

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la
recherche scientifique

UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Option
Biotechnologie végétale

République Française

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

Sciences et Techniques



Ecole Doctorale: SIBAGHE (Systèmes Intégrés en
Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences, Environnement).
Option : Biologie Intégrative des Plantes

THESE EN COTUTELLE

En vue de l'obtention de diplôme de Doctorat en Science

Date de soutenance : 18 Décembre 2013

**Implication des gènes de transporteurs de nitrate *NRT2.1*,
NRT2.5 et *NRT2.6* dans la réponse de stimulation de
croissance induite par la bactérie rhizosphérique
Phyllobacterium brassicacearum STM196 chez *Arabidopsis*
*thaliana***

Présenté par Maya KECHID

Membres du jury :

Présidente :	Nadia YKHLEF	Professeur à l'Université Constantine 1
Directeurs de thèse :	Abdelhamid DJEKOUN	Professeur à l'Université Constantine 1
	Bruno TOURAINÉ	Professeur à l'Université Montpellier 2
Rapporteurs :	Fatiha AID	Professeur à l'Université USTHB. Alger
	Jean Jacques BONO	Chargé de Recherche. INRA. Toulouse
Examinatrice :	Claudine FRANCHE	Directrice de Recherche. IRD. Montpellier

Année universitaire 2013-2014

Remerciements

C'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères à Bruno TOURAINE pour avoir accepté de m'accueillir dans son équipe, d'avoir dirigé cette thèse avec excellence et de m'avoir permis de la réaliser dans les meilleurs conditions. Je tiens particulièrement à le remercier pour la liberté d'action qu'il m'a donnée à chaque étape de ce travail, pour sa gentillesse, sa compréhension et surtout pour sa grande patience surtout pour la période de rédaction de thèse en Algérie. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'avait accordée et que ce travail soit à la hauteur de ses espérances. Quoiqu'il en soit, j'ai beaucoup appris à ses côtés et je suis très honoré de l'avoir eu pour encadrant.

Mes remerciements s'adressent aussi à mon directeur de thèse en Algérie Pr Abdelhamid DJEKOUN qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et ma reconnaissance pour ses conseils, ses encouragements et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail.

Un grand merci à Guilhem DESBROSSES dont les mots ne suffisent pas pour le remercier pour toute l'aide qu'il m'a apportée, pour m'avoir bien formé, pour sa disponibilité, pour son esprit scientifique et sa façon de me pousser à réfléchir plus profondément. J'espère qu'il retrouvera dans ce travail toute ma gratitude. Au sein de l'équipe, je suis aussi redevable à Fabrice VAROQUAUX qui était toujours présent lorsque j'avais besoin de lui, pour me conseiller et m'encourager avec un sens de l'humour typique à lui.

Je remercie également les membres de jury pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail : Mme Fatima AID professeur à l'USTHB d'Alger, Mr Jean Jaques BONO de l'INRA de Toulouse, Mme Claudine FRANCHE de L'IRD de Montpellier et Mme Nadia YKHlef professeur à l'Université Constantine 1.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les remarques constructives qu'ils ont fait sur mon projet de thèse : Mme Claude PLASSARD de l'INRA de Montpellier, Mr Xavier PINOCHET de CETIOM de Paris et Gisèle LAGUERRE de LSTM qui nous a malheureusement quitté.

Un merci tout particulier au Directeur du Laboratoire des Symbioses Tropicales et méditerranéennes (LSTM) : Michèle LEBRUN.

Je compte remercier aussi Samia HENINI pour son amitié et son aide technique au laboratoire, ma stagiaire Wafaa ROKHSI, les doctorants de mon équipe Marc GALLAND et Justine BRESSON et les doctorants que je n'ai pas rencontré mais dont je les avais connu à travers leurs travaux : Céline CONTESTO et Sophie MANTELIN.

Mes remerciements s'adressent enfin au programme AVERROES qui m'a accordé une bourse qui m'a permis d'effectuer une belle expérience au sein de LSTM riche du côté scientifique ainsi que du côté humain.

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mes parents pour leur investissement à mon égard, leur grande disponibilité, leur aide inconditionnelle, leur patience et leurs conseils prodigués tout au long de mon étude, j'espère qu'ils trouveront à travers ce travail l'expression de toute ma reconnaissance et mon amour.

Ma grand-mère que j'aime beaucoup.

Ma sœur Radia et mon frère Djallil.

Mon petit neveu Yanis.

Toute ma famille

Mes amies : Rym, Sandra, Soumeya, Hania, Nassira, Meriem, Sara...

Et

Tous mes collègues et mes amis de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire (INATAA), ainsi que tous les membres du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie végétale de la faculté de biologie de l'Université Constantine 1.

Titre : Implication des gènes de transporteurs de nitrate *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6* dans la réponse de stimulation de croissance induite par la bactérie rhizosphérique *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 chez *Arabidopsis thaliana*.

Résumé

L'effet stimulateur de la croissance et de la nutrition des plantes exercés par les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) a longtemps été étudié en s'intéressant à la bactérie. Cependant, les voies de signalisations impliquées dans la réponse de la plante à l'inoculation restent mal étudiées. A cet effet, notre étude entre dans le cadre des recherches visant les réponses physiologiques et moléculaires de la plante induites par une PGPR. Dans notre équipe de recherche, nous avons choisi la PGPR *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 isolée de la rhizosphère de Colza et nous l'avons inoculée à la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cette PGPR a montré sa capacité à stimuler l'allongement des racines latérales et des poils racinaires ainsi que d'augmenter la production de biomasse par la plante. Une forte surexpression de deux gènes de la famille de transporteurs de nitrate *NRT2*, *NRT2.5* et *NRT2.6*, a été observée chez les plantes inoculées avec STM196. La fonction des produits de ces deux gènes n'est pas connue. Cependant, les données de transcriptomiques accumulées dans l'équipe font ressortir ces deux gènes comme des candidats intéressants dans les réponses moléculaires à l'interaction avec STM196. D'autre part, des études précédentes dans l'équipe ayant montré des effets antagonistes de la bactérie et du nitrate sur le développement racinaire, il est important de considérer la relation entre les effets de la nutrition nitrique et de la bactérie. Le principal transporteur responsable de l'absorption de NO_3^- étant *NRT2.1*, nous nous sommes intéressés à son rôle dans les réponses de la plante à la bactérie et à sa relation éventuelle avec *NRT2.5* et *NRT2.6*. Nous avons réalisé une approche de génomique inverse avec les trois simples mutants *ko nrt2.1*, *ko nrt2.5* et *ko nrt2.6* dont nous disposions au départ, et avec les trois doubles mutants *nrt2.5xnrt2.6*, *nrt2.1xnrt2.6* et *nrt2.1xnrt2.5* que nous avons généré. Nous avons démontré que les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* sont impliqués dans les réponses de stimulation de croissance de la plante et de modification d'architecture racinaire à la PGPR STM196. Cette voie de régulation est indépendante des contrôles exercés par le statut azoté de la plante.

Mots clés: Interaction plante-microorganisme, *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Arabidopsis thaliana*, transporteurs de nitrate, *NRT2.1*, *NRT2.5*, *NRT2.6*, Activité nitrate réductase, *NRI*, expression des gènes.

Laboratoires : Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (UMR113, Université Montpellier 2, Institut de Recherche pour le Développement, Cirad, Montpellier SupAgro, Institut National de la Recherche Agronomique), Université Montpellier 2, CC002, Place E. Bataillon, F34095 Montpellier Cedex 5, France.

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département Biologie Ecologie, Faculté de Biologie, Université Constantine 1. Route Ain El-Bey, Constantine, Algérie.

Title: Involvement of *NRT2.1*, *NRT2.5* and *NRT2.6* nitrate transporter genes in the growth promotion response of *Arabidopsis thaliana* to the rhizospheric bacterium *Phyllobacterium brassicacearum* STM196.

Abstract

The promotion of plant growth and nutrition by some rhizospheric bacteria (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) is well known for a long time. However, the signaling pathways involved in the plant responses to these bacteria still remain essentially obscure. Our study aims at identifying molecular factors of plant physiological and developmental responses induced by PGPR. For this goal, we used the PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, which has been isolated from rape rhizosphere, and the plant model *Arabidopsis thaliana*. This PGPR stimulates lateral root and root hair elongation and induce an increase of plant biomass production. Two genes of the *NRT2* family of nitrate transporters, namely *NRT2.5* and *NRT2.6*, are strongly overexpressed upon inoculation of *Arabidopsis* with STM196. The function of *NRT2.5* and *NRT2.6* is not known. However, transcriptomic data obtained in our team show that these two genes are promising candidates of the molecular responses to STM196. In addition, previous work in our team showed antagonistic effects of STM196 and exogenous nitrate on root development, showing that the effects of the bacteria must be considered together with those of nitrate nutrition. Since *NRT2.1* is the major transporter for NO_3^- uptake, we looked at its role in the plant response to STM196 and its possible relationship with *NRT2.5* and *NRT2.6*. We carried out a reverse genetic approach using the single mutants *ko nrt2.1*, *ko nrt2.6* and *ko nrt2.5* available at the moment this thesis work began and the double mutants *nrt2.5xnrt2.6*, *nrt2.1xnrt2.6* and *nrt2.1xnrt2.5* we generated. We demonstrated that *NRT2.5* and *NRT2.6* are involved in plant growth stimulation by STM196 and the root architecture changes elicited by this bacterium. This *NRT2.5/NRT2.6*-dependent pathway is independent from the regulations exerted by N nutritional status.

Key words: Plant-microorganism interaction, *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Arabidopsis thaliana*, nitrate transporter, *NRT2.1*, *NRT2.5*, *NRT2.6*, nitrate reductase activity, *NRI*, genes expression.

Laboratories : Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (UMR113, Université Montpellier 2, Institut de Recherche pour le Développement, Cirad, Montpellier SupAgro, Institut National de la Recherche Agronomique), Université Montpellier 2, CC002, Place E. Bataillon, F34095 Montpellier Cedex 5, France.

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département Biologie Ecologie, Faculté de Biologie, Université Constantine 1. Route Ain El-Bey, Constantine, Algérie.

العنوان تورط جينات نقل النترات *NRT2.6*, *NRT2.5*, *NRT2.1* في التحفيز على النمو الناجم عن البيكتيريا الجذرية *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 عند *Arabidopsis thaliana*.

ملخص

الأثار الإيجابية للبيكتيريا الجذرية الحرة المشار إليها باسم (Plant Growth-Promoting PGPR Rhizobacteria) على نمو وتغذية وصحة النباتات قد وصفت جيدا . ومع ذلك، فإن مسارات الإشارات المشاركة في هذه الاستجابات لا تزال غير واضحة. الهدف من البحث المقدم هو محاولة لتوضيح بعض الآليات الفسيولوجية والجزيئية المشاركة في استجابات النبات إلى PGPR . وأجريت جميع الدراسات على التفاعل بين نبات *Arabidopsis thaliana* و *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. هذا PGPR له تأثير ملحوظ على استتالة كل من الجذور الجانبية و جذور الشعر ، فضلا عن نمو النبات أظهر التعبير عن جينات أسرة نقل النترات *NRT2* افراط كبير في التعبير عن الجينات *NRT2.5* و *NRT2.6* في النباتات عند تلقيحها مع STM196 ولا يعرف وظيفة كل من منتجات الجينات *NRT2.5* و *NRT2.6* ومع ذلك ، البيانات النسخية المتراكمة في فريقنا تسلط الضوء على هاته الاثنتين من الجينات كمرشحين مهمين للاهتمام و الاستجابات الجزيئية في التفاعل مع STM196 لفهم تأثير البيكتيريا على النباتات، فمن الضروري دراسة العلاقة بين البيكتيريا و النترات. هذا الاخير يتم امتصاصه بواسطة النبات عن طريق الناقل الرئيسي *NRT2.1*، نهتم بدور *NRT2.1* في استجابة النبات للبيكتيريا وعلاقته الجينين المفترضة في نقل نترات *NRT2.5* و *NRT2.6* . للتحقق من دورها ومشاركتها في استجابة النبات للبيكتيريا ، بدنا دراستنا بثلاثة مسوخ أحادية التحول *nrt2.1* ، *nrt2.5* و *nrt2.6* وكلها في الخلفية الوراثية ل *Col-0* و لفهم ما إذا كان هناك تنظيم بين هذه الجينات قمنا بتوليد ثلاثة مسوخ مزدوجة التحول *nrt2.5xnrt2.6* ، *nrt2.1xnrt2.5* و *nrt2.1xnrt2.6* وهذا سمح لنا بتأكيد تورط الجينات *NRT2.5* و *NRT2.6* في تحفيز نمو النبات عن طريق البيكتيريا STM196 ، من جهة أخرى تبين لنا أن فقدان الوظائف *NRT2.1* ، *NRT2.5* و *NRT2.6* لها تأثير على نشاط اختزال النترات كما أنها تشارك في تنظيم الجين. *NRI* .

كلمات البحث

تفاعل النبات - الكائنات الحية الدقيقة، *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 ،
Arabidopsis thaliana ، ناقلات النترات، *NRT2.6*، *NRT2.5*، *NRT2.1*، نشاط اختزال النترات *NRI* ،
التعبير الجيني.

Sommaire

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1.1. DES BACTÉRIES BÉNÉFIQUES DES PLANTES : PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR).....	14
1.1.1. RHIZOSPHERE ET BACTÉRIES RHIZOSPHÉRIQUES BÉNÉFIQUES DES PLANTES	14
1.1.2. DIVERSITÉ DES PGPR	16
1.1.2.1. <i>Azospirillum</i>	16
1.1.2.2. <i>Bacillus</i>	17
1.1.2.3. <i>Pseudomonas</i>	18
1.1.2.4. <i>Rhizobium</i> et <i>Bradyrhizobium</i>	18
1.1.3. COLONISATION DES RACINES PAR LES PGPR.....	20
1.1.3.1. <i>Les mécanismes bactériens de colonisation racinaire</i>	21
1.1.3.2. <i>Utilisation des exsudats racinaires</i>	21
1.1.3.3. <i>Formation de biofilms</i>	22
1.1.4. MODE D'ACTION DES PGPR	22
1.1.4.1. <i>Implications des voies hormonales des plantes</i>	22
1.1.4.1.1. Auxine	23
1.1.4.1.2. Cytokinines.....	24
1.1.4.1.3. Gibbérellines.....	25
1.1.4.1.4. L'éthylène.....	26
1.1.4.2. <i>Effets des PGPR sur la nutrition des plantes</i>	27
1.1.4.2.1. Effets des PGPR sur la nutrition phosphatée.....	28
1.1.4.2.2. Effets des PGPR sur la nutrition azotée	29
1.1.4.2.3. Effets des PGPR sur la nutrition en fer	30
1.1.4.3. <i>Biocontrôle</i>	31
1.1.4.3.1. Production d'antibiotique et d'enzyme	31
1.1.4.3.2. Compétition	32
1.1.4.3.3. Résistance Systémique Induite (ISR).....	32
1.2. UTILISATION D'UN SYSTÈME MODÈLE POUR IDENTIFIER DES ÉLÉMENTS DE LA RÉPONSE DE LA PLANTE AUX PGPR	33
1.2.1. <i>PHYLOBACTERIUM</i> , UNE BACTÉRIE PRINCIPALEMENT TELLURIQUE DE LA FAMILLE DES <i>RHIZOBIACEAE</i>	33

1.2.1.1. <i>Phyllobacterium brassicacearum</i> STM196, une bactérie isolée de la rhizosphère du colza	34
1.2.1.2. Caractéristiques de <i>Phyllobacterium brassicacearum</i> STM196	35
1.3. REPONSES PHYSIOLOGIQUES D'ARABIDOPSIS A L'INOCULATION PAR UNE PGPR.....	38
1.4. NUTRITION AZOTEE DE LA PLANTE	44
1.4.1. GENERALITES SUR LA NUTRITION AZOTEE.....	44
1.4.2. L'ABSORPTION DE NITRATE	46
1.4.2.1. Aspects physiologiques de l'absorption de NO_3^-	46
1.4.2.2. Transporteurs de NO_3^-	48
1.4.3. ASSIMILATION DU NITRATE	50
CHAPITRE 2: EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE NITRATE EXTERIEURES SUR LA CROISSANCE DE LA PLANTE EN PRESENCE DE LA MUTATION <i>NRT2.1</i> ET DE LA PGPR <i>PHYLLOBACTERIUM BRASSICACEARUM</i> STM196.....	54
2.1. INTRODUCTION.....	55
2.2. RESULTATS.....	59
2.2.1. COURBE DE CROISSANCE DE <i>PHYLLOBACTERIUM BRASSICACEARUM</i> STM196.....	59
2.2.2. EFFET DE <i>PHYLLOBACTERIUM BRASSICACEARUM</i> STM196 SUR LA CROISSANCE D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> CULTIVE SUR TERREAU	60
2.2.3. EFFET DE STM196 SUR LA CROISSANCE D' <i>ARABIDOPSIS</i> SAUVAGE ET MUTANT <i>NRT2.1</i> CULTIVES <i>IN VITRO</i> AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE NO_3^-	61
2.2.4. EFFETS DE STM196 SUR L'ARCHITECTURE RACINAIRE DU SAUVAGE ET DU MUTANT <i>NRT2.1</i> SOUS DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE NITRATE	62
2.2.5. EFFET DE STM196 SUR L'ACCUMULATION DE NO_3^- DANS LES PLANTES SAUVAGES ET MUTANTES <i>NRT2.1</i>	63
2.3. DISCUSSION	64
CHAPITRE 3: NRT2.5 ET NRT2.6 SONT IMPLIQUES DANS LA STIMULATION DE CROISSANCE PAR STM196.....	70
PARTIE 1: CREATION DES DOUBLES MUTANTS <i>NRT2.5XNRT2.6</i>, <i>NRT2.1XNRT2.6</i> ET <i>NRT2.1XNRT2.5</i>.....	71
3.1. INTRODUCTION.....	72
3.2. CARACTERISATIONS MOLECULAIRE DES SIMPLES MUTANTS <i>NRT2.1</i>, <i>NRT2.5</i> ET <i>NRT2.6</i>	75
3.3. OBTENTION DES DIFFERENTES COMBINAISONS DE MUTANTS.....	79

PARTIE 2: THE *NRT2.5* AND *NRT2.6* GENES ARE INVOLVED IN GROWTH PROMOTION OF *ARABIDOPSIS* BY THE PGPR STRAIN *PHYLLOBACTERIUM BRASSICACEARUM* STM196 (NEW PHYTOLOGIST, 2013).....83

<i>Summary</i>	84
<i>Introduction</i>	85
<i>Materials and Methods</i>	87
Biological material.....	87
Generation of double mutant lines.....	87
Plant growth condition.....	88
Measurements of fresh weight and NO ₃ ⁻ accumulation.....	89
Root architecture analysis.....	89
Analysis of transcript levels by quantitative real time PCR.....	89
Statistical analysis.....	90
<i>Results</i>	90
<i>NRT2.5</i> and <i>NRT2.6</i> are required for growth promotion and lateral root response to STM196.....	90
<i>NRT2.1</i> is not involved in growth promotion and lateral root response to STM196.....	93
STM196 induces upregulation of <i>NRT2.5</i> and <i>NRT2.6</i> expression independently to mutations in each other or in <i>NRT2.1</i>	94
Nitrate-reductase mutation does not trigger a change in <i>NRT2.5</i> and <i>NRT2.6</i> expression levels.....	95
<i>Discussion</i>	96

CHAPITRE 4: ETUDE DES REGULATIONS ENTRE LES GENES DE TRANSPORTEUR DE NITRATE *NRT2.1*, *NRT2.5*, *NRT2.6* ET LA NITRATE REDUCTASE *NR2* EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE STM196.....106

4.1. INTRODUCTION.....107

4.2. RESULTATS.....109

4.2.1. EFFET DE STM196 SUR LA CROISSANCE ET L'ACCUMULATION DE NITRATE CHEZ LE MUTANT G5..... 109

4.2.2. EFFET DE STM196 SUR L'ARCHITECTURE RACINAIRE CHEZ LE MUTANT G5..... 112

4.2.3. EFFET DE STM196 ET DES MUTATIONS *NRT2.1*, *NRT2.5* ET *NRT2.6* SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE..... 113

4.2.4. EFFET DE STM196 SUR L'EXPRESSION DES GENES DE LA FAMILLE *NRT2*..... 113

4.2.5. EFFET DE STM196 SUR L'EXPRESSION DES GENES *NR1*, *NR2* ET *NIR*..... 115

4.3. DISCUSSION.....116

CHAPITRE 5: EFFET DE STM196 SUR LA STIMULATION DE L'ELONGATION DES POILS RACINAIRES AINSI QUE SUR LE NIVEAU DES TRANSCRITS DE ZAT10, NAC42 ET WRKY46 EN PRESENCE DES MUTATIONS *NRT2.1*, *NRT2.5*, *NRT2.6* ET *NR2*.....122

5.1. INTRODUCTION.....	123
5.2. RESULTATS.....	126
5.2.1. EFFET DE STM196 SUR L'ELONGATION DES POILS RACINAIRES CHEZ DES MUTANTES PERTES DE FONCTION DANS <i>NRT2.1</i> , <i>NRT2.5</i> , <i>NRT2.6</i> OU <i>NR2</i>	126
5.2.2. EFFET DE STM196 SUR L'EXPRESSION DES GENES <i>ZAT10</i> , <i>NAC42</i> ET <i>WRKY46</i> CHEZ DES MUTANTS PERTES DE FONCTION DANS <i>NRT2.1</i> , <i>NRT2.5</i> , <i>NRT2.6</i> OU <i>NR2</i>	127
5.3. DISCUSSION	128
CHAPITRE 6: MATERIEL ET METHODES.....	132
6.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	133
6.2. PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE.....	133
6.3. CONDITION DE CULTURE	134
6.3.1. <i>PHYLOBACTERIUM BRASSICACEARUM</i> STM196.....	134
6.3.2. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	134
6.4. ANALYSE PHYSIOLOGIQUE	135
6.4.1. MESURE DE L'ACCUMULATION DU NITRATE	135
6.4.2. ARCHITECTURE RACINAIRE	135
6.4.3. POILS RACINAIRE	136
6.4.4. MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE	136
6.4.5. DOSAGE D'ETHYLENE	138
6.5. ANALYSE GENOMIQUE	138
6.5.1. EXTRACTION D'ADN.....	138
6.5.2. PCR.....	139
6.5.3. EXTRACTION D'ARN TOTAUX.....	140
6.5.4. SYNTHÈSE DE CDNA	140
6.5.5. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	140
CONCLUSION GENERALE.....	142
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	149

Liste des figures

Figure 1.1. Degré de l'association entre les racines des plantes et les bactéries.	P20
Figure 1.2. Cycle d'azote.	P44
Figure 1.3. Les deux systèmes d'absorption de nitrate chez <i>Arabidopsis</i> .	P48
Figure 1.4. Arbre phylogénique de la famille des transporteurs de nitrate NRT2.	P49
Figure 1.5. Comparaison des différentes séquences en acides aminés des 7 protéines de la famille NRT2 d' <i>Arabidopsis</i> .	P49
Figure 1.6. Implication des différents transporteurs de nitrate dans les mouvements de l'ion dans la plante <i>Arabidopsis thaliana</i> .	P50
Figure 1.7. Assimilation du nitrate dans une cellule végétale.	P51
Figure 2.1. Courbe de croissance de <i>Phyllobacterium brassicacearum</i> STM196 en culture liquide.	P59
Figure 2.2. L'effet de STM196 sur la croissance de la plante en terreau dépend de la disponibilité en éléments minéraux majeurs.	P60
Figure 2.3. L'effet stimulateur de croissance de STM196 dépend de la concentration extérieure de nitrate.	P61
Figure 2.4. La concentration extérieure de nitrate n'affecte pas la croissance de la racine primaire.	P62
Figure 2.5. STM196 stimule l'allongement des racines latérales et réprime l'effet inhibiteur de la mutation <i>nrt2.1</i> .	P63
Figure 2.6. Le nombre des racines latérales est affecté par la mutation <i>nrt2.1</i> .	P63
Figure 2.7. La mutation <i>nrt2.1</i> inhibe l'accumulation de nitrate sauf aux concentrations extérieures très élevées.	P64
Figure 3.1. PCR inverse.	P74
Figure 3.2. Carte génétique du mutant <i>nrt2.1</i> avec les différentes amorces utilisées.	P75
Figure 3.3. Absence des transcrits <i>NRT2.1</i> chez le mutant <i>nrt2.1</i> .	P76
Figure 3.4. Carte génétique du mutant <i>nrt2.5</i> avec les différentes amorces utilisées.	P76
Figure 3.5. Absence des transcrits <i>NRT2.5</i> chez le mutant <i>nrt2.5</i> .	P77
Figure 3.6. Carte génétique du mutant <i>nrt2.6</i> avec les différentes amorces utilisées.	P77
Figure 3.7. Différence dans le niveau d'expression du gène <i>NRT2.6</i> entre le	

mutant <i>nrt2.6</i> et le sauvage Col-0.	P78
Figure 3.8. Différents résultats de PCR semi quantitative avec différents couples d'amorces du gène <i>NRT2.6</i> .	P78
Figure 3.9. Position des gènes <i>NRT2.1</i> , <i>NRT2.5</i> et <i>NRT2.6</i> (Tair).	P79
Figure 3.10. Analyses effectuées après croisement pour l'identification du double mutant <i>nrt2.5xnrt2.6</i> .	P79
Figure 3.11. Analyses effectuées après croisement pour l'identification du double mutant <i>nrt2.1xnrt2.6</i> .	P80
Figure 3.12. Différentes étapes réalisées pour l'obtention du double mutant <i>nrt2.1xnrt2.5</i> .	P81
Figure 1. The growth promotion and nitrate accumulation in roots triggered by STM196 are impaired in <i>nrt2.5</i> , <i>nrt2.6</i> and <i>nrt2.5xnrt2.6</i> mutant plants.	P91
Figure 2. The <i>nrt2.5</i> , <i>nrt2.6</i> and <i>nrt2.5xnrt2.6</i> mutant plants' root architecture response to STM196 is impaired.	P92
Figure 3. The pattern of lateral root development in response to STM196 inoculation is affected in <i>nrt2.5</i> , <i>nrt2.6</i> and <i>nrt2.5xnrt2.6</i> mutant plants.	P93
Figure 4. The effect of the <i>nrt2.1</i> mutation on the plant fresh weight and nitrate content is epistatic to the <i>nrt2.5</i> and <i>nrt2.6</i> mutations under both control and treated conditions.	P94
Figure 5. The expression of <i>NRT2.5</i> and <i>NRT2.6</i> was induced by STM196 in all the mutant lines analysed, while <i>NRT2.1</i> transcript accumulation remained unchanged.	P95
Figure 6. The nitrate reductase NR2 is important for plant growth and growth promotion through STM196.	P96
Figure S1. DAB staining of <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 wild-type or <i>nrt2.5xnrt2.6</i> mutant plantlets inoculated (I) or not (NI) with <i>Phyllobacterium brassicacearum</i> STM196.	P97
Figure S2. The effect of the <i>nrt2.1</i> mutation on root architecture under control and treated conditions is epistatic to the <i>nrt2.5</i> and <i>nrt2.6</i> mutations.	P98
Figure S3. The <i>nr2</i> mutation did not significantly affect the accumulation of <i>NRT2</i> family transcripts.	P99
Figure 4.1. L'activité nitrate réductase est fortement affectée par la mutation <i>nr2</i> .	P109
Figure 4.2. La mutation <i>nr2</i> induit l'expression de <i>NR1</i> tandis que STM196 l'inhibe.	P109
Figure 4.3. Rapport des biomasses (poids de matière fraîche) Racines/Feuilles chez le sauvage Col-0 et le mutant G5.	P110

- Figure 4.4.** Corrélations entre poids frais et concentrations endogènes de NO_3^- . **P111**
- Figure 4.5.** La mutation *nr2* ralentit légèrement le développement racinaire mais n'affecte pas l'effet de STM196 sur les racines. **P112**
- Figure 4.6.** Pourcentage de nombre de différentes longueurs de racines latérales chez le mutant G5. **P112**
- Figure 4.7.** La perte de fonction *nrt2.1* affecte fortement l'activité nitrate réductase. **P113**
- Figure 4.8.** L'activité nitrate réductase est légèrement affectée par les mutations *nrt2.5* et *nrt2.6*. **P113**
- Figure 4.9.** Etude de l'expression des gènes *NRT2.2*, *NRT2.3*, *NRT2.4* et *NRT2.7* dans des plantes sauvages ou mutées dans les autres gènes de la famille, *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6*. **P114**
- Figure 4.10.** Effet des mutations pertes de fonction *nrt2.1*, *nrt2.5* et *nrt2.6* (simples mutants et doubles mutants) sur l'expression des gènes impliqués dans la réduction de NO_3^- (*NRI*, *NR2*, *NIR*). **P115**
- Figure 5.1.** Effet de STM196 sur la longueur des poils racinaires des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans les gènes *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6*. **P126**
- Figure 5.2.** Effet de STM196 sur la longueur des poils racinaires d'un mutant perte de fonction dans la nitrate réductase NR2. **P127**
- Figure 5.3.** Expression des gènes *ZAT10*, *NAC42* et *WRKY46* chez les mutants d'*Arabidopsis* affectés dans les gènes *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6*, inoculés ou non avec STM196. **P128**
- Figure 5.4.** Expression des gènes *ZAT10*, *NAC42* et *WRKY46* chez un mutant perte de fonction dans la nitrate réductase NR2. **P129**
- Figure 5.5.** La mutation *nrt2.1* augmente l'émission d'éthylène. **P130**

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Principales espèces de <i>Phyllobacterium</i> .	P34
Tableau 1.2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques de <i>Phyllobacterium brassicacearum</i> STM196.	P37
Tableau 3.1. Résultats de la F2 du croisement entre <i>nrt2.5</i> et <i>nrt2.6</i> .	P80
Tableau 3.2. Résultats de la F2 du croisement entre <i>nrt2.1</i> et <i>nrt2.6</i> .	P80
Tableau 3.3. Résultats de la F2 du croisement entre <i>nrt2.1</i> et <i>nrt2.5</i> .	P81
Tableau 6.1. Liste des paires d'amorces utilisées pour la PCR semi quantitative.	P139
Tableau 6.2. Liste des paires d'amorces utilisées en PCR quantitative.	P141

Introduction

Les plantes ont développé un système racinaire qui, en plus d'assurer leur ancrage dans le sol, sert à les alimenter en absorbant l'eau et les nutriments nécessaires à leur nutrition. La surface de la racine et l'apoplasme de son épiderme et de son cortex constituent ainsi l'interface qui sépare la plante des différents facteurs biotiques et abiotiques du sol (Smith & De Smet, 2012). Les racines sont capables de surmonter les conditions difficiles imposées par l'environnement grâce à une grande plasticité : la capacité à changer son architecture racinaire pour s'adapter aux différents types d'environnements et à différentes conditions de nutrition dans le sol est documentée pour de nombreuses plantes (Smith & De Smet, 2012). L'architecture racinaire varie aussi avec l'espèce, la variété, voire le génotype (Lynch, 1995). Le système racinaire communique avec les feuilles via le xylème, et les feuilles envoient des signaux chimiques vers les racines via le phloème ou par communications intercellulaires (Nibau *et al.*, 2008). Chez les dicotylédones, le système racinaire est constitué de la racine primaire (RP) et de racines latérales (RL) de second, troisièmes, ... ordre qui émergent de la RP ou des racines d'ordre inférieur. De plus, l'épiderme de la racine développe des poils racinaires ou poils absorbants qui accroissent encore la surface d'échange avec le milieu environnant. Tous les besoins nutritionnels de la plante, sauf en carbone, passent par le système racinaire qui absorbe les éléments minéraux dissous dans la solution du sol grâce à différents types de transporteurs et canaux de la membrane plasmique de l'épiderme et du cortex racinaires. D'un autre côté, la racine libère différents composés organiques qui constituent les exsudats racinaires ; ces composés organiques peuvent servir de signaux qui participent directement ou indirectement dans des voies de régulation de la plante, d'une part, et dans le chimiotactisme et la nutrition de microorganismes qui colonisent la rhizosphère. Ces microorganismes peuvent être bénéfiques (symbiotiques au sens large) ou pathogènes.

L'azote est l'un des principaux facteurs limitant de la croissance des plantes, et donc du rendement des plantes cultivées. Très abondant dans les tissus des végétaux, il est présent sous forme minérale (ions NO_3^- et, dans une moindre mesure, NH_4^+) et surtout organique (acides aminés, protéines, acides nucléiques, chlorophylle, métabolites secondaires, etc.). La plupart des plantes, prélève l'azote dans le sol sous forme d'ions nitrates. Ceux-ci sont transportés à travers la membrane plasmique des cellules racinaires, puis dans la plante, grâce à des transporteurs spécifiques. Au moins deux familles de transporteurs de nitrate ont été identifiées chez les végétaux, NRT1 et NRT2.

Dans un objectif de simplification, l'étude des mécanismes de la nutrition des plantes a longtemps été conduite en l'absence d'interactions microbiennes. Or dans leur biotope, les plantes vivent en interaction étroite avec des microorganismes du sol qui colonisent leur rhizosphère. Parmi ceux-ci, on trouve des bactéries bénéfiques à la plante, dénommées PGPR pour Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Une bactérie de ce type, isolée de la rhizosphère du colza, *Phyllobacterium brassicasearum* STM196, modifie la croissance de la plante et en particulier son architecture racinaire. Ce type d'interaction est susceptible de modifier de manière complexe la nutrition de la plante et la perception de la disponibilité en ions par les racines.

Afin d'étudier l'effet de la bactérie sur la plante, et en particulier son métabolisme azoté, nous utilisons *Arabidopsis thaliana*, plante modèle de la même famille que le colza. L'inoculation de la plante avec STM196 induit une augmentation de sa teneur en azote (Mantelin *et al.*, 2006a) bien que la bactérie ne soit pas capable de lui fournir de l'ammonium (absence de fixation d'azote atmosphérique, faible réduction du nitrate ; Thèse Contesto 2007). Curieusement, cette augmentation de la teneur en azote s'accompagne de modifications de l'architecture racinaire (augmentation de l'allongement des racines latérales) qui sont opposées à l'effet d'une teneur élevée en azote dans la plante. Ceci suggère que la bactérie STM196 interfère avec les voies de signalisation de la perception de l'azote pour découpler le développement racinaire du contrôle normalement exercé par le statut azoté.

L'élucidation du mécanisme de cette interférence s'avère stratégique pour comprendre comment une plante fonctionne dans un environnement naturel, c'est-à-dire en présence de bactéries rhizosphériques. Au niveau moléculaire, l'inoculation de plantules d'*Arabidopsis* par STM196 se traduit par une accumulation importante des transcrits des gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* (Mantelin *et al.*, 2006a). Ces derniers appartiennent à la famille *NRT2* de gènes codant transporteurs de nitrate. Bien que le rôle de *NRT2.5* et *NRT2.6* dans le transport de nitrate ne soit pas établi *in planta*, leur régulation transcriptionnelle par la bactérie les désignent comme candidats pour un rôle dans l'interaction *Arabidopsis*-STM196 et peut-être dans ce mécanisme d'interférence avec la régulation de l'architecture racinaire par le statut azoté.

Pour tester cette hypothèse, nous avons élaboré une stratégie de biologie fonctionnelle reposant sur l'utilisation de milieux de compositions en nitrate différentes et

qui contiennent ou non des bactéries. Sur ces milieux, nous avons cultivé des plantules d'*Arabidopsis* de différents génotypes. Certains portant une mutation perte de fonction (*Knock out* ou *ko*) dans le gène *NRT2.5*, *NRT2.6* ou *NRT2.1*. Ce dernier code pour le transporteur majoritaire de nitrate chez *Arabidopsis*. Nous incluons également dans cette série d'expérience des génotypes combinants deux mutations (*nrt2.5xnrt2.6*, *nrt2.1xnrt2.5* et *nrt2.1xnrt2.6*). Pour chacun de ces génotypes et pour chacune des conditions de culture, nous avons mesuré les modifications d'architecture racinaire et les teneurs en nitrate des racines et des parties aériennes.

Les résultats obtenus montrent que les produits des gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* contribuent à la stimulation de croissance induite par la PGPR STM196 chez *Arabidopsis*. Cet effet se manifeste par une augmentation de la biomasse des feuilles et des racines, ainsi que par une augmentation dans l'accumulation de nitrate dans les racines.

Dans la synthèse bibliographique présentée au Chapitre 1, nous décrivons d'abord les PGPR avec leurs différents modes d'action, impliqués directement ou indirectement dans la stimulation de la croissance de la plante, puis nous caractérisons plus spécifiquement la PGPR utilisée dans notre étude, *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 ; ensuite, nous présentons les connaissances disponibles sur les réponses physiologiques de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* à l'inoculation par des PGPR, puis nous rappelons les grandes traits de la nutrition azotée chez les plantes.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

1.1. Des bactéries bénéfiques des plantes : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)

1.1.1. Rhizosphère et bactéries rhizosphériques bénéfiques des plantes

L'activité biologique de la racine modifie fortement les propriétés physiques et chimiques du sol qui l'entoure : en pénétrant dans le sol, elle exerce un effet mécanique; elle induit en général une acidification de son environnement par l'activité H⁺-ATPase de ses cellules épidermiques et corticales; elle libère des exsudats riches en composés organiques dont des glucides, des acides organiques, des acides aminés, des vitamines, des métabolites secondaires, un mucilage et des protéines. L'exsudation racinaire est un phénomène quantitativement très important, puisque certains auteurs comme Bottner *et al.* (1999) et Buchenauer (1998) estiment que 20 à 50% des composés produits par la photosynthèse peuvent être déposés dans une zone entourant la racine. Cette richesse en nutriments est favorable à la colonisation de cette zone par des microorganismes dont l'activité, à son tour, modifie la composition chimique. Cette zone active du sol qui se crée autour de la racine est appelée rhizosphère (Hiltner, 1904). Elle est colonisée par une microflore abondante dont la composition est affectée par l'activité de la racine. Les microorganismes rhizosphériques peuvent être classés selon leur effet sur la plante et leur façon d'interagir avec les racines: certains sont pathogènes tandis que d'autres ont des effets bénéfiques pour la plante. Les bactéries colonisant la rhizosphère et ayant une action bénéfique sur les plantes, qui se traduit par une stimulation de leur croissance, sont appelées Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1980).

La dénomination PGPR recouvre un ensemble très hétérogène de bactéries qui peuvent être présentes dans la rhizosphère. Certaines souches colonisent seulement la surface des racines –appelé rhizoplan– tandis que d'autres pénètrent dans la racine (endophytes) (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Parmi ces dernières, certaines réalisent même une symbiose étroite avec leur plante hôte induisant la formation d'un

nouvel organe, la nodosité (Oldroyd & Downie, 2008). Il existe une forte spécificité d'hôte pour établir cette symbiose où la bactérie fait bénéficier la plante d'une fonction physiologique nouvelle, la fixation de N₂. La plus répandue de ces symbioses fixatrices d'azote est celle qui s'établit entre les bactéries du genre *Rhizobium* et de genres voisins (*Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*,...) d'une part, et les racines de plantes de la famille des légumineuses d'autre part. Ces interactions étroites avec formation d'un organe spécialisé ne sont en général pas considérées dans le champ des interactions plante-PGPR et nous les excluons de notre présentation. Dans la suite, nous restreindrons l'appellation PGPR aux bactéries bénéfiques des plantes colonisant la rhizosphère, qu'elles se développent dans le seul rhizoplan ou qu'elles soient endophytes en restant localisées dans les espaces intercellulaires, qui ne montrent pas de spécificité d'hôte marquée et qui n'induisent pas la formation d'un nouvel organe.

La capacité des PGPR à stimuler la croissance des plantes a été retrouvée chez plusieurs espèces de bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* et *Serratia* (Kloepper *et al.*, 1989; Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Glick, 1995). L'utilisation de ces PGPR offre un moyen attractif pour remplacer les intrants en agriculture, engrais et pesticides. Plusieurs essais d'inoculation des plantes agricoles avec les PGPR ont été effectués, que se soit en champ ou en serre, confirmant l'intérêt de l'utilisation des PGPR. Okon & Labandera-Gonzalez (1994) en étudiant les données de 20 ans de travaux au niveau mondial sur l'inoculation de graminées avec des souches d'*Azospirillum* sp. dans différents sols et différentes conditions environnementales, ont conclu que ces bactéries sont capables d'augmenter la récolte de blé de 15 à 30% et celle de maïs de 15 à 25%. Chez le maïs, *Azospirillum* sp. a la capacité de relever la teneur en magnésium (Hernandez *et al.*, 1997), ainsi que la teneur en azote dans les feuilles et dans les racines (Ribauda *et al.*, 2001). De même, les souches de *Bacillus polymyxa* ont un effet stimulateur sur les teneurs en N et P (Çakmakçı *et al.*, 2001). Les travaux de McCullagh *et al.* (1996) sur le concombre inoculé avec les souches de *Pseudomonas fluorescens* ont montré que celles-ci induisent une augmentation de 12% du nombre de fruits. Dans une autre étude sur le tournesol, la PGPR *Xanthomonas maltophila* a augmenté le poids frais des plantules de tournesol après 6 jours de germination (Fages & Arsac, 1991). Santoro *et al.* (2011) ont observé une augmentation de la production des huiles essentielles chez les plantes de menthe poivrée exposées aux composés organiques volatils (VOCs) émis par

P. fluorescens et *A. brasilense* en comparaison avec celles non exposées.

Un autre effet reconnu des PGPR est d'induire une meilleure résistance contre des agents pathogènes (Van Loon *et al.*, 1998). Ainsi, l'inoculation du blé avec des souches de *Pseudomonas cepacia*, *fluorescens* et *putida* induit une résistance contre les pathogènes *Rhizoctonia solani* et *Leptosphaera maculans* (de Freitas & Germida, 1990).

1.1.2. Diversité des PGPR

Le nombre des souches bactériennes à effet stimulateur de croissance identifiées ne cesse d'augmenter grâce aux recherches effectuées dans le domaine de la taxonomie des bactéries rhizosphériques (Vessey, 2003; Lucy *et al.*, 2004). Ces bactéries n'appartiennent pas à un genre ou à un groupe bactérien spécifique, et elles peuvent être des bactéries Gram positif ou Gram négatif (Abbass & Okon, 1993).

Pour illustrer cette diversité bactérienne parmi les PGPR, nous donnons ci-dessous des exemples pris chez les principaux genres bactériens connus pour leur effet stimulateur de la croissance des plantes.

1.1.2.1. *Azospirillum*

Les bactéries du genre *Azospirillum* sont des α -protéobactéries Gram négatives. Plusieurs espèces ont été rapportées comme PGPR (e.g *A. brasilense*, *A. lipoferum*). Plusieurs souches de ces espèces (*brasilense* Sp245, Sp7, Cd et *lipoferum* 4b, CRT1) ont été isolées de la rhizosphère de céréales (canne à sucre, maïs, blé). Le génome d'un certain nombre de ces souches a été séquencé (*A. brasilense* Sp245 et *A. lipoferum* 4B). La plupart de ces souches ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes (Jacoud *et al.*, 1998). La plupart des souches d'*Azospirillum* colonisent la rhizosphère, certaines souches seulement pouvant pénétrer dans la racine, et donc être endophytes (Schloter & Hartmann, 1998).

Azospirillum brasilense est la première espèce caractérisée comme PGPR ; elle a donc longtemps servi de modèle (Bashan *et al.*, 2004). Elle est d'ailleurs déjà utilisée en application agronomique pour les grandes cultures dans le cadre de programmes visant à augmenter la production végétale et le rendement (Bashan *et al.*, 2004).

Cette bactérie appartient au groupe des bactéries diazotrophes qui ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique, N_2 , pour former de l'ammonium, forme d'azote assimilable par la plante. Il existe d'autres bactéries diazotrophes à effet PGPR. On en trouve parmi les genres : *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Rhizobium* (Vessey, 2003).

1.1.2.2. *Bacillus*

Bacillus est le genre microbien le plus abondant dans la rhizosphère. Un certain nombre de *Bacillus* a été caractérisé comme PGPR (Probanza *et al.*, 2002; Barriuso *et al.*, 2008). Une étude réalisée sur la diversité du genre *Bacillus* dans un sol situé à Bennekom au Pays-Bas illustre cette richesse en *Bacillus*. Il s'agit d'un sol riche en matière organique (2,5%), au pH légèrement acide, utilisé pour des prairies pendant environ 50 ans puis, dans les 20 dernières années, pour des grandes cultures en rotation (avoine, maïs, orge et pomme de terre). Dans les échantillons de rhizosphère prélevés sur ces champs, Garbeva *et al.* (2003) ont montré que 95% des bactéries Gram positif présentes sont des *Bacillus*, les 5% restant étant essentiellement des bactéries des genres *Arthrobacter* et *Frankia*. Les *Bacillus* sont des bactéries Gram plus. Elles sont capables de former des endospores ce qui leur permet de vivre pendant une longue période sous diverses conditions environnementales (Wipat & Harwood, 1999). Ces bactéries formant des spores peuvent être identifiées à tort comme endophytes, surtout si les méthodes utilisées pour identifier leur mode de colonisation sont basées sur la désinfection de la surface des racines (Bent & Chanway, 2002).

Les souches GB03 de l'espèce *B. subtilis*, CJ-69 de l'espèce *B. pumilis*, RC19 de l'espèce *B. simplex* et UMCV1 de l'espèce *B. megaterium* ont été isolées pour leur capacité de stimulation de la croissance des plantes. Ces bactéries présentent plusieurs activités caractéristiques des PGPR. Certaines souches de *Bacillus* sont diazotrophes, comme l'espèce *B. cereus* (souche MJ-1) (Wipat & Harwood, 1999). Cette dernière stimulerait davantage la résistance aux attaques par des pathogènes que la croissance de la plante, tandis que d'autres espèces amélioreraient la nutrition de la plante en augmentant la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère (Barriuso *et al.*, 2008). Certaines souches comme *B. pumilis* 8N-4 peuvent être utilisées comme biofertilisant permettant l'augmentation de la récolte de blé (Hafeez *et al.*, 2006).

1.1.2.3. *Pseudomonas*

Ces bactéries représentent le genre le plus abondant dans la rhizosphère parmi les bactéries Gram négatif (Patten & Glick, 2002). La diversité écologique de ce genre est très importante : plusieurs espèces ont été isolées d'un grand nombre de plantes, dans différents sols et toutes les régions du monde. Les souches de *Pseudomonas* ont montré une forte polyvalence dans leurs capacités métaboliques. Antibiotiques, sidérophores ou hydrocyanides sont les principaux métabolites libérés par ses souches (Charest *et al.*, 2005). Ces substances affectent favorablement l'environnement des plantes : d'une part, elles inhibent la croissance de microorganismes nuisibles et, d'autre part, elles augmentent la disponibilité des nutriments pour la plante (Barriuso *et al.*, 2008). Plusieurs espèces de ce genre bactérien sont capables de solubiliser le phosphate organique comme inorganique (Chabot *et al.*, 1993; Rodríguez & Fraga, 1999).

Les premières observations des effets bénéfiques de *Pseudomonas* sur des plantes ont été réalisées sur des semences ou des parties de semences de pommes de terre traitées avec des cultures de *P. fluorescens* et *P. putida* (Burr *et al.*, 1978). Le rendement obtenu a augmenté de 14 à 33% par l'inoculum bactérien. Dans d'autres travaux, des souches de *P. putida* ont augmenté significativement le poids de plantes de maïs et de laitue (Chabot *et al.*, 1993) ainsi que la croissance du système racinaire de colza (Patten & Glick, 2002). Dans ces études, plusieurs activités bactériennes ont été mises en parallèle avec cet effet stimulateur de croissance : la production de phytases qui permettent de libérer 81% du phosphore de l'inositol hexaphosphate (Chabot *et al.*, 1993), la production d'hormones végétale telle que l'auxine (Patten & Glick, 2002) et les cytokinines (Garcia de salamone, 2000).

1.1.2.4. *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*

Parmi les souches à effet PGPR les plus décrites, on trouve enfin les α -protéobactéries Gram négatives appartenant aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Ces bactéries sont connues pour induire la formation d'un nouvel organe spécifique à la symbiose –la nodosité– avec des plantes de la famille des légumineuses (Oldroyd & Downie, 2008). Il existe un fort degré de spécificité entre l'espèce de *Rhizobium* et l'espèce de légumineuse capables de former une symbiose fixatrice d'azote. Les nodosités

sont formées de cellules colonisées par un grand nombre de cellules de *Rhizobium*. Les bactéries différenciées en bactéroïdes sont enfermées dans des vésicules, formant un organite fonctionnel, le symbiosome (Oldroyd & Downie, 2008). Comme nous l'avons précisé dans le paragraphe 1.1, nous avons choisi d'exclure ces symbioses fixatrices d'azote conduisant à la formation d'un nouvel organe du champ des PGPR.

Les *Rhizobium* et les bactéries de genres voisins peuvent également stimuler la croissance de plantes d'autres familles que les légumineuses sans former de nodosité. Elles se comportent donc aussi comme des PGPR au sens où nous l'entendons ici. Dans ce cas, les bactéries peuvent être endophytes (Antoun & Prévost, 2005) ou rester localisées dans la rhizosphère. Parmi les *Rhizobium* endophytes trouvées en association avec des non légumineuses, on peut citer *Bradyrhizobium japonicum* isolée des racines de coton (McInroy & Kloepper, 1995), *Rhizobium giardinii* isolée de celles de maïs doux (Reiter *et al.*, 2002) et *Sinorhizobium meliloti* isolée de celles de pomme de terre (Sturz *et al.*, 1999). D'autre part, les travaux de Chaintreuil *et al.* (2000) ont également montré que la souche de *Bradyrhizobium sp* photosynthétique ORS278 est une bactérie endophyte des racines du riz sauvage africain (*Oryza breviligulata*). Enfin, la souche STM196 de *Phyllobacterium brassicacearum*, α -proteobactérie phylogénétiquement proche des *Rhizobium*, a été isolée de racines de colza (Bertrand *et al.*, 2001; Mantelin *et al.*, 2006b).

Plusieurs expérimentations ont démontré la capacité des *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* à stimuler la croissance de non légumineuses. L'inoculation du blé avec les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* isolées à partir de la rhizosphère de plantes de blé cultivées au Maroc permet d'augmenter le poids sec des feuilles de 16 à 19% et le rendement en grains de 23 à 25% (Hilali *et al.*, 2001). De la même manière, Chabot *et al.* (1996) ont observé une stimulation de la croissance de maïs inoculé avec des souches de *R. leguminosarum* bv *phaseoli*. Il est intéressant de noter que les *Rhizobium* peuvent aussi être utilisés comme un moyen de contrôle biologique contre plusieurs agents pathogènes des plantes (Antoun & Prévost, 2005).

L'effet bénéfique des *Rhizobium* sur la croissance des plantes pourrait résulter de la production de phytohormones, des sidérophores et/ou d'hydrocyanures mais aussi de la solubilisation du phosphate organique ou inorganique (Antoun *et al.*, 1998) et, enfin, de la stimulation des défenses des plantes. Le modèle d'interaction entre une non légumineuse et une bactérie proche des *Rhizobium* le plus travaillé à ce jour est l'interaction entre la

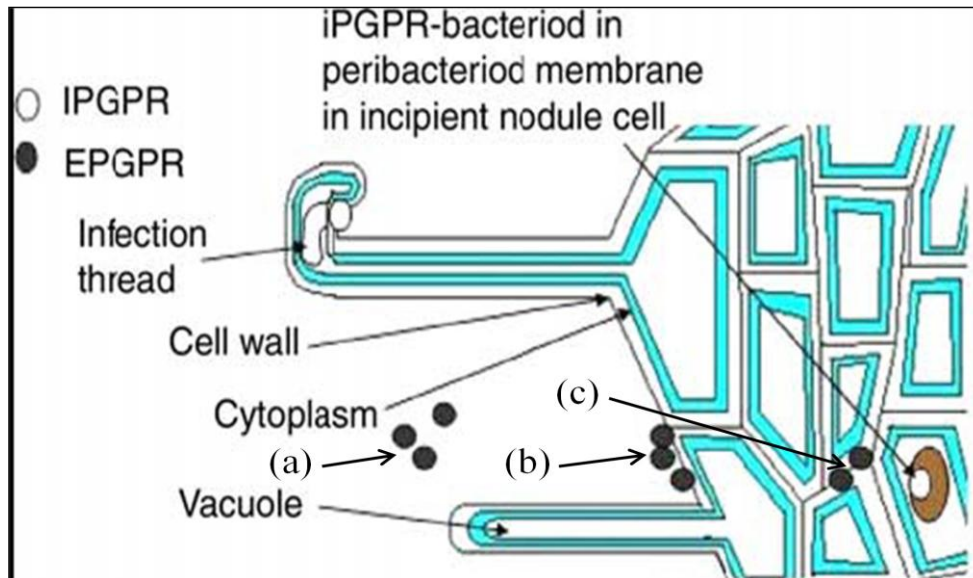


Figure 1.1. Degré de l'association entre les racines des plantes et les bactéries. (a) : ePGPR se développant autour des racines, (b) : ePGPR vivant à la surface des racines, (c) : ePGPR vivant entre les cellules racinaires (Gray & Smith, 2005).

souche bactérienne *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 isolée de la racine de colza et la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Desbrosses *et al.*, 2012). Ce modèle, utilisé dans notre étude expérimentale, est présenté plus en détail dans le paragraphe 2.

1.1.3. Colonisation des racines par les PGPR

La colonisation des racines par des bactéries du sol est un phénomène très complexe qui implique plusieurs étapes et qui est influencé par différents paramètres biotiques et abiotiques (Benizri *et al.*, 2001). La réussite de la colonisation des racines par les PGPR est un critère essentiel pour qu'elles puissent exercer leurs effets bénéfiques sur la croissance de la plante (Podile & Kishore, 2006). L'association des bactéries avec les racines des plantes se fait sur 2 modes distincts. On distingue les PGPR à colonisation intracellulaires, appelées iPGPR par Gray & Smith (2005), bactéries endophytes et les PGPR à colonisation extracellulaires, appelées ePGPR par Gray & Smith (2005). Dans les iPGPR, on peut citer des souches d'*Azospirillum* (Sp245, B510) et des *Rhizobium*, avec un endophytisme très différent puisque les *Rhizobium* sont contenues dans un organite, le symbiosome, tandis que les cellules d'*Azospirillum* envahissent le cytoplasme des cellules infectées (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001). Parmi les ePGPR, on trouve par exemple des *Bacillus* et des *Pseudomonas* (Vessey, 2003), mais aussi des *Rhizobium* chez les non-légumineuses et *Phyllobacterium*. Au sein d'un même genre, on trouve à la fois des bactéries endophytes et des bactéries rhizosphériques (e.g. *Azospirillum*). Il n'existe donc pas de séparation nette entre le mode de colonisation et le genre bactérien. L'existence de modes de colonisation différents, y compris au sein d'un même genre, suggère qu'il existe plusieurs mécanismes différents d'interaction avec les plantes. Ces mécanismes peuvent reposer sur l'existence de gènes bactériens spécifiques ou peuvent reposer sur l'existence de gènes de plante spécifique.

Les ePGPR peuvent être subdivisées en trois types selon le degré de leur association avec les racines des plantes (Figure 1.1, Gray & Smith, 2005) : les bactéries qui vivent autour des racines mais qui ne sont pas en contact direct avec elles ; les bactéries capables de coloniser la surface extérieure des racines et enfin, celles qui vivent dans l'espace intercellulaire dans le cortex racinaire (Gray & Smith, 2005).

1.1.3.1. Les mécanismes bactériens de colonisation racinaire

Des petites protéines bactériennes sont les déterminants majeurs de la colonisation des racines par les PGPR (Lugtenberg *et al.*, 2001). La reconnaissance plante-bactérie implique des interactions physiques entre molécules bactériennes (adhésines, fimbriae, les systèmes de sécrétion type III et IV, les flagelles, les pili, les LPS et les exopolysaccharides) et molécules de la plante. Ce type d'interaction a été bien étudié chez *Azospirillum* et *Pseudomonas* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Si on prend l'exemple de l'attachement d'*Azospirillum brasilense* sur les cellules des racines du blé, cette colonisation peut se faire selon deux modes (Michiels *et al.*, 1991). Le premier mode, réversible, implique des protéines de la surface bactérienne (CPSs et flagelles) tandis que le second mode, irréversible, est contrôlé par les polysaccharides de la surface bactérienne. La majorité des protéines extérieures de la membrane de *A. brasilense* manifestent une forte affinité aux racines des céréales, ce qui explique la forte association de ces bactéries à la rhizosphère des plantes de cette famille (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

Le dialogue entre la bactérie et la plante peut impliquer des petites molécules signal produites par les bactéries (Lugtenberg *et al.*, 2002). Parmi ces molécules de Quorum Sensing (QS), la mieux caractérisée est le lactone N-acyl-hémosérine (AHL) qui s'accumule autour de la bactérie jusqu'à atteindre un seuil à partir duquel elle se lie à son récepteur pour déclencher un signal. Plusieurs travaux suggèrent que les premières phases d'interaction entre bactéries et plantes suivent des mécanismes semblables qu'il s'agisse de bactérie pathogène ou de PGPR (Lugtenberg & Dekkers, 1999; Chin-A-Woeng *et al.*, 2000).

1.1.3.2. Utilisation des exsudats racinaires

Les racines des plantes secrètent d'une façon continue des substances et des composés dans la rhizosphère (Gleba *et al.*, 1999; Bais *et al.*, 2001). Ces exsudats racinaires contiennent des ions, des gaz (oxygène, dioxyde de carbone, éthylène, ...), de l'eau, différents métabolites primaires et secondaires et des protéines, en particulier enzymatiques (Bertin *et al.*, 2003; Uren, 2007). La production de ces exsudats varie selon le type de sol, l'âge et le stade physiologique de la plante, ainsi que la disponibilité des nutriments dans le sol (Brady & Weil, 1999; Brimecombe *et al.*, 2001). Les bactéries sont

susceptibles de localiser les racines des plantes grâce à leurs exsudats. Les acides aminés et les glucides ont ainsi montré qu'ils peuvent exercer un chimiotactisme sur les PGPR (Somers *et al.*, 2004), et aussi influencer le mouvement des flagelles chez certaines bactéries rhizosphériques. Les composés des exsudats racinaires pourraient aussi être utilisés par les bactéries comme des précurseurs pour la production d'hormones (Bais *et al.*, 2006) : le tryptophane produit par la plante peut être utilisé par la bactérie pour la production d'auxine (Cooke *et al.*, 2002).

1.1.3.3. Formation de biofilms

Les biofilms sont des masses cellulaires formées de colonies d'une espèce ou de plusieurs espèces bactériennes qui adhèrent à des surfaces biotiques ou abiotiques. Ces bactéries sont en contact intime les unes avec les autres, en se refermant dans leur propre matrice composée de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Seneviratne *et al.*, 2010). Selon Saleh-Lakha & Glick (2006), ce groupe de bactéries a la capacité d'élaborer une communication interne à travers les molécules de quorum sensing. Les PGPR s'attachent mieux aux racines lorsqu'elles sont en biofilm qu'en cellules isolées (Podile & Kishore, 2006). Ces associations plantes – biofilms ont une haute capacité à se protéger contre les phénomènes de stress, de compétitions microbiologiques qui caractérisent la rhizosphère ; elles sont aussi capables de produire des effets bénéfiques sur la croissance des plantes (Ramey *et al.*, 2004).

1.1.4. Mode d'action des PGPR

Les bactéries PGPR stimulent la croissance de la plante de 2 manières différentes. D'abord, la stimulation de croissance résulte d'un effet direct sur la plante, soit par une interférence avec les voies hormonales contrôlant le développement et/ou le métabolisme, soit par une stimulation de la nutrition hydrominérale. Ensuite, la stimulation de croissance de la plante peut résulter d'un effet indirect via la protection de la plante contre des agresseurs (stimulation des mécanismes de défense de la plante).

1.1.4.1. Implications des voies hormonales des plantes

Les hormones végétales sont des signaux chimiques qui coordonnent le développement et l'activité des différents tissus et organes de la plante, mais qui affectent

également sa capacité à répondre à son environnement. Ce sont des composés organiques efficaces à très faible concentration, parfois synthétisées dans une partie de la plante et transférées dans une autre où elles agissent. Elles interagissent avec un récepteur spécifique pour produire une réponse cellulaire. Au niveau physiologique, ces réponses cellulaires se traduisent par des modifications de développement (régulation du cycle cellulaire, différenciation d'un tissu, initiation d'un organe, allongement d'un organe, changement de phase de développement, sénescence, etc.), elles-mêmes pouvant se répercuter sur des modifications de la vitesse de croissance d'un organe, voire de la plante entière. Les PGPR sont capables d'interférer avec plusieurs de ces voies de régulation, aboutissant ainsi à une stimulation de croissance de la plante. Les effets des PGPR qui passent par la modification des voies hormonales de la plante sont généralement regroupés sous le terme de phytostimulation (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Ces interactions résultent soit de la production de l'hormone végétale par la bactérie soit de la modification des voies de synthèse, de transport ou de signalisation de l'hormone dans la plante (Desbrosses *et al.*, 2012). Les principales voies hormonales affectées par les PGPR sont présentées ci-dessous.

1.1.4.1.1. Auxine

L'IAA (Acide Indole-3-Acétique) est impliquée dans la régulation de développement des plantes, incluant l'organogénèse, les réponses tropiques et cellulaires, comme l'initiation des racines, l'élargissement des cellules, ainsi que leurs divisions, leurs différenciations, et leurs régulations géniques (Tsavkelova *et al.*, 2006; Ryu & Patten, 2008; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Beaucoup de bactéries rhizosphériques peuvent produire de l'IAA ou des composés proches à activité auxine chez les plantes. Il a été proposé que l'IAA produite par les PGPR stimule la croissance et la longueur des racines ; l'augmentation de la surface racinaire qui en résulte leur permettrait d'accéder à plus de ressources nutritionnelles dans le sol, ce qui se traduirait par une augmentation de la vitesse de croissance des parties aériennes (Vessey, 2003). Cette hypothèse est très populaire parmi les microbiologistes du sol et la production d'auxine par la bactérie est probablement le mécanisme qui a été le plus étudié chez les PGPR (Loper & Schroth, 1986; Dobbelaere *et al.*, 1999; Spaepen *et al.*, 2007).

La production d'auxine bactérienne résulterait de l'utilisation par la PGPR du tryptophane exsudé par les cellules racinaires dans la rhizosphère. Cette hypothèse a été

appuyée par plusieurs études effectuées sur des bactéries mutantes affectées dans leur production d'auxine, spécialement les souches *Azospirillum brasilense* sp245 (Barbieri & Galli, 1993) et *Pseudomonas putida* GR12-2 (Patten & Glick, 2002). De plus, le tryptophane augmente la production d'IAA chez *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (Idris *et al.*, 2007) et Tien *et al.* (1979) ont montré qu'*Azospirillum* est capable de produire de l'auxine quand il est exposé au tryptophane. De même, Karnwal (2009) a montré que la production d'IAA par des souches de *Pseudomonas fluorescens* augmente lorsque l'on augmente la concentration de tryptophane dans le milieu.

L'auxine ainsi produite serait utile pour le microorganisme dans le cadre de son processus de colonisation (Spaepen *et al.*, 2007). Navarro *et al.* (2006) ont démontré qu'il y a une relation entre la voie de signalisation d'auxine chez la plante et sa résistance à la colonisation bactérienne ; dans une autre étude, Mathesius *et al.* (2003) ont montré que les molécules bactériennes de quorum sensing telle que le lactone N-acyl homosérine induisent une baisse d'expression de gènes impliqués dans la voie de l'auxine chez *Arabidopsis*. Les travaux de Navarro *et al.* (2006), suggèrent que la diminution de l'expression de ces gènes augmente la résistance de la plante à la colonisation bactérienne. D'autres études ont montré que la colonisation bactérienne peut induire la surexpression de gènes de la voie de signalisation de l'auxine, que ce soit avec des PGPR ou des bactéries pathogènes (Spaepen *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que la production d'auxine par les bactéries bénéfiques ou pathogènes peut intervenir dans un mécanisme de signalisation pour contourner le système de défense de la plante -induit par la répression de la voie de signalisation d'auxine chez la plante. Ceci illustre l'interaction entre les voies de signalisation de la plante et des bactéries rhizosphériques dans le déterminisme de la réponse de la plante. Cette réponse n'est donc pas une simple réaction à un facteur unique comme l'augmentation d'une hormone spécifique ou d'un nutriment, mais le résultat extrêmement complexe de la modification de plusieurs voies de signalisation de la plante.

1.1.4.1.2. Cytokinines

Les cytokinines stimulent la division et le grandissement cellulaires, ainsi que l'extension des tissus dans certaines parties de la plante (Salisbury, 1994; Downes & Crowell, 1998; Downes *et al.*, 2001). Elles participent à de nombreux processus de développement, comme la régulation de la croissance des racines et des feuilles, ainsi que

le contrôle de la dominance apicale dans les tiges, le développement des chloroplastes et la sénescence des feuilles (Werner *et al.*, 2001; Oldroyd, 2007).

La présence de cytokinines a été détectée dans différentes cultures bactériennes de *Halomonas desiderata*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* et *Escherichia coli* (Arkhipova *et al.*, 2005; Karadeniz *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2009). L'implication de cytokinines bactériennes dans l'effet stimulateur de croissance est encore très controversée. Le mutant *cre1* d'*Arabidopsis*, affecté dans le principal récepteur de cytokinine, ne présente pas de stimulation de croissance lorsqu'il est mis en présence de la souche bactérienne *Bacillus subtilis* GB03 (Ryu *et al.*, 2003). Les cytokinines seraient donc impliquées dans la stimulation de croissance par cette souche, tandis qu'une autre souche de *B. subtilis* IN937a, stimule la croissance d'*Arabidopsis* sans que les cytokinines ne soient requises. En effet, cette souche stimule la croissance du mutant *cre1*. L'inoculation de plantes de laitue avec les bactéries productrices de cytokinines induit simultanément une augmentation de la concentration de ces hormones dans les feuilles et une stimulation de la croissance de ces organes sans qu'un lien de cause à effet n'ait été démontré (Arkhipova *et al.*, 2007).

1.1.4.1.3. Gibbérellines

Les gibbérellines sont des acides diterpènes tétracycliques synthétisées par les plantes, les champignons et les bactéries. En 2001, 136 structures de gibbérellines étaient identifiées et caractérisées chez les plantes et les champignons (MacMillan, 2001), mais seul un très petit nombre de ces composés sont reconnus par les récepteurs de gibbérellines des plantes, les autres molécules étant des intermédiaires de synthèse ou de dégradation des formes actives (hormone). Cette hormone est impliquée dans la germination des graines, la croissance des tiges et des feuilles, l'induction de la floraison et la croissance des fleurs et des fruits (Pharis & King, 1985; King & Evans, 2003). Les gibbérellines sont aussi impliquées dans la croissance des racines, l'abondance des poils racinaires, la régulation de la dormance et le retardement de la sénescence (Tanimoto, 1987; Bottini & Luna, 1993; Fulchieri *et al.*, 1993; Reinoso *et al.*, 2002).

Des gibbérellines peuvent être produites par *Azospirillum brasilense* (Tien *et al.*, 1979), par des *Rhizobium* (Williams & Mallorca, 1982) et par de nombreuses autres bactéries rhizosphériques (*Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*,

Acinetobacter, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*) (Mitter *et al.*, 2002; Tsavkelova *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2009). La stimulation de la croissance de la plante par les gibbérellines d'origine bactérienne a été rapportée par plusieurs laboratoires, en général associée à l'augmentation de la concentration de gibbérelline dans les tissus de la plante (Atzorn *et al.*, 1988; Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2005, 2009; Kang *et al.*, 2009). Tout comme pour les cytokinines, des souches PGPR peuvent stimuler la production de gibbérellines chez la plante colonisée sans pour autant en synthétiser elles-mêmes.

1.1.4.1.4. L'éthylène

L'éthylène est la première phytohormone gazeuse découverte chez les plantes. A forte dose, il est généralement considéré comme un inhibiteur de la croissance de la plante et un activateur de mécanismes de sénescence (chute des feuilles) ou de programmes de développement (maturation des fruits climactériques) (Lin *et al.*, 2009). A faibles concentrations, il contribue à la bonne organisation du méristème racinaire ainsi qu'au développement floral. Enfin, l'éthylène est une hormone de stress impliquée dans la réponse des plantes à des stress abiotiques comme la salinité, la sécheresse, la présence de métaux lourds ou les blessures et dans la réponse aux attaques d'agents pathogènes (Abeles, 1973).

La synthèse de l'éthylène implique trois enzymes : (a) la S-Adénosyle-L-Méthionine (SAM) synthétase, qui catalyse la conversion de méthionine en SAM (Giovanelli *et al.*, 1980), (b) l'acide 1-aminocyclopropane 1- carboxylique (ACC) synthétase, qui intervient dans l'hydrolyse de la SAM en ACC et 5'-méthyle-thioadénosine (Kende, 1989), et (c) l'ACC oxydase qui catabolise l'ACC en éthylène, dioxyde de carbone et cyanure (John, 1991). Cette synthèse est très finement régulée chez les plantes par plusieurs mécanismes. D'une part, le cycle de Yang assure une homéostasie du précurseur de l'éthylène (la SAM). D'autre part, l'ACC synthétase (ACS) est régulée au niveau post-traductionnel via un contrôle de sa dégradation (Lin *et al.*, 2009). Ce mécanisme peut être modifié par d'autres voies de signalisation, coordonnant ainsi l'action de l'éthylène avec celle d'autres hormones. Par exemple, les ACS de type II (ACS5 et ACS9 chez *Arabidopsis*) voient leur stabilité accrue en présence de cytokinine (Chae *et al.*, 2003). Enfin, les ACS et les ACO sont régulées au niveau transcriptionnel (Lin *et al.*, 2009). Ainsi, l'auxine stimule

l'accumulation des transcrits de plusieurs ACS chez *Arabidopsis* et d'ACO2 chez le riz (Lin *et al.*, 2009).

De nombreux microorganismes dont des bactéries du genre *Pseudomonas* possèdent une activité ACC désaminase (AcdS) qui dégrade l'ACC en ammonium et α -cétobutyrate. Des études récentes montrent que le gène codant cet enzyme est présent dans une large gamme de bactéries rhizosphériques comme de nombreux *Rhizobium*, *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, mais aussi des *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* (Jacobson *et al.*, 1994; Glick *et al.*, 1995; Burd *et al.*, 1998; Belimov *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2003; Sessitsch *et al.*, 2005; Blaha *et al.*, 2006; Madhaiyan *et al.*, 2007; Kuffner *et al.*, 2008; Chinnadurai *et al.*, 2009). En particulier, un grand nombre de bactéries stimulatrices de la croissance des plantes possèdent une activité ACC désaminase (Grichko & Glick, 2001; Farwell *et al.*, 2007). Cette observation a conduit à l'hypothèse de la participation de l'activité AcdS à la stimulation de croissance. Cette hypothèse envisage qu'une partie de l'ACC produite dans les cellules racinaires soit excrétée dans la rhizosphère où les bactéries présentes le dégradent via leur activité AcdS, conduisant à une diminution de la concentration d'ACC dans l'apoplasme et donc de sa quantité réabsorbée et transformée en éthylène par les cellules racinaires (Glick, 1995; Bayliss *et al.*, 1997; Martínez-Viveros *et al.*, 2010). En limitant le niveau d'éthylène produit, les PGPR pourraient lever partiellement l'inhibition de croissance exercée par cette hormone, en particulier en conditions de stress qui induisent son métabolisme (Glick, 1995; Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Gamalero & Glick, 2011).

1.1.4.2. Effets des PGPR sur la nutrition des plantes

A côté de leur rôle de phytostimulateurs, les PGPR peuvent également avoir un rôle de biofertilisants. Dans la phytostimulation, l'effet primaire des PGPR porte sur le contrôle du développement ce qui doit entraîner une augmentation de la nutrition minérale pour assurer la synthèse de la biomasse supplémentaire. A l'inverse, l'effet biofertilisant consiste en une augmentation de l'absorption minérale qui entraîne secondairement une stimulation de croissance comme conséquence de l'augmentation de la vitesse de synthèse de composés organiques par le métabolisme de la plante. Cet effet pourrait être plus marqué quand la plante se développe dans des conditions de nutrition limitante (sols

pauvres ou carencés en un élément spécifique). Les PGPR pourraient améliorer la nutrition en macroéléments tels que le phosphore et l'azote, mais aussi la nutrition en oligoéléments comme le fer.

1.1.4.2.1. Effets des PGPR sur la nutrition phosphatée

Le phosphore présent dans le sol est majoritairement sous une forme minérale insoluble (apatite, hydroxyapatite et oxyapatite) ou sous une forme organique complexée avec un phytate. Dans certains cas, cette dernière forme peut représenter entre 30 et 50% du phosphore total du sol (Borie *et al.*, 1989; Turner *et al.*, 2002). Ces formes insolubles de phosphate ne sont pas directement disponibles pour la plante, ne laissant accessible à l'absorption racinaire que 1% à 1‰ du phosphore du sol soit environ 1mg/kg de sol (Goldstein, 1994).

Les bactéries peuvent améliorer la nutrition phosphatée des plantes en participant à la solubilisation et à la minéralisation du phosphore du sol. Des bactéries qualifiées de « Phosphate Solubilizing Bacteria » (PSB) joueraient ainsi un rôle très important dans le cycle géochimique du phosphate dans le sol (Jeffries *et al.*, 2003). Les PSB appartiennent en majorité aux genres *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Streptomyces*, *Pantoea* et *Pseudomonas* (Chung *et al.*, 2005; Hariprasad & Niranjana, 2009; Oliveira *et al.*, 2009).

La capacité des bactéries rhizosphériques à solubiliser le phosphore minéral peut s'expliquer par leur aptitude à réduire le pH en excréant des acides organiques comme le gluconate, le citrate, le lactate et le succinate, et en excréant des protons lors de l'assimilation de NH_4^+ (Gyaneshwar *et al.*, 1999; Mullen, 2005).

Certaines bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Staphylococcus* (Richardson & Hadobas, 1997; Hussin *et al.*, 2007; Shedova *et al.*, 2008) peuvent solubiliser le phosphore organique par l'action d'une phytase (Lim *et al.*, 2007; Jorquera *et al.*, 2008).

Enfin, la minéralisation du phosphate organique peut se faire grâce à l'activité de différentes phosphatases bactériennes (phosphomonoestérases, phosphodiesterases et phosphotriesterases) (Rodríguez & Fraga, 1999). Les activités de minéralisation et de

solubilisation du phosphate peuvent coexister dans la même souche bactérienne (Tao *et al.*, 2008).

1.1.4.2.2. Effets des PGPR sur la nutrition azotée

De nombreuses bactéries du sol ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique (diazotrophes) grâce à leur activité nitrogénase qui catalyse la réduction du diazote (N_2) en ammoniac (NH_3). Cette activité a un rôle central dans le cycle de l'azote. En effet, l'azote atmosphérique représente la très grande majorité de l'azote présent sur Terre et la plupart des organismes vivants ne peuvent assimiler l'azote indispensable à la synthèse des molécules organiques essentielles à la vie qu'à partir d'azote organique ou d'azote minéral sous la forme d'ions nitrate (NO_3^-) ou ammonium (NH_4^+). La transformation de N_2 en NH_3/ NH_4^+ par des phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques ou la foudre est beaucoup trop faible pour assurer l'alimentation des plantes qui, dans la chaîne alimentaire, fournissent ensuite aux animaux l'azote organique qu'elles ont synthétisées à partir de l'azote minéral. La capacité de certaines bactéries à fixer N_2 est donc un élément essentiel de cette chaîne et la fertilisation du sol par ces bactéries représente un grand intérêt économique et écologique. La fixation biologique de l'azote peut être symbiotique, et se déroule alors au sein d'une nodosité, organe formé par la racine d'une légumineuse en interaction avec des bactéries du genre *Rhizobium* ou de genres proches et quelques autres plantes comme l'arbre *Casuarina glauca* avec *Frankia*. Cependant, de nombreuses bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique à l'état libre (i.e. sans former d'organe spécifique avec une plante), comme *Azoarcus* (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993), *Azospirillum* (Bashan & de-Bashan, 2010), *Burkholderia* (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001), *Gluconacetobacter* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001) et *Pseudomonas* (Mirza *et al.*, 2006). Ainsi, plusieurs PGPR sont diazotrophes. De plus, les bactéries impliquées dans la fixation symbiotique de l'azote avec les légumineuses peuvent stimuler la croissance de non légumineuses. Ainsi, la stimulation de croissance par *Rhizobium* a été rapportée pour le radis (Antoun *et al.*, 1998) et le riz (Mirza *et al.*, 2006). La fixation de N_2 par des bactéries rhizosphériques, si elle est quantitativement importante, pourrait conduire à enrichir suffisamment la rhizosphère en ions NH_4^+ pour augmenter la nutrition azotée de la plante. Il n'existe pas de méthode de mesure de flux d'azote à l'intérieur de la rhizosphère ; de ce fait, il est pratiquement impossible d'estimer la part de la nutrition azotée de la plante assurée par la fixation d'azote par les PGPR. Cependant, il est généralement admis que la

capacité de ces bactéries à fixer l'azote est limitée, la quantité d'azote fournie par les PGPR estimée étant comprise entre 0 et 10 kg ha⁻¹ (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Bottomley & Myrold, 2007; Unkovich & Baldock, 2008). Comparée à la quantité d'azote fournie par les engrais chimiques (100 à 200 kg ha⁻¹), ces valeurs sont extrêmement faibles. Si ces chiffres sont bien exacts, la capacité de fixation d'azote par les PGPR ne peut pas être considérée comme un critère de classification des bactéries comme des biofertilisants (Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

1.1.4.2.3. Effets des PGPR sur la nutrition en fer

Bien que le fer soit le quatrième élément le plus abondant Terre (Ma, 2005), il est très peu disponible pour la nutrition des plantes (dans le sol, il est généralement sous une forme précipitée). C'est pourtant un oligoélément essentiel pour les plantes où il joue le rôle de cofacteur pour plusieurs enzymes. La séquestration de la plus grande partie du fer du sol sous forme insoluble d'hydroxyde de fer en fait un facteur limitant de la croissance des plantes (Podile & Kishore, 2006). L'activité des bactéries du sol, et particulièrement des PGPR, peut améliorer la nutrition en fer des plantes en libérant des sidérophores, molécules de faibles poids moléculaires qui se lient aux ions de fer (Whipps, 2001). L'étude de la diversité des souches productrices de sidérophores a identifié des souches Gram négatif des genres *Pseudomonas* et *Enterobacter* et des souches Gram positif des genres *Bacillus* et *Rhodococcus* (Tian *et al.*, 2009). Beaucoup de travaux confirment la capacité de plusieurs plantes d'absorber le complexe formé entre un sidérophore bactérien et les ions Fe³⁺, et que ce processus est vital dans le mécanisme d'absorption du fer par les plantes (Wang *et al.*, 1993; Masalha *et al.*, 2000). Plusieurs bactéries productrices de sidérophore ont montré leur capacité à améliorer la croissance des plantes comme *Bacillus megaterium* sur le thé (Chakraborty *et al.*, 2006). L'utilisation des souches spécifiques de *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* sur différentes cultures conduit à une amélioration de la croissance et à l'augmentation du rendement par solubilisation du fer (Saharan & Nehra, 2011). De plus, l'ajout du complexe Fe-pyoverdine synthétisé par *Pseudomonas fluorescens* C7 sur *Arabidopsis thaliana* se traduit par une augmentation de la concentration de fer dans les tissus de la plante et une amélioration de sa croissance (Vansuyt *et al.*, 2007).

1.1.4.3. Biocontrôle

En plus de leur effet « direct » sur la croissance de la plante, via des modifications du développement (phytostimulation) et/ou de la nutrition de la plante (biofertilisation), les PGPR contribuent également indirectement à stimuler leur croissance en les protégeant des attaques pathogènes (biocontrôle). Les microorganismes pathogènes peuvent en effet réduire significativement la croissance de la plante ainsi que le rendement et la qualité des produits récoltés. Le moyen le plus utilisé pour contrôler ces pathogènes est l'utilisation de pesticides chimiques (Martínez-Viveros *et al.*, 2010). Cependant, les PGPR protègent la plante et constituent un agent majeur de lutte biologique. Ces bactéries peuvent protéger les plantes contre un large spectre de maladies bactériennes, fongiques et virales. Elles peuvent aussi fournir une protection contre les nématodes (Saharan & Nehra, 2011). Le contrôle biologique exercé par les PGPR peut utiliser plusieurs mécanismes, la production d'antibiotiques et d'enzymes, la compétition pour la colonisation des sites ou des nutriments et l'induction de la résistance systémique (ISR) contre les agents pathogènes (Raaijmakers *et al.*, 2009).

1.1.4.3.1. Production d'antibiotique et d'enzyme

La synthèse d'antibiotique est un mécanisme qui a souvent été associé à l'utilisation des PGPR pour lutter contre les pathogènes (Whipps, 2001; Haas & Keel, 2003; Mazurier *et al.*, 2009). Parmi les antibiotiques synthétisés par les PGPR, on a identifié les butyrolactones, oligomycines A, oomycine A, acide phenazine-1-carboxylique, viscosinamide, xanthobaccine, agrocine 84, agrocine 434, hebicoline, lipopeptide cyclique, cyanure d'hydrogène, pyoluteorine, pyrrolnitrine et 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4 DAPG). Les cibles principales de ces antibiotiques sont la chaîne de transport d'électrons, les métalloenzymes comme la Cu-cytochrome C oxydase, l'intégrité de la membrane ainsi que les zoospores (Whipps, 2001; Haas & Défago, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2006). Le 2,4 DAPG est l'antibiotique rhizobactérien le plus efficace contre les agents pathogènes des plantes (Fernando *et al.*, 2006). Il a un large spectre de propriétés dans la lutte antifongique (Loper & Gross, 2007), antibactérienne (Velusamy *et al.*, 2006) et antihelminthique (Cronin *et al.*, 1997).

Certaines PGPR agissent contre les agents pathogènes par la production d'enzymes tels que les chitinases, la cellulose, β -1,3 glucanase, des protéