc impliquées dans la dégradation des exsudats racinaires de la plante. Dans la rhizosphère, l'ensemble des taxa bactériens testés (excepté les acidobactéries), la communauté *Archaea* et la communauté fongique présentent des populations spécifiques actives utilisant les exsudats racinaires comme source de carbone. Nous avons donc confirmé que comme dans l'étude précédente, les plantes d'*A. thaliana*, par l'exsudation racinaire, ont une influence majeure sur la structure et la composition des communautés microbiennes du sol.

Ce qui nous intéressait le plus était la structure comparée des communautés microbiennes des plantes transgéniques (CYP79A1) et sauvages (Columbia). Et en effet nous avons observé des différences significatives, pour plusieurs groupes de microorganismes et dans plusieurs compartiments. Dans le compartiment racine, on observe une influence significative assez large de la différence de profil en GS sur les populations alphaprotéobactéries, acidobactéries et fongiques ce qui est logique car en contact direct avec les racines elles sont proches de la source de glucosinolates et de leurs produits d'hydrolyse. Le plus remarquable est une population proche de l'espèce fongique *Syncephalis depressa* qui est associée seulement avec les racines des plantes CYP79A1 (Figure 13).

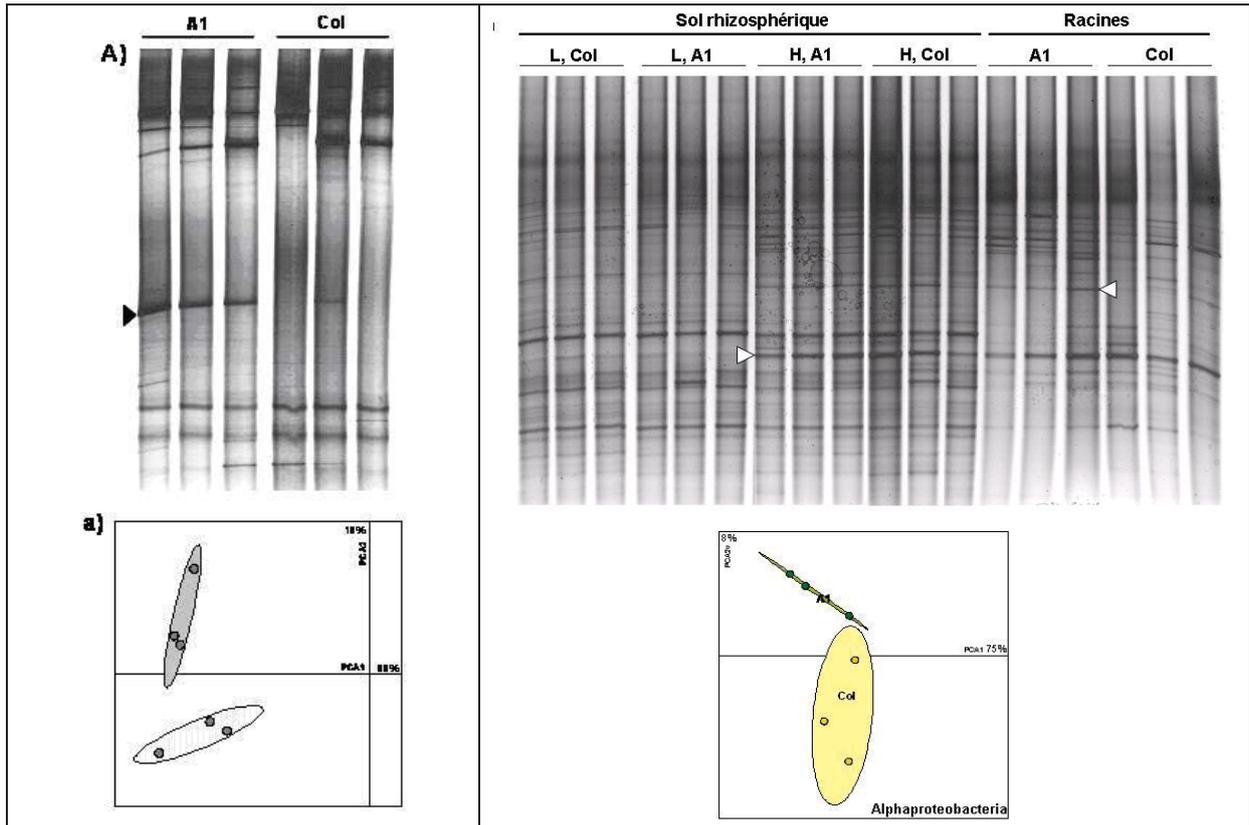


Figure 13: Profil DGGE et analyse en composantes principales (ACP) des fragments des gènes ribosomiaux de la communauté fongique amplifiés à partir des échantillons racinaires. Trois plantule-réplicats pour chaque type de plantes Columbia (Col) et CYP79A1 (A1). Les ellipses statistiques représentent un intervalle de confiance de 90 %, en gris Col, en blanc A1. La flèche indique une bande spécifique de A1 identifiée à *Syncephalis depressa*.

Figure 14: Profils DGGE des fragments des gènes ribosomiaux de la communauté des Alphaprotéobactéries pour les fractions d'ADN rhizosphérique léger (L), lourd (H) et d'ADN racinaire pour les plantes Col et A1. Trois plantule-réplicats pour chaque traitement. Seule l'ACP sur les profils rhizosphériques H est représentée. La flèche blanche vers la gauche indique une population  $^{13}\text{C}$  de *Rhizobium* présente dans la rhizosphère des 2 types de plante, mais sur les racines des plantes A1 uniquement. La flèche blanche vers la droite indique une population  $^{13}\text{C}$  de *Rhizobium* présente dans la rhizosphère et sur les racines des 2 types de plante.

Dans le compartiment rhizosphère nous avons été surpris de constater que seules les populations actives, spécifiquement enrichies en  $^{13}\text{C}$  étaient influencées par le contenu en glucosinolates des plantes. Ces populations appartiennent aux alphaprotéobactéries (Fig. 14) et aux champignons. Contrairement aux résultats obtenus avec la racine, la structure des acidobactéries n'est pas modifiée. Le gradient de concentration des glucosinolates et de leurs dérivés depuis les racines jusqu'à la rhizosphère, où ils sont plus dilués, se manifeste de façon radicale pour ce groupe bactérien.

Quel que soit le compartiment les mécanismes qui peuvent être avancés pour expliquer le mode d'action de ces composés sur les microorganismes sont principalement, la sensibilité aux propriétés anti-microbiennes, à l'inverse la capacité à les utiliser comme source de nutriments ou la réponse à une molécule-signal. Nous pouvons aussi penser à des effets indirects sur des antagonistes ou les compétiteurs des populations microbiennes influencées.

Ces résultats sont publiés dans l'article « Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and on plant roots » Bressan M., Roncato M., Bellvert F., Comte G., Haichar F. Z., Achouak W. & Berge O. *The ISME J* 3 (11), 1243-57

### Conclusion – Perspectives

Au cours de cette étude, nous avons montré que les microorganismes stimulés par les exsudats racinaires d'*A. thaliana* sont sensibles à un changement au niveau moléculaire, ici la production d'un seul glucosinolate exogène, dans la composition de ses exsudats racinaires. Ces observations montrent que, sur la racine et dans la rhizosphère où la compétition entre les espèces pour l'assimilation des substrats est forte, même de modestes avantages conduisent à la sélection de ces souches, selon leur fitness dans cet environnement. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces modifications de structure des communautés microbiennes s'accompagnent de changements au niveau des fonctions microbiennes dans le sol.

### Transistion : de la rhizosphère.....

L'écologie microbienne a vraiment subi une mutation très importante ces 20 dernières années et on peut considérer qu'elle en est encore à ses balbutiements aux vues de la grande complexité des communautés naturelles et de leur fonctionnement. Les problématiques sous-jacentes restent toutefois pleinement d'actualité. La demande alimentaire de la planète va en grandissant, d'après Liu et al (2010), il faudra d'ici 2030, augmenter la production de céréales de 100 milliard de kg. Cela va de pair avec les prévisions démographiques, 9 milliards de personnes en 2050, qui poussent la société et ses chercheurs à la prospective en matière de production agricole, de qualité alimentaire et de respect de l'environnement. D'après les travaux de l'INRA et du CIRAD en la matière, il sera possible de nourrir la planète dans le cadre d'un développement durable à l'échéance de 2050 en tenant compte des avancées scientifiques (Agrimonde, 2010). Dans son dossier «How to feed a hungry world ? » de juillet 2010, la revue « Nature » pose la question du rôle que doit jouer la science pour garantir l'alimentation du futur ([www.nature.com/food](http://www.nature.com/food)). Dans ce dossier l'amélioration de l'exploitation des parties souterraines des plantes est considérée comme la clé d'une seconde révolution verte, qui ne reposera pas sur des intrants coûteux (J. Lynch, cité par Gewin, 2010). Des pistes sont proposées parmi lesquelles, l'utilisation d'endomycorhizes permettant de maintenir les rendements dans des sols pauvres en phosphore ou l'introduction de gènes de fixation d'azote dans les plantes cultivées non-légumineuse. L'importance du sol pour sa très grande diversité microbienne à l'origine de la qualité des sols est par ailleurs soulignée par le rapport de juillet 2008 du « National Research Council » des USA, qui estime que l'état des sols est un facteur limitant très important de l'augmentation des rendements en particulier dans les zones d'Afrique sub-saharienne et d'Asie du sud (cité par Dance, 2008). L'écologie microbienne de la rhizosphère depuis le début des années 1990, a été « révolutionnée » par les outils moléculaires et la découverte de 99 % de la diversité microbienne. Elle a encore beaucoup à découvrir et sera assurément au cœur des défis de demain.

### .....à la phycosphère

Laisant la rhizosphère, je m'intéresse aux agents phytopathogènes. Les grands enjeux sont les mêmes que pour la rhizosphère, l'objectif étant de lutter contre les maladies des plantes cultivées avec des méthodes innovantes et durables. L'originalité du modèle, une bactérie phytopathogène très répandue dans l'écosystème, la nouveauté de l'approche inspirée des pathogènes environnementaux en santé humaine, l'avancée des travaux du laboratoire de l'INRA sur le sujet me convainquent de l'intérêt de participer à cette aventure. Que se passe-t-il pour le pouvoir pathogène des bactéries retrouvées dans les biofilms épilithes constitués de microalgues ? Quel rôle va jouer l'interaction microalgues/bactéries sur la structure des populations bactériennes ? Quelles implications pour la lutte ? Je découvre la phycosphère et ses propres questionnements avec un nouveau modèle procaryote-eucaryotes aux métabolismes respectifs hétérotrophes et autotrophes qui me ramènent sur un terrain familier.

## **4. Projet de recherche**

#### 4 A. Contexte scientifique

L'étude des pathogènes dans le contexte agronomique a permis de faire des avancées significatives dans la compréhension des maladies infectieuses des plantes et de leurs déterminants. Cependant seulement une partie du cycle de vie des organismes phytopathogènes est abordée dans ces études et il reste beaucoup d'inconnues comme pour *P. syringae* par exemple : l'étude des souches pathogènes isolées de plantes malades ne suffit pas à expliquer la variabilité des déterminants de spécificité d'hôte et il reste encore des facteurs à élucider (Guttman et al., 2006).

Dans le cas des pathogènes environnementaux humains, on s'intéresse déjà pour certains d'entre eux à leur écologie, y compris en milieu naturel, pour découvrir les pressions de sélection des traits utiles à la pathologie humaine et comprendre leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes (Cangelosi et al., 2004). Les études sur *Vibrio cholerae* par exemple montrent que les protéines en jeu dans l'interaction avec la chitine support et source de nutriments principal de *V. cholerae* dans les océans sont les mêmes que celles qui permettent à la bactérie d'adhérer aux parois intestinales chez l'homme (Pruzzo et al., 2008). D'autre part, les épidémies causées par cette bactérie sont reliées directement aux changements climatiques, vents et courant à l'échelle de la planète (Mourino-Pérez 1998).

Dans le domaine de la pathologie végétale, cette nouvelle dimension est à peine naissante et ce projet s'inscrit clairement dans son développement. Nous proposons d'aborder la question suivante : la « vie sauvage » des populations de *P. syringae* influence-t-elle l'évolution de leur pouvoir pathogène et si oui, quels en sont les déterminants ? Aborder cette question nécessite des approches quantitatives pour obtenir des données sur son abondance dans les habitats non-agricoles, et des approches qualitatives permettant d'identifier les mécanismes en jeu

##### 1 - *P. syringae* bactérie épiphyte, pathogène des plantes

*P. syringae* est une gamma-protéobactérie d'une grande importance agronomique car elle est capable d'attaquer une gamme très étendue de plantes cultivées à travers le monde sous les climats tempérés avec des saisons fraîches et humides. C'est une bactérie psychrophile transmise par la pluie et le vent qui peut survivre pendant longtemps à la surface des feuilles sans provoquer de maladies et certains écologistes la considère même comme une espèce ayant évolué en s'adaptant à la vie épiphyte, ne causant que sporadiquement des lésions à certaines plantes (Hirano & Upper 2000). Dans cette phase épyphyte les bactéries se développent en biofilm, et représentent entre 15 et 40 % de la population totale (Morris et al 1998). Cette phase alterne avec une phase plus dynamique de dissémination, quand la taille de la population est suffisante ; la bactérie pénètre alors dans la plante par des ouvertures naturelles comme les stomates et prolifère dans les espaces intercellulaires (Hirano & Hupper 2000). L'importance de cette alternance pour la réussite de la colonisation, la prolifération et l'expression du pouvoir pathogène a été montrée pour d'autres bactéries phytopathogènes (von Bodman *et al.*, 1998; Dow et al., 2003). Les maladies sont caractérisées par des lésions nécrotiques à développement lent, sur les feuilles, les tiges et les fruits.

Cette espèce divisée en une cinquantaine de pathovars sur la base de la spécificité d'hôte est phylogénétiquement bien caractérisée et séparée classiquement en quatre groupes monophylétiques (Sarkar et Guttman 2004 ; Sawada et al., 1999, 2002). Des études récentes montrent qu'elle pourrait comporter un plus grand nombre de groupes (Morris et al. 2010). *P. syringae* possède collectivement une large gamme d'hôte mais les souches individuellement ne sont virulentes que sur un panel très restreint de plantes (Sarkar et al., 2006). Les génomes sont considérés comme assez plastiques, ayant subi des réarrangements génomiques à grande échelle et des transferts horizontaux considérés tous deux comme moteur dans la diversification de *P. syringae*

en particulier pour la différenciation des facteurs déterminant les gammes d'hôtes (Sawada *et al.*, 2002 ; Ma *et al.*, 2006).

La recherche de facteurs de virulence et leur mécanisme font l'objet de nombreux travaux. On sait maintenant que cet agent pathogène comme d'autres, injectent directement des « protéines effectrices », véritable armement moléculaire, à l'intérieur du cytoplasme des cellules eucaryotes qui visent à neutraliser les défenses de la plante. Beaucoup de bactéries à Gram négatif dont *P. syringae* possèdent pour cela le système de sécrétion de type III qui est comparable à une seringue moléculaire. Les clusters de gènes codant pour ce système type III sont situés à l'intérieur d'un îlot de pathogénicité ont été acquis par divers transferts horizontaux entre pathogènes de plantes, d'animaux et de symbiotes appartenant aux espèces telles que *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, and *Rhizobium* (Journet *et al.*, 2005).

Le système de sécrétion de type III est manifestement au cœur de la virulence de *P. syringae* et a été très étudié chez les souches modèles, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 pathogène de la tomate et d'*Arabidopsis thaliana* et *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A pathogène du haricot. Actuellement, plus de 300 gènes bactériens associés à la virulence ont été identifiés dans cette espèce dont plus de 50 codent des protéines effectrices transmises à la plante par le système de sécrétion de type III (Sarkar *et al.*, 2006). Le sécrétome de type III de *P. syringae* est probablement celui qui contient le plus d'effecteurs parmi tous les autres pathogènes étudiés jusqu'à présent (Guttman *et al.*, 2002). Beaucoup de ces effecteurs subissent des pressions de sélection très fortes et les changements liés à l'évolution peuvent impacter profondément les interactions hôte-pathogène.

Ce système très sophistiqué, n'est toutefois pas le seul composant requis pour une infection efficace. D'autres facteurs sont impliqués dans la virulence de *P. syringae* au sens large. Ces facteurs sont associés d'abord à la fitness épiphyte comme l'acquisition du fer via les sidérophores comme la pyoverdine ou de nutriments, l'osmoprotection, la tolérance aux UV et au stress oxydant ou la formation de biofilm (Morris & Monier, 2003) incluant la mobilité, l'adhésion, la production de polysaccharides (lévane, alginate, cellulose) et de molécules de quorum-sensing. D'autres facteurs de virulence sont associés à la production de phytotoxines comme la coronatine ou la syringomycine (des gènes de toxines insecticides homologues à ceux de *Photobacterium luminescens* ont été découverts récemment sans connaître leur fonction), de phytohormones, de molécules antimicrobiennes et à la dégradation des parois des cellules végétales, (Sarkar *et al.*, 2006 ; Lindeberg *et al.*, 2008).

La production de toxines est considérée comme un facteur de virulence important. Chez *P. syringae* elles sont synthétisées par voie non-ribosomique et peuvent être impliquées dans plusieurs fonctions telles que l'attachement des cellules bactériennes, l'activité détergente, l'inhibition de voies métaboliques végétales ciblées, la modulation de voies de défenses en particulier dans le stomate (Lindeberg *et al.*, 2008).

*P. syringae* est aussi dotée pour certaines souches d'une activité glaçogène. Ces bactéries produisent sur leur membrane externe une protéine de 120 à 180 kDa permettant la fixation de molécules d'eau et leur orientation pour former des cristaux de glace et est utilisée dans la production commerciale de neige (Rixen *et al.*, 2003). Toutefois cette propriété n'est pas un facteur de virulence même si elle entraîne de graves dégâts sur les plantes (dégâts dus au gel).

Les mécanismes liés au pouvoir pathogène et à son évolution restent encore largement inconnus et en particulier ceux qui déterminent la spécificité d'hôte. L'étude par génomique comparative de Sarkar *et al.* (2006) a permis de mettre en relation statistique les répertoire d'effecteurs type III et de facteurs de virulence avec les hôtes des souches isolées de différentes plantes malades. Ils ont identifié des gènes ou des profils de gènes significativement associés au chou fleur, au chou chinois, au soja, au riz et à la tomate, mais il semble qu'il existe de nombreuses voies par lesquelles les isolats de *P. syringae* peuvent s'adapter à un même hôte.

Trois souches appartenant aux trois phyla de *P. syringae* ont été séquencées (<http://www.pseudomonas-syringae.org/>). Il s'agit de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A et *P. syringae* pv. *syringae* B728a pathogène du haricot, la plus adaptée des trois à la vie épiphyte. Pour cette dernière, la présence de larges îlots génomiques contribuant à la

virulence ainsi qu'au spectre d'hôte a été démontrée (Feil et al., 2005). La génomique comparée montre que pour les trois souches, les gènes de virulence codant pour le système de sécrétion de type III (régulon HrpL) sont insérés dans des régions variables du génome, alors que les gènes de toxines ont des distributions variées entre le core génome et les régions variables, et que d'autres gènes de virulence ont une répartition sur les génomes qui diffère d'une souche à l'autre (Lindeberg et al., 2008). En comparant DC3000 avec d'autres espèces bactériennes, il apparaît que les régions flexibles de son génome ayant un « turn over » élevé de gènes, contiennent de nombreux gènes peu répandus dans les autres génomes, dont la fonction n'est pas ou peu décrite. Ces gènes pourraient jouer différents rôles dans l'adaptation aux hôtes et aux niches environnementales suivant une stratégie à découvrir (Lindeberg et al., 2008). Ces données de génomique enrichies des nouvelles séquences de *P. syringae* en cours de réalisation (voir collaborations) seront une mine de renseignements et une source de piste de recherche dans ce projet.

*P. syringae* est donc à la fois un agent pathogène assez commun possédant un système de sécrétion de type III au cœur de sa virulence et en même temps une espèce bactérienne qui reste assez singulière, par l'étendue de ses facteurs de virulence et de sa gamme d'hôte dont l'origine évolutive est encore incomprise. La question qui reste en suspens est donc celle de l'élucidation des mécanismes d'adaptation, des interactions qui en sont à l'origine et de leur histoire évolutive.

## 2 - Données récentes : *P. syringae* bactérie de l'environnement

*P. syringae* très étudiée pour son pouvoir pathogène en milieu agronomique est considérée généralement comme entièrement inféodée aux parties aériennes des plantes. Les diverses sources d'inoculum envisagées comme étant une source potentielle d'épidémie sont essentiellement les tissus et débris végétaux, les équipements et structures agricoles, les eaux d'irrigation et les insectes, vecteurs possibles de ces pathologies. Les populations bactériennes de *P. syringae* décroissent rapidement dans le sol suite à l'enfouissement des déchets végétaux (Riffaud 2002). Elle ne semble pas être transmise par les semences commerciales et a toutefois été décrite comme pouvant coloniser les graines et les racines (Tornerio & Dangl, 2001). Elle est capable aussi de provoquer des infections racinaires d'*A. thaliana* (Bashan & de-Bashan 2002; Jakob et al., 2002 ; Bais et al., 2004) ce qui montre une facette plus tellurique de cette espèce. En fait, *P. syringae* est aussi une bactérie de l'environnement qui peut exercer des fonctions variées, éloignées ou pas de la pathologie et cet aspect de son écologie n'a jusqu'à présent pas été pris en compte dans la recherche de stratégies de défense et de contrôle des maladies qu'elle provoque. Les notions de biodiversité et d'évolution de ces organismes phytopathogènes sont basées essentiellement sur des modèles de plantes-hôtes cultivées qui sont insuffisants pour expliquer l'origine des déterminants de sa pathologie. Il est donc nécessaire de les faire évoluer.

Depuis quelques années on observe l'émergence d'une nouvelle dimension de la recherche sur les vecteurs de maladies en général, dédiée à la compréhension de l'écologie des pathogènes et des maladies qu'ils causent. Bien que l'importance des pathogènes soit connue depuis l'Antiquité, c'est seulement récemment, que l'Écologie a été considérée comme une science importante dans la prévision, la prévention, et la gestion des maladies humaines (Reguera & Kolter 2005 ; Guégan 2008). Un rapport récent sur ce sujet met en évidence l'importance de ces niches environnementales pour l'épidémiologie et l'émergence de nouveaux variants de ces agents pathogènes (Cangelosi et al., 2004). Ce rapport illustre que des pressions de sélection au sein des niches environnementales, peuvent favoriser l'émergence de propriétés chez certaines bactéries qui vont ensuite pouvoir jouer un rôle dans leur pouvoir pathogène chez l'homme ou dans leur résistance aux antibiotiques couramment utilisés en médecine. Il s'agit non seulement de comprendre le lien fondamental qui existe entre les écosystèmes, la dynamique des maladies et la santé, mais aussi à l'inverse, d'utiliser le réel potentiel des sciences de la santé pour contribuer à l'écologie et à la gestion de l'environnement car les pathogènes ont un impact important sur le fonctionnement des écosystèmes y compris dans leurs fonctions utilitaires aux hommes. Dans cette nouvelle dimension, les parasites

(microorganismes, virus et prions) ne sont plus considérés comme de simples tueurs qui doivent être éliminés, mais ils constituent une composante importante de la diversité et de l'organisation du vivant car ils sont assurément la plus grosse partie de la diversité vivante sur la planète et donc contribuent à son organisation et son évolution. (Ostfeld 2008).

Dans le domaine de la santé humaine, les écologistes proposent de changer la manière de raisonner et de travailler en changeant d'échelle pour adopter une perspective écologique globale de la santé (Guégan et al., 2007). Ils proposent en priorité de développer l'approche pluridisciplinaire, de définir des zones pilotes, et développer des sites d'étude à long terme, de standardiser les protocoles, de coordonner les programmes au niveau national et international, et de promouvoir une épidémiologie populationnelle et des communautés. Enfin ils soulignent qu'une même approche devrait être conduite en santé des plantes et en agronomie (Guégan et al., 2007).

Dans le domaine de la pathologie végétale, il s'agit de prendre en compte le rôle de l'environnement dans le pouvoir évolutif des agents pathogènes, ainsi que d'étudier le rôle que peuvent avoir ces microorganismes sur l'environnement. Les systèmes agronomiques ont la particularité d'être des systèmes ouverts et il existe beaucoup d'exemples d'organismes phytopathogènes non obligatoires qui ont la capacité de survivre à la dissémination longue distance, de s'adapter et de proliférer dans des habitats extérieurs aux agrosystèmes. Par exemple, le champignon *Botrytis cinerea* a été isolé sur des rochers (Burford et al., 2003 ; Gorbushina 2007) dans le pelage de petits mammifères ainsi que dans les cheveux d'écoliers (Ali-Shtayeh et al., 2001 ; Shchipanov et al., 2003). De la même manière, la bactérie *Erwinia chrysanthemi* a été retrouvée dans la source de deux rivières majeures du continent Australien (Cothier & Gilbert, 1990).

Ce n'est que récemment que la recherche d'habitats primaires de *P. syringae* a permis de montrer pour la première fois sa présence dans des réservoirs très variés comme des biofilms épilithes (Morris et al., 2007), ainsi que dans des réservoirs alpins tels que : neige, pluies, torrents, lacs ainsi que sur diverses espèces de plantes sauvages (Morris et al., 2008a). Ces réservoirs hébergent des souches de *P. syringae* virulentes pour diverses cultures (melon, laitue, betterave) mais également des souches sans pouvoir pathogène apparent. L'eau et les plantes sauvages hébergent aussi des souches non phytopathogènes avec une fréquence particulièrement élevée. Le pouvoir glaçogène ou la production de syringomycine, active contre les cellules végétales, bactériennes et fongiques (Bender et al., 1999), de ces souches semble dépendre du type de réservoir et sont plutôt moins fréquents dans les populations des biofilms épilithes (Morris et al., 2008a).

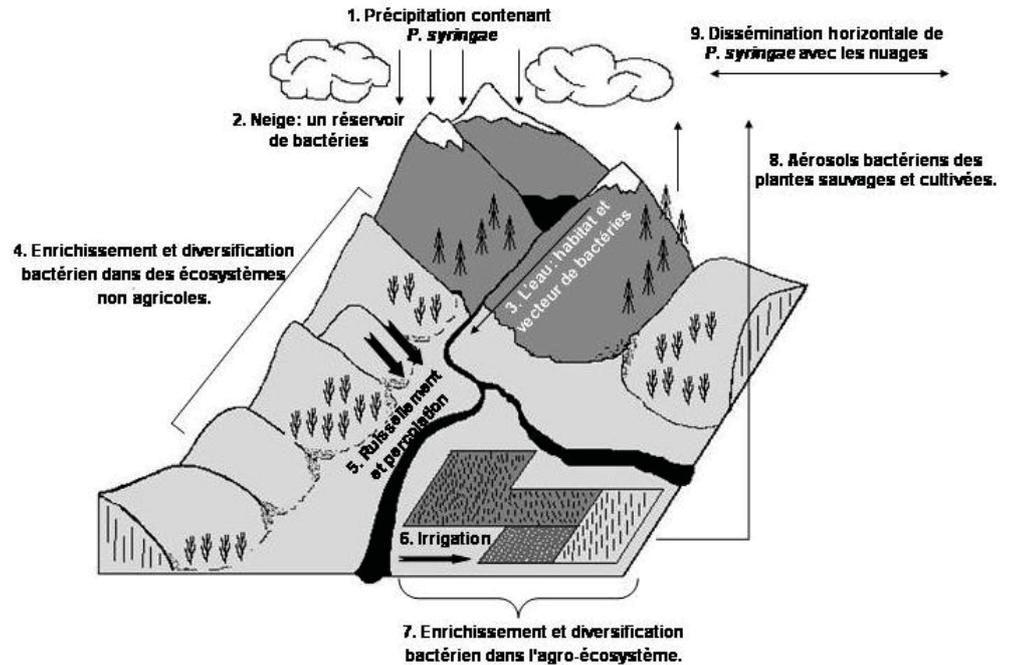
Depuis une trentaine d'années, on sait que cette espèce est présente dans les nuages (Jayaweera & Flanagan, 1982; Sands et al., 1982) et qu'au-dessus des couverts végétaux, le flux vertical ascendant des organismes pathogènes est de l'ordre de 50 à 500 cellules/m<sup>2</sup>/seconde (Lindemann et al., 1982). Plus récemment des cellules viables de *P. syringae* ont été détectées à plusieurs kilomètres d'altitude (Amato et al., 2007) et leur lessivage de l'atmosphère par la pluie a été montré (Constantinidou et al., 1990). La présence et l'ubiquité sur le globe terrestre de noyaux de nucléation d'origine biologique dans la neige provenant de tous les continents, indique que ces particules sont dispersées dans l'atmosphère et pourraient intervenir dans l'initiation de la formation de glace dans les nuages à des températures relativement élevées (Christner et al., 2008).

*P. syringae* dotée d'une activité glaçogène pourrait donc jouer un rôle dans les processus liés à la formation des précipitations (Morris et al., 2004, Morris et al. 2008b), contribuant ainsi à sa dissémination vers les écosystèmes terrestres et les espaces cultivés. Cette bactérie est aussi présente dans les lacs collinaires utilisés pour l'irrigation des cultures (Riffaud & Morris, 2002). Il semble qu'elle arrive dans ces lacs à travers le ruissellement de pluie et de l'eau d'irrigation dans les zones de culture qu'elle infeste.

L'ensemble des connaissances actuelles sur *P. syringae* suggère que cette bactérie a la capacité de survivre à la dissémination à grande distance et de s'adapter à divers habitats. La nature de ces habitats suggère un parcours en milieu aquatique qui suit le cycle des eaux douces. Ce cycle de vie inféodé à celui de l'eau est représenté sur le schéma conceptuel suivant :

**Schéma conceptuel des habitats et des flux possibles de *P. syringae* dans l'environnement.**

Chute de neige ou de pluie contenant *P. syringae* (1). La neige habitat potentiel de prolifération ou de stress (2). La neige et la pluie contribuent aux eaux de montagnes, vecteurs et habitats de *P. syringae* (3). La bactérie est entraînée vers les plantes sauvages où elle va proliférer. Survie et multiplication de variants de *P. syringae* (4). Le ruissellement et la percolation des eaux souterraines sélectionnent des variants de *P. syringae* qui alimentent les rivières (5). L'irrigation porte la bactérie vers les plantes cultivées et vers les équipements agricoles (6). Apport direct aux cultures de *P. syringae* par la pluie, la dissémination aérienne et des sources du système agricole. Certains variants de *P. syringae* sont mieux adaptés à l'agro-écosystème (7). La bactérie en phase épiphyte sur les plantes devient un composant des aérosols et elle est transportée vers les nuages (8). Les nuages pourraient porter *P. syringae* vers d'autres bassins versants (9). D'après Morris et al (2008a).



**3 - Les interactions biotiques dans les biofilms épilithes naturels**

Les biofilms épilithes nous offrent donc un premier contexte pertinent permettant d'approfondir la biologie et l'écologie d'un agent phytopathogène à l'extérieur des agro-écosystèmes. Si la vie planctonique des cellules bactériennes est la plus étudiée en microbiologie, il semble que le développement de populations au sein de biofilm soit le mode de vie dominant de nombreux microorganismes et plus particulièrement en milieu aquatique. La formation de biofilm concerne tous les milieux aquatiques naturels et l'interface solide-liquide des galets du fond des cours d'eau est particulièrement propice à son installation. On parle alors de biofilm épilithe et il représente un habitat très étendu au sein duquel il est intéressant de connaître la biologie et l'écologie des populations de *P. syringae* et de leur pouvoir pathogène. En effet le biofilm abrite des communautés complexes et dynamiques dont la régulation dépend des interactions inter-espèces et au sein duquel une diversification phénotypique permet aux microorganismes de s'adapter (Little et al., 2008).

Les biofilms de milieux naturels abritent souvent des communautés très complexes constituées d'un mélange d'espèces microbiennes, procaryotes et eucaryotes, baignés dans une matrice constituée de polysaccharides, protéines, acides nucléiques, lipides et autres diverses molécules, qui forment un ensemble très hétérogène. Les biofilms épilithes sont composés d'algues (unicellulaires ou pluricellulaires), de bactéries, de champignons, de nématodes, de protozoaires, de petits invertébrés et de débris organiques ou inorganiques, le tout englobé dans une matrice de polysaccharides. (Boulêtreau 2007). L'ARNr 16S plastidial, représente autour de 25 % des OTU dans les biofilms de rivière (Lyauthey et al., 2005). Les communautés algales représentent une composition relativement constante (quelques dizaines d'espèces) et sont dominées par deux ou trois groupes dont le principal est constitué de diatomées (Lyauthey et al., 2005).

Ces algues sont donc une des composantes importantes des biofilms épilithes. Elles sont apparentées aux plantes (Bhattacharya and Medlin 1998 ; Yoon et al., 2004) et cohabitent avec les populations de *P. syringae* présentes dans les biofilms. Les interactions algues-bactéries sont assez peu explorées. En milieu aquatique, il semble que certaines algues inhibent la croissance de bactéries quand d'autres la favorisent et à l'inverse certaines bactéries ont des effets positifs ou négatifs sur les algues. Ces effets peuvent dépendre des concentrations bactériennes (Mindl et al., 2005). Les mécanismes peuvent être directs comme la production de toxines ou d'antibiotiques, ou des interactions trophique (Giroldo et al., 2007) et/ou indirects comme l'effet de protection en biofilm bactérien, ou l'effet sur d'autres populations. La surface de certaines algues est colonisée par des bactéries épiphytes qui la protègent vis à vis d'autres microorganismes en produisant des antibiotiques à large spectre (Rao et al., 2007) Une symbiose algue bactérie semble assez répandue et permettrait aux algues d'acquérir la vitamine B12 via la bactérie qui en contrepartie utiliserait le carbone algal (Croft et al., 2005). Ces études montrent qu'il existe des interactions complexes qui conduisent à une régulation des populations.

Dans le cas de *P. syringae*, rien n'était connu sur cette interaction avant une étude préliminaire effectuée par le laboratoire de C. Morris en collaboration avec N. Fromin, (CNRS Montpellier) montrant clairement l'effet de trois souches de *P. syringae* dont la souche B728a et deux autres souches qui diffèrent par la production de syringomycine, sur la croissance de la diatomée *Nitzschia palea* (Laussel 2007). Quelle que soit la souche bactérienne testée, la croissance de l'algue est retardée quand elle est co-cultivée avec *P. syringae*. Cette interaction est donc à explorer plus avant et constitue une première étape dans la connaissance des relations entre organismes vivants dans les biofilms épilithes.

Les biofilms sont des habitats qui possèdent une dynamique propre dont va dépendre le « turnover » des populations le colonisant. Il est important de connaître cette dynamique dans la perspective d'étudier le devenir des populations de *P. syringae* dans cet habitat et leur dispersion vers les agrosystèmes.

La formation du biofilm se fait par une suite d'évènements séquentiels depuis l'adhésion au support des premiers organismes, considérée comme aléatoire (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001) jusqu'à la libération, de cellules vivantes ou mortes en passant par le développement de biomasse dans une organisation hétérogène encore peu élucidée. La composition, la biomasse et le fonctionnement d'un biofilm sont contrôlés à la fois par des facteurs autogènes dépendant des propriétés des organismes du biofilm (compétition, broutage, allélopathie, gradients de pH, d'oxygène...) que par des facteurs allogènes qui lui sont extérieurs (nutriments, lumière, température, humidité ...). Dans les rivières, le biofilm procure aux communautés une certaine stabilité et résistance face aux stress hydrodynamiques, notamment d'arrachage par le courant (Sutherland et al., 2001), ou de dénaturation par broutage (Biggs & Close, 1989). Pour le détachement de biomasse du biofilm l'abrasion est souvent mise en cause mais il semblerait que ce soient plutôt des phénomènes physiologiques liés à l'activité des hétérotrophes qui en soient à l'origine et on parle d' « altération physiologique » (Boulêtreau et al., 2007).

Des molécules organiques de haute masse moléculaire peu solubles comme les acides humiques, ou la chitine des exosquelettes de crustacés peuvent être impliquées dans la structuration des biofilms tout en servant de source de nutriments aux bactéries qui y adhèrent. Les biofilms peuvent héberger des cellules viables mais non-cultivables qui sont des formes plus adaptées à la vie en système aquatique (Pruzzo et al., 2008).

Les biofilms peuvent contenir de populations bactériennes importantes. Ils constituent donc des réservoirs potentiels de pathogènes tels que *P. syringae* et peuvent constituer un environnement favorable à l'émergence de souches nouvelles à l'origine d'épidémies.

## 4 B. Programme scientifique

Le choix du modèle d'étude algue-*P. syringae* paraît naturel pour sa proximité avec l'interaction plante-*P. syringae*. Des populations de *P. syringae* ont été isolées de biofilms dans plusieurs rivières de différents continents et la question est de savoir s'il existe une interaction entre les populations de *P. syringae* et les microalgues aquatiques qui colonisent ces biofilms. Si c'est le cas, en quoi cela représente-t-il une pression de sélection qui peut influencer le pouvoir pathogène de ces populations ?

Le travail est construit autour de deux types d'approches : une approche populationnelle basée sur des échantillons prélevés sur le terrain, et une approche plus mécaniste basée sur des cocultures en laboratoire. Le but est de caractériser l'interaction algues-*P. syringae*, de rechercher les mécanismes et leur impact sur les populations de *P. syringae*, en valorisant la collection de souches environnementales originale du laboratoire. La dynamique des populations de *P. syringae* en interaction avec les algues peut être étudiée *in situ* dans des biofilms épilithes au laboratoire. Le travail est structuré autour de trois axes :

### 1 - Caractérisation des interactions *P. syringae* - algues. Étude des mécanismes impliqués

Les connaissances sur ce type d'interactions sont très peu développées (Laussel *et al.*, 2007) et je propose de les aborder à la lumière des connaissances sur l'interaction phytopathogène. Les premières pistes qui semblent *a priori* pertinentes et prometteuses sont celles du rôle des gènes présents sur l'îlot de pathogénicité chez *P. syringae* et de celui de la production de toxines ou de molécules biocides par l'un et/ou l'autre des partenaires. Le choix du modèle biologique de l'algue sera une étape préliminaire incontournable.

#### a. Les algues

Les biofilms épilithes abritent une grande diversité d'algues, parmi lesquelles, les *Diatomophyceae* et les *Chlorophyceae* sont les plus fréquentes (Lyauthey *et al.*, 2005). Des souches d'algues « modèles » couramment rencontrées dans les eaux douces et facilement cultivables sont rassemblées en collection. Pour cela une collaboration a été mise en place avec l'INRA de Thonon les Bains (Frédéric Rimet) spécialiste de l'étude des biofilms de rivière. Des souches de *Chlamydomonas* sp. sont obtenues au laboratoire CEA de Cadarache (IBEB, Gilles Pelletier, Claire Sahut). Des tests préliminaires simples de croissance avec et sans bactéries ainsi que des observations microscopiques permettront de faire le choix de deux ou trois souches modèle d'algues pour commencer l'exploration de l'interaction.

#### b – Rôle des gènes de l'îlot de pathogénicité

Le système de sécrétion de type III des *Pseudomonas* a un rôle central d'interaction avec l'hôte y compris avec des champignons (Burlinson *et al.*, 2008; Warmink & van Elsas, 2008) et des amibes (Matz *et al.*, 2008). Le rôle de ce système et plus largement de l'îlot de pathogénicité impliqué dans le pouvoir pathogène, dans l'interaction avec les algues sera exploré. Une collection de souches de *P. syringae* non-pathogènes qui ne provoquent pas une réaction hypersensible (HR) ou qui provoquent une HR intermédiaire sur tabac et possèdent un îlot de pathogénicité incomplet sera particulièrement intéressante à tester en interaction avec les algues. Ces souches pourront être comparées avec celles qui possèdent l'îlot complet et déterminer le rôle des systèmes incomplets y compris de certains effecteurs (Mohr *et al.*, 2008). La caractérisation des modifications génétiques de ces souches a été réalisée au laboratoire d'Avignon par M. Demba Diallo (post-doc). Dans un premier temps, les facteurs étudiés sur les algues seront des changements de vitesse de croissance ou des modifications morphologiques (microscopie). Des différences au niveau des parois, ainsi que des modifications du métabolisme comme celui de la photosynthèse ou des lipides pourront être étudiées dans certains cas.

### *c – Effet des toxines*

*P. syringae* est une bactérie connue pour sa production de phytotoxines de différentes natures (syringomycine, syringopeptine, tabtoxin, coronobactine, phaseolotoxin, mangotoxin, ...). La production de ces toxines par différentes souches de *P. syringae* est très variable. Nous proposons d'étudier les profils de production chez les souches environnementales déjà connues pour leur production de syringomycine (Morris et al., 2008a). Les toxines produites en présence et en absence d'algues ainsi qu'au sein des biofilms seront analysées. Leur nature, quantité, et les facteurs de modulation seront recherchés. Pour cela nous pourrions faire appel au laboratoire de Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale de l'INRA d'Avignon pour sa compétence en chimie et biochimie.

Les mécanismes d'action de ces toxines sur les algues seront explorés en particulier au niveau de l'intégrité des membranes (effet surfactant). Des souches bactériennes avec des profils de toxines variés ainsi que des mutants ayant perdu la capacité à produire une ou plusieurs toxines seront utilisés. Les conséquences sur la structure des biofilms et en particulier la libération de bactéries, seront évaluées.

L'effet des toxines produites par les algues aquatiques sur les populations de *P. syringae* ainsi caractérisées pourra aussi être étudié et les mécanismes de résistance des bactéries identifiés.

D'autres pistes comme celles du rôle de la pectate lyase de *P. syringae* (Liao et al., 2006), du photorécepteur de lumière bleue à la fois présent chez *P. syringae* (Cao et al., 2007; Swartz et al., 2007) et chez certaines algues (Losi & Gärtner, 2008) et de l'échange de nutriments comme la vitamine B12 (Croft et al., 2005) seront également explorées en relation avec l'axe deux.

## **2 - Évaluation de l'impact de ces interactions sur la fitness de populations de *P. syringae***

Afin de construire des hypothèses plus larges sur le fonctionnement de l'interaction algue - *P. syringae*, nous proposons de cribler la collection du laboratoire d'Avignon qui dispose plus de 5000 souches de *P. syringae* d'origines très diverses (hors et dans contexte agricole) dont les caractéristiques phénotypiques principales et certains traits génotypiques sont connus (Morris et al., 2008a, 2010). Cette ressource est très précieuse car elle va permettre de mettre en relation des types d'interaction (positives, négatives, neutres...) avec des propriétés de souches environnementales. Nous avons choisi d'utiliser des mesures de croissance bactériennes comme estimation de leur fitness dans un environnement donné car c'est un crible simple à mettre en œuvre.

### *a - Crible sur algues, d'une sous collection de *P. syringae* in vitro*

Une sous-collection de la collection de *P. syringae* d'Avignon, contenant une centaine de souches caractérisées sera constituée en choisissant des phénotypes variés. Les phénotypes candidats sont pour l'instant l'étendue de la gamme d'hôtes plus ou moins restreinte, la production de toxine (syringomycine), de lévane et de protéine glaçogène. La collection de souches de *P. syringae* non pathogènes criblée sur algue dans la première partie constitue un ensemble de génotypes d'îlots incomplets caractérisés qui sera intégrée à cette sous-collection. D'autres caractères pourront être explorés dans un deuxième temps parmi les nombreuses propriétés soupçonnées d'intervenir dans la fitness épiphyte et le pouvoir pathogène de *P. syringae* (Lindeberg et al., 2008) ainsi que celles décrites dans les interactions algues-bactéries.

Des dénombrements de populations bactériennes et algales seront effectués au cours du temps dans des batteries de systèmes de co-culture bactérie-algue en chambres de culture afin de caractériser l'interaction. Les algues seront celles sélectionnées dans l'axe 1. Ces mesures de fitness de *P. syringae* pourront être comparées à celles obtenues en milieu épiphyte, sur un modèle de laboratoire qui permet le crible d'un grand nombre de souches bactériennes. Il s'agit d'infecter des cotylédons de melon en serre et de déterminer après un temps donné la taille de la population bactérienne. Des souches d'autres espèces bactériennes, phytopathogènes (*Xanthomonas*, *Erwinia*

carotovora...) ou pas (*Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, ...) seront intégrées dans les tests afin de comparer leur fitness avec celles de *P. syringae* et leur impact sur les algues afin d'évaluer la spécificité du comportement de *P. syringae*.

Les résultats attendus sont l'identification de traits favorisant spécifiquement *P. syringae* sur algues et/ou sur plante. Ceux qui favorisent la fitness de *P. syringae* en présence d'algue pourraient donc être sélectionnés dans des populations d'eaux douces au sein de biofilms et les mécanismes sous-jacents seront explorés dans l'axe 1. Nous aurons par ailleurs caractérisé des souches de *P. syringae* qui agissent (positivement ou négativement) sur la croissance des algues ce qui ouvrira des voies de recherche du côté du partenaire eucaryote.

#### *b – Validation in situ sur des populations des biofilms épilithes d'un bassin versant modèle*

Le crible de la collection de souches permettra de connaître les traits avantageux pour la vie de *P. syringae* en association avec les algues en co-culture *in vitro*. Nous proposons de rechercher dans les populations de *P. syringae in situ*, les caractères de fitness identifiés dans la première partie du travail. Des biofilms épilithes représentatifs seront échantillonnés systématiquement dans un bassin versant modèle, par exemple celui de la Durance, étudié par ailleurs au Laboratoire sur des aspects de modélisation. Les populations de *P. syringae* qui vivent naturellement en interaction avec des algues aquatiques dans les biofilms de rivière seront caractérisées et leurs traits comparées aux résultats obtenus *in vitro*.

### **3 - Étude de la dynamique des populations de *P. syringae* dans les biofilms contenant des algues**

L'aspect dynamique des flux de populations de *P. syringae* associés aux algues dans les biofilms épilithes est une composante importante de notre hypothèse. De cette dynamique (piégeage, sélection, dissémination) va dépendre la diversité des souches de *P. syringae* dans les eaux courantes avec une certaine probabilité de dissémination vers les agrosystèmes.

#### *a) Composantes biotiques des biofilms*

Dans cette partie, nous proposons de mieux cerner les composantes biotiques des biofilms naturels contenant *P. syringae*. Des approches de diversité moléculaire du gène codant pour les ARNr 16S et 18S amplifiés à partir du métagénome (banques de clones, DGGE, séquençage,) permettront d'identifier les populations dominantes de bactéries, d'algues (chloroplastes) et de microeukaryotes (Baillly et al., 2007 ; Strap, 2007 ; Scalan & Marchesi 2008). Les grands groupes présents pourront être identifiés puis visualisés avec des sondes fluorescentes en microscopie confocale pour déterminer la structure et l'hétérogénéité des biofilms. Des isollements suivis de mise en culture pourront être nécessaires pour compléter la caractérisation et l'identification des populations les plus importantes et les plus fréquemment rencontrés dans ces biofilms. Les biofilms alpins et de plaine du bassin versant choisi pourront être comparés au cours des saisons.

#### *b) Rôle des facteurs de virulence sur la dynamique de *P. syringae* dans les biofilms naturels*

Des expérimentations avec des souches de *P. syringae* sélectionnées dans les axes 1 et 2 seront réalisées avec des biofilms en dispositif au laboratoire ou en rivière. Les biofilms seront caractérisés (masse, composantes biotiques, structure) au cours du temps. Le suivi des populations de *P. syringae* sera effectué (dénombrements) lors de différentes étapes de maturation des biofilms (adhésion, colonisation-développement, dissémination dans l'eau courante). Les propriétés des souches de *P. syringae* criblées dans la première partie pourront être testées dans ces systèmes, en fonction de facteurs biotiques (autres organismes vivants) ou abiotiques (hydrodynamique, nutriments, pH, température, éclaircissement, type de surface...).

#### *c – Quantification des réservoirs de *P. syringae* dans ce bassin versant*

Une perspective de ce travail est de quantifier la taille des populations de *P. syringae* dans les biofilms épilithes ce qui permettra d'estimer la taille des populations aquatiques du bassin versant

étudié. Cet élément ramené à la taille des populations épiphytes ou aquatique en forme planctonique du même bassin donnera une dimension relative à l'importance des réservoirs et des pressions de sélection qui s'exercent sur ce pathogène.

Les résultats attendus concernent d'une part le rôle des facteurs de virulence dans la capacité des souches de *P. syringae* à entrer, survivre et sortir des biofilms et d'autre part la détermination des temps de résidence et du « turn-over » des bactéries dans le biofilm

### **Conclusion**

Peu de choses sont connues dans les interactions algue-bactérie et ce modèle est une opportunité unique de les aborder pour plusieurs raisons. La première est que *P. syringae* est une bactérie phytopathogène très étudiée dans de nombreux laboratoires et pour laquelle on dispose de beaucoup d'informations au niveau du génome et de sa biologie moléculaire ainsi que de nombreux mutants. La deuxième raison est que la majorité des informations connues sur cette espèce concerne 3 ou 4 souches modèles issues des agrosystèmes et que la collection de souches environnementales d'Avignon constitue un matériel unique qui va permettre d'ouvrir des perspectives innovantes en élargissant le champ d'investigation sur cette espèce.

Nous souhaitons aborder en particulier la question du rôle des algues dans la maintenance et la diversification des facteurs du pouvoir pathogène lors du passage de *P. syringae* dans les habitats non agricoles. Cette question est directement reliée à celle de l'émergence du pouvoir phytopathogène de cette bactérie lors de son évolution et du rôle des algues dans cette évolution. Des telles questions nous permettront d'élaborer des hypothèses nouvelles dans l'évolution des agents phytopathogènes.

## **5. Références bibliographiques**

- Achouak W, Christen R, Barakat M, Martel MH & Heulin T. 1999a. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol micro-aggregates in Martinique. *Int J Syst Bacteriol* 49, 787-794.
- Achouak W, Normand P & Heulin T. 1999b. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *Bacillaceae*. *Int J Syst bacteriol* 49, 961-967.
- Achouak W, Thiery JM, Roubaud, P & Heulin T. 2000. Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. *FEMS Microbiol Ecol* 31 (1), 11-19.
- Agrimonde. 2010. Scénarios et défis pour nourrir le monde en 2050. S Paillard, S Treyer, B Dorin Eds. Collection Matière à débattre et décider. Ed Quae, Paris.
- Alami Y, Heulin T, Milas M, de Baynast R, Heyraud A & Villain A. 1998. Polysaccharide microorganism and method for obtaining same composition containing it and application. European Patent 97-1624970212
- Alami Y, Achouak W, Marol C & Heulin T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth-promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol* 66, 3393-3398.
- Ali-Shtayeh MS, Salameh AA M, Abu-Ghdeib SI & Jamous RM. 2001. Hair and scalp mycobiota in school children in Nablus area. *Mycopathologia* 150 (3), 127-135
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbil Rev* 59, 143-169.
- Amato P, Parazols M, Sancelme M, Paolo L, Mailhot G, & Delort AM. 2007. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol* 59, 242-254.
- Amellal N, Bartoli F, Villemin G, Talouizte A & Heulin T. 1999. Effects of inoculation of EPS-producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. *Plant Soil* 211, 93-101.
- Ashraf M, Berge O, Azam F & Heulin T. 1999. Bacterial exopolysaccharides and productivity of salt affected soils : 1. Diversity od exopolysaccharide-producing bacteria isolated from the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in normal and saline Pakistani soils. *Pak J of Biol Sciences* 2 (1), 201-206.
- Ashraf M, Hasnain S, Berge O & Mahmood T. 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol Fert Soils* 40 (3), 157-162.
- Bailly J, Fraissinet-Tachet L, Verner MC, Debaud JC, Lemaire M, Wésolowski-Louvel M & Marmeisse R. 2007. Soil eukariotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *The ISME J* 1, 1-11.
- Bais HP, Fall R & Vivanco J M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134, 307-319.
- Bak S, Olsen CE, Petersen BL, Møller BL & Halkier BA. 1999. Metabolic engineering of *p*-hydroxybenzylglucosinolate in *Arabidopsis* by expression of the cyanogenic CYP79A1 from *Sorghum etaboli*. *Plant J* 20 (6), 663-671.
- Balandreau J. 1983. Microbiology of the association. *Can J Microbiol* 29 (8), 851-859.
- Bashan Y & de-Bashan LE. 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 68, 2637-2643.
- Bender CL, Alarcon-Chaidez F & Gross D C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Molec Biol Rev* 63, 266-292.
- Berge O, Fages J, Mulard D & Balandreau J. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop yield in field grown maize. *Symbiosis*, 9, 259-266.
- Berge O, Heulin T, Achouak W, Richard C Bally R & Balandreau J. 1991a. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium abundant in the rhizosphere of wheat and maize. *Can J Microbiol* 37, 195-203.

- Berge O, Heulin T & Balandreau J. 1991b. Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. *Biol Fertil Soils* 11, 210-215.
- Berge O, Guinebretière MH, Achouak W, Normand P & Heulin T. 2002. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 607-616.
- Berge O, Balesdent J, Haichar FZ, Marol C & Achouak W. 2006a. Root exudate-consuming microbial community structure. in "Handbook of methods used in rhizosphere research", Chap 4.4 : Gene expression of single species and communities. Ed F. Martin-Laurent.
- Berge O, Brandelet G & Heulin T. 2006b. Ratio of root-adhering soil (RAS) to root tissue (RT) dry masses (RAS/RT ratio), i.e. rhizosphere soil aggregation, In "Handbook of methods used in rhizosphere research", Chap 1.3 : Sampling of Rhizosphere soil and collection of rhizosphere soil solution . Ed A. Göttlein.
- Berge O & Achouak W. 2007. Outils de biologie moléculaire pour la caractérisation des populations bactériennes des biofilms. In « Biodétérioration des matériaux. Action des microorganismes, de l'échelle nanométrique à l'échelle macroscopique ». Chapitre IX. Ed. Fritz-Feugeas F., Cornet A., Tribollet B. Ellipses, Paris.
- Berge O, Lodhi A, Brandelet G, Santaella C, Roncato M, Christen R, Heulin T & Achouak W. 2009. *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres . *Int J Syst Evol Microbiol* (59) 367-372.
- Berge O, Mavingui P & Heulin T. 2010. Exploring diversity of cultivable aerobic endospore-forming bacteria: from pasteurization to procedures without heat-shock selection. In "Aerobic, endospore-forming soil bacteria" Edited by N. A Logan & P. De Vos. Springer. Sous-presse.
- van Berkum P, Beyene D, Bao G, Campbell A & Eardly D. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebourg]. *Int J Syst Evol Microbiol* 48 13-22.
- Bernard L, Mougél C, Maron PA, Nowak V, Lévêque J, Henault C, Haichar FZ, Berge O, Marol C, Balesdent J, Gibiat F, Lemanceau P & Ranjard L. 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from <sup>13</sup>C labeled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environ Microbiol* 9 (3), 752-764.
- Bezzate S, Aymerich S, Chambert R, Czarnes S, Berge O & Heulin T. 2000. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ Microbiol* 2 (3), 333-342.
- Bhattacharya D & Medlin L. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol* 116, 9-15.
- Biggs BJB & Close ME. 1989. Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers - the relative effects of flows and nutrients. *Freshwater Biol* 22 (2 ), 209-231.
- von Bodman SB, Majerczak DR & Coplin DL. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *PNAS* 95 (13), 7687-7692.
- Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, Bos D, de Graff W, Pel R & Cappenberg TE. 1998, Direct link of microbial populations to specific biogeochemical processes by <sup>13</sup>C-labelling of biomarkers, *Nature*, 392, 801-805.
- Boulêtreau S. 2007. Déterminisme des fonctions d'accrétion et de détachement du biofilm phototrophe en milieu naturel: études expérimentale et numérique des facteurs de contrôle de la biomasse en rivière. Rapport de Thèse de Doctorat en hydrobiologie de l'Université de Toulouse III, Paul Sabatier. 190 p.
- Brader G, Mikkelsen MD, Halkier BA & Palva ET. 2006. Altering glucosinolate profiles modulates diseases resistance in plants. *Plant J* 46 (5), 758-767.
- Brenner D. 1978. Characterization and clinical identification of *Enterobacteriaceae* by DNA hybridization. *Progress in Clinical Pathology* 7, 7 I-117.

- Bressan M, Roncato MA, Bellvert F, Comte G, Haichar FZ, Achouak W & Berge O. 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *The ISME Journal*, 3 (11) 1243-57.
- Burford EP, Kierans M & Gadd GM. 2003. Geomycology : fungi in mineral substrata. *Mycologist* 17 (3), 98-107.
- Burlinson P, Knaggs J, Hodgkin J, Pears C & Preston GM. 2008. Interactions of Pseudomonads with Mushrooms and Other Eukaryotic hosts. In « *Pseudomonas syringae* Pathovars and related Pathogens ». M'B Fatmi et al., Eds. Springer Science + Business Media B. V.
- Cangelosi GA, Freitag NE & Buckley MR. 2004. From outside to inside: Environmental microorganisms as human pathogens. A report of the American Academy of Microbiology, Washington, DC (USA), <http://www.asm.org/ASM/files/ccLibraryFiles/FILENAME/000000001402/EnvironMicroBW.pdf>, 18 p.
- Cao Z, Buttani V, Losi A & Gärtner W. 2007. A blue light inducible two-component signal transduction system in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Biophysical J* 94, 897-905.
- Chanway CP, Holl FB & Turkington R. 1988a. Genotypic coadaptation in plant-growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant soil* 106 (2), 281-284.
- Chanway CP, Nelson LM & Holl FB. 1988b. Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum*) by coexistent *Bacillus* species. *Can J Microbiol* 34 (7), 925-929.
- Christner BC, Morris CE, Foreman CM, Cai R & Sands DC. 2008. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. *Science* 319, 1214.
- Cohen V. 2002. Dynamique et rôle d'un exopolysaccharide bactérien produit par la souche *Rhizobium* sp. YAS34 dans le sol et la rhizosphère de Brassicacées. Rapport de Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé, Université de Provence Aix-Marseille I, France. 138 p.
- Constantinidou HA, Hirano SS, Baker LS & Upper CD, 1990. Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria : the role of rain. *Phytopathology* 80, 934-937.
- Cother EJ & Gilbert RL, 1990. Presence of *Erwinia chrysanthemi* in two major river systems and their alpine sources in Australia. *J Appl microbiol* 69 (5), 729-738
- Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ & Smith AG. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 433 (3), 90-93.
- Dance A. 2008. What lies beneath ? *Nature* 455 (9), 724-725.
- Darcheville O, Février L, Haichar FZ, Berge O, Martin-Garin A, Renault P. 2008. Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states. *J Env Rad* 99 (6), 981-992.
- Denison RF & Kiers ET. 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiol Lett* 237, 187-193
- Depret G, Houot S, Allard MR, Breuil MC, Nouaim R, Laguerre G. 2005. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiol Ecol* 51(1) 87-97.
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX & Tang JL. 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci* 100 (19), 10995-11000.
- Ehling-Schulz M, Guinebretiere MH, Monthán A, Berge O, Fricker M & Svensson B. 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 260, 232-240.
- Ezaki S E, Hashimoto Y & Yabuchi E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid- deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 39, 224-229.
- Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S & Nolan M. 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *PNAS* 102, 11064-11069

- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, Berge O & Heulin T. 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent Pseudomonads associated with the *Douglas Fir-Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 63 (5), 1852-1860.
- Gewin V. 2010. *Nature* 466 (29), 532-533.
- Garcia-Fraile P, Rivas P, Willems A, Peix A, Martens M, Martinez-Molina E, Mateos PF & Velazquez E. 2007. *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 844-848.
- Gimsing AL & Kirkegaard JA. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biol Biochem* 38, 2255-2264.
- Giroldo D, Ortolano PIC & Vieira AAH. 2007. Bacteria-algae association in batch cultures of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrates. *Freshwater Biol* 52 (7), 1281-1289.
- Gorbushina A A. 2007. Life on the rocks. *Environ Microbiol* 9 (7), 1613-1631.
- Gouzou L, Burtin G, Philipp R, Bartoli F & Heulin T. 1993. Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere - Preliminary examination, *Geoderma* 56 (1-4), 479-491.
- Guégan JF, Constantin de Magny G, Durand P & Renaud F. 2007. Écologie de la santé: le Macroscopie comme nouvel outil ! in « Écologie et Évolution des systèmes parasites ». Thomas F, Renaud F, Guégan JF Eds. De Boeck Université, Paris, France. 301-344.
- Guégan JF. 2008. Review of "Infectious disease ecology. Effects of Ecosystems on disease and of Disease on ecosystems" by Richard S Ostfeld, Felicia Keesing & Valerie T Eviner. *Parasites Vectors* 1, 28.
- Guemouri-Athmani S, Berge O, Bourrain M, Mavingui P, Thiéry JM, Bhatnagar T & Heulin T. 2000. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur J Soil Biol* 36, 1-11.
- Guinebretière MH, Berge O, Normand P, Morris C, Carlin F & Nguyen-the C. 2001. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Appl Environ Microbiol* 67 (10), 4520-4530
- Guttman DS, Vinatzer BA, Sarkar SF, Ranall MV, Kettler G & Greenberg JT. 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* 295, 1722-1726.
- Guttman, DS, Gropp SJ, Morgan RL & Wang PW. 2006. Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. *Mol Biol Evol* 23:2342-2354.
- Haichar FZ. 2004. Structure des communautés bactériennes impliquées dans la dégradation de la cellulose par traçage isotopique de l'ADN (DNA-SIP). Rapport de DEA en Microbiologie Moléculaire et Biotechnologie, Université d'Aix-Marseille II, France.
- Haichar FZ, Achouak W, Christen R., Heulin T, Marol C, Marais MF, Mougél C, Ranjard L, Balesdent J & Berge O. 2007. Identification of cellulolytic bacteria in soil by Stable Isotope Probing. *Environ Microbiol* 9 (3), 625-634.
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T & Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME J* 2, 1221-1230.
- Halkier BA & Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann Rev Plant Biol* 57, 303-333.
- Hartmann A. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312 (1-2), 7.
- Heulin T, Rahman M, Omar AMN, Rafidison JC & Balandreau J. 1989. Experimental and mathematical procedures for comparing N<sub>2</sub>-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. *J Microbiol Methods* 9, 163-17.
- Heulin T & Berge O. 1994. Écologie des bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère des céréales : mieux décrire pour mieux comprendre. In: "*Recent Developments in Biological Nitrogen Fixation Research in Africa*". Eds : M. Sadiki and A. Hilali, IAV Hassan II, Rabat, pp. 500-30.

- Heulin T, Berge O, Hebbar P, Gouzou L & Balandreau J. 1994. *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with wheat roots in french soils. Eur J Soil Biol 30 (1), 35-42.
- Hirano SS & Hupper CD. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. Microbiol Mol Biol Rev 64 (3), 624-653.
- Hugenholtz P, Goebel BM & Pace NR. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J Bacteriol 180, 4765-74.
- Hunter WJ, Kuykendall LD & Manter DK. 2007. *Rhizobium selenireducens* sp. nov. : a selenite-reducing alpha-proteobacteria isolated from a bioreactor. Curr Microbiol 55, 455-460.
- Jakob K, Goss EM, Araki H, Van T, Kreitman M & Bergelson J. 2002. *Pseudomonas viridiflava* and *P. syringae*- natural pathogens of *Arabidopsis thaliana*. MPMI 15 (12), 1195-1203.
- Jayaweera K & Flanagan P. 1982. Investigations of biogenic ice nuclei in the Arctic atmosphere. Geophys Res Lett 9 (1), 94-97.
- Jenkinson HF & Lappin-Scott HM. 2001. Biofilms adhere to stay. Trends microbial 9 (1), 9-10.
- Journet L, Hughes KT & Cornelis GR. 2005. Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. Mol Membrane Biol 22 (1-2), 41-50.
- Kaci Y, Heyraud A, Barakat M, Heulin T. 2007. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from and soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. Res in Mic 156 (4), 522-531.
- Kent AD & Triplett EW. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. Ann rev Microbiol 56, 211-36.
- Laussel A. 2007. Écologie de la bactérie *Pseudomonas syringae* dans les biofilms épilithes. Rapport de stage M2. Master Sciences et Technologies, BGAE, BIMP, SMGE. Univ Montpellier II. 34 p.
- Lebuhn M, Heulin T & Hartmann A. 1997. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. FEMS Microbiol Ecol 22(4), 325-334.
- Lebuhn M, Achouak W, Schlöter M, Berge O, Meier H, Barakat M, Hartmann A. & Heulin T. 2000. Taxonomic characterisation of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50, 2207-2223.
- Liao SS, Fett W, Tzean CH & Hoffman G. 2006. Detection and sequence analysis of an altered pectate lyase gene in *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* and related bacteria. Can J Microbiol 52 (11), 1051-1059.
- Lindberg T & Granhall U. 1984. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. Appl Environ Microbiol, 48 (4), 683-689.
- Lindeberg M, Myers C R, Collmer A & Schneider D J. 2008. Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. MPMI 21 (6), 685-700.
- Lindemann J, Constantinidou HA, Barchet WR, & Upper CD. 1982. Plants as sources of airborne bacteria including ice nucleation-active bacteria. Appl Environ Microbiol 44, 1059-1063.
- Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KF & Handelsman J. 2008. Rules of Engagement : Interspecies interactions that regulate microbial communities. Annu Rev Microbiol 62, 375-401.
- Liu X, Zhang X & Herbert S J. 2010. Nature 465 (27), 420.
- Lodhi-Hassan A, Heulin T, Milas M, Heyraud, A, Achouak W, Berge O, Deline L, Sanhaji G & Bresin A (2006). Nouveau polysaccharide, son procédé de préparation et ses utilisations notamment dans le domaine cosmétique. Dépôt n° 06/08840 le 9 octobre 2006.
- Losi A & Gärtner W. 2008. Shedding (blue) light on algal gene expression. PNAS 105 (1), 7-8.
- Lyauthey E, Lacoste B, Ten-Hage L, Rols JL & Garbetian F. 2005. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. Water Res 39, 380-388.

- Ma W, Dong FFT, Stavrinides J & Guttman DS. 2006. Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PloS Genet* 2 (12), 2131-2142.
- Matz C, Moreno A M, Alhede M, Manefield M, Hauser A R, Giskov M & Kjelleberg S. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *The ISME J* 2, 843-852.
- Mavingui P, Berge O & Heulin T. 1990. Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. *Symbiosis*, 9, 215-221.
- Mavingui P, Laguerre G, Berge O & Heulin T. 1992. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 58, 1894-1903.
- Mavingui P & Heulin T. 1994. In-vitro chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 26 (6), 801-803.
- Mindl B, Sonntag B, Pernthaler J, Vrba J, Psenner R & Posch T. 2005. Effects of phosphorus loading on interactions of algae and bacteria: reinvestigation of the "phytoplankton-bacteria paradox" in a continuous cultivation system. *Aquatic Microb Ecol* 38, 203-213.
- Mohr TJ, Liu H, Yan S, Morris CE, Castillo JA, Jelenska J & Vinatzer BA. 2008. Naturally occurring non-pathogenic isolates of the plant pathogen species *Pseudomonas syringae* lack a Type III Secretion System and effector gene orthologues. *J Bacteriol* 190, 2858-2870.
- Morris CE, Monier JM & Jacques MA. 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 64,4789-4795.
- Morris CE, Bardin M, Berge O, Frey-Klett P, Fromin N, Girardin H, Guinebrière MH, Lebaron P, Thiéry J & Trousselier M. 2002. Biodiversity of microbial ecosystems: approaches to experimental design and hypothesis testing in the primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol and Mol Biol Rev* 66(4), 592-616.
- Morris CE & Monier JM. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41, 429-453.
- Morris CE, Georgakapolous D & Sands DC. 2004. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J Phys IV France* 121, 87-103.
- Morris CE, Kinkel LL, Xiao K, Prior P & Sands DC. 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect Genet Evol* 7, 84-92.
- Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffière A, Yan S, Dominguez H & Thompson BM. 2008a. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME J* 2, 321-334.
- Morris CE, Sands DC, Bardin M, Jaenicke R, Vogel B, Leyronas C, Ariya PA & Psenner R. 2008b. Microbiology and atmospheric processes: an upcoming era of research on bio-meteorology. *Biogeosciences Discuss* 5, 191-212.
- Morris CE, Bardin M, Kinkel LL, Moury B, Nicot PC, and Sands DC 2009. Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathogens* 5, e1000693.
- Morris CE, Sands DC, Vanneste JL, Montarry J, Oakley B, Guilbaud C, and Glaux C. 2010. Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *mBio™* 1(3) e00107-00110.
- Mourino-Pérez RR. 1998. Oceanography and the 7th cholera pandemic. *Epidemiology* 9 (3), 355-7.
- Muyzer G, De Waal EC & Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *App Environ Microbiol* 59, 695-700.
- Oades JM. 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implication for management. *Plant Soil* 76, 319-337.
- O'Callaghan KJ, Stone PJ, Hu X, Griffiths DW, Davey MR & Cocking EC. 2000. Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Appl Environ Microbiol* 66, 2185-2191.

- Omar N, Berge O, El-Sayed SA & Balandreau J. 1992a. Whey as a growth medium for two spp. of *Azospirillum* grown in batch culture. *Zentralbl Mikrobiol* 148, 284-288.
- Omar N, Berge O, Hassanein E & Shalan S. 1992b. In vitro and in situ effects of herbicide Thiobencarb on rice-*Azospirillum* association. *Symbiosis* 13, 55-63.
- Omar N, Berge O, Shalaan SN, Hubert JL, Heulin T & Balandreau J. 1992c. Inoculation of rice with *Azospirillum brasilense* in Egypt. Results of five different trials between 1985 and 1990. *Symbiosis* 13, 281-289.
- Ostfeld RS, Keesing F & Eviner VT. 2008. Infectious disease ecology: effects of ecosystems on disease and of disease on ecosystems. 11<sup>th</sup> Cary Conf, Millbrook New York USA; Princeton Univ Press.
- Peix A, Berge O, Rivas R, Abril A & Velasquez E. 2005. *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba, Argentina. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1107-1112.
- Philippot L, Andersson SG, Battin TJ, Prosser JI, Schimel JP, Whitman WB, Hallin S. 2010. The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat Rev Microbiol* 8 (7), 523-529
- Pruzzo C, Vezzulli L & Colwell R. 2008. Global impact of *Vibrio Cholerae* interactions. *Environ Microbiol* 10 (6), 1400-1410.
- Quan ZX, Bae HS, Baaek JH, Chen WF, Im WT & Lee ST. 2005. *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2543-49.
- Radajewski S, McDonald IR & Murrell JC. 2003. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganism. *Curr Opin Biotechnol* 14, 296-302.
- Rangel-Castro JI, Killham K, Ostle N, Nicol GW, Anderson IC, Scrimgeour CM, Ineson P, Meharg A & Prosser J. 2005. Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms. *Environ Microbiol* 7 (6), 828-838.
- Ranjard L, Poly F & Nazaret S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol* 151, 167-77.
- Rao D, Webb JS, Holmström C, Case R, Low A, Steinberg P & Kjelleberg S. 2007. Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Appl Environ Microbiol* 73 (24), 7844-7852.
- Reguera G & Kolter R. 2005. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J Bacteriol* 187 (10), 3551-3555.
- Riffaud CMH. 2002. La bactériose du melon: écologie et stratégies de lutte contre *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. Rapport de Thèse de doctorat en écologie microbienne, Université Claude Bernard - Lyon I.
- Riffaud CMH & Morris CE. 2002. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony staining. *Eur J Plant Pathol* 108, 539-545.
- Rixen C, Stoeckli V & Ammann W. 2003. Does artificial snow production affect soil and vegetation of ski pistes ? A review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and systematics* 5/4, 219-230.
- Rumberger A & Marschner P. 2003. 2-phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biol Biochem* 35, 445-452.
- Sands DC, Langhans VE, Scharen AL & de Smet G. 1982. The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. *J Hungarian Meteorol Serv* 86, 148-152.
- Santaella C, Schue M, Berge O, Heulin T & Achouak W. 2008. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environ Microbiol* 10 (8), 2150-2163.
- Sarkar SF & Guttman DS. 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol* 70, 1999-2012.
- Sarkar FS, Gordon JS, Martin GB & Guttman DS. 2006. Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genetics* 174, 1041-1056.
- Sawada H, Suzuki F, Matsuda I & Saitou N. 1999. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of argK and the evolutionary stability of hrp gene cluster. *J Mol Evol* 49, 627-644.

- Sawada H, Kanaya S, Tsuda M, Suzuki F, Azegami K, Saitou N. 2002. Phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: The horizontal transfer of the argK-tox cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. *J Mol Evol* 54 (4), 437-457.
- Scalan PD & Marchesi J R. 2008. Microeucaryotic diversity of the human distal gut microbiota : qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *The ISME J* 2, 1183-1193.
- Seldin L, van Elsas JD & Penido EGC. 1984. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *Int J Syst Bacteriol* 34, 451-456.
- Shchipanov NA, Aleksandrov DY & Ameksandrova AV. 2003. Small mammals disperse micromycete spores. *Doklady Biol Sci* 390 (1-6), 225-230.
- Six J, Bossuyt H, Degryze S & Deneef K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and organic matter dynamics. *Soil Till Res* 79, 7-31.
- Strap JL. 2007. Characterization of Microeukaryota in Natural Environments. In « Manual of Environmental Microbiology » 3rd edition. C J Hurst Ed. ASM Press, Washington DC.
- Sutherland IW. 2001. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9 (5), 222-227.
- Swartz TE, Tsneq TS, Frederickson MA, Paris D, Comerci DJ, Rajashekara G, Kim JG, Mudgett MB, Splitter GA, Ugalde RA, Goldbaum FA, Briggs WR & Bogomolni RA. 2007. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317, 1090-1093.
- Thomas-Bauzon D, Weinhard P, Villecourt P & Balandreau J. 1982. The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N<sub>2</sub>-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* 28, 922-928.
- Tornero P & Dangl JL. 2001. A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J* 28 (4), 475-481.
- Tisdall JM & Oades JM. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J Soil Sci* 62, 141-63.
- Tran Van V, Mavingui P, Berge O, Balandreau J & Heulin T. 1994. Promotion de croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolée d'un sol sulfaté acide du Viêt-nam. *agronomie* 14, 697-707.
- Tran Van V, Berge O, Balandreau J, Ngo Ké S & Heulin T. 1996. Isolement et activité nitrogénasique de *Burkholderia vietnamiensis*, bactérie fixatrice d'azote associée au riz (*Oryza sativa* L.) cultivé sur un sol sulfaté du Viêt-Nam. *agronomie* 16, 479-491.
- Tran Van V, Ngo Ké S, Berge O, Faure D, Bally R, Hebbar P & Heulin T. 1997. Isolation of *Azospirillum lipoferum* from the rhizosphere of rice by a new, simple method. *Can J Microbiol* 43, 486-490.
- Tran Van V, Berge O, Ngo Ké S, Balandreau J & Heulin T. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 218, 273-284.
- Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Maure L, Escarré J, Béna G, Brunel B & Cleyet-Marel JC. 2009 *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a novel metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 850 -55.
- von der Weid I, Frois Duarte G, van Elsas JD & Seldin L. 2002. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 52 (6), 2147-2153.
- Warmink JA & van Elsas JD. 2008. Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved ? *The ISME J* 2, 887-900.
- Wayne LG, Brenner D J, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP & Trüper HG. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463-464.
- Willems A, Doignon-Bourcier F, Goris J, Coopman R, de Lajudie P, De Vos P & Gillis M. 2001. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1315-1322.
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G & Bhattacharya D. 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21 (5), 809-818.

## **6. Quelques publications importantes**

Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots

Bressan M., Roncato M.A., Bellvert F., Comte G., Haichar F.Z., Achouak W. & **Berge O.**  
**The ISME J 2009** 3 (11), 1243-57.

*Rhizobium alarii* sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres .

**Berge O.**, Lodhi A., Brandelet G., Santaella C., Roncato M., Christen R., Heulin T. & Achouak W.  
**Int J Syst Evol 2009 Microbiol.** 59, 367-72.

The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization

Santaella C., Schue M., **Berge O.**, Heulin T. & Achouak W.  
**Environ Microbiol 2008** 10 (8), 2150 – 2163.

Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure

Haichar F. Z., Marol C., **Berge O.**, Rangel-Castro J. I., Prosser J. I., Balesdent J., Heulin T. & Achouak W. **The ISME J 2008** 2, 1221-30.

Identification of cellulolytic bacteria in soil by Stable Isotope Probing

Haichar F. Z., Achouak W., Christen R., Heulin T., Marol C., Marais M. F., Mougel C., Ranjard L., Balesdent J. & **Berge O.**  
**Environ Microbiol 2007** 9 (3), 625-34.

Biodiversity of microbial ecosystems: approaches to experimental design and hypothesis testing in the primary scientific literature from 1975 to 1999

Morris C. E., Bardin M., **Berge O.**, Frey-Klett P., Fromin N., G, Guinebretière M. H., Lebaron P., Thiéry J. & Trousselier M.  
**Microbiol and Mol Biol Rev 2002** 66(4) 592-616.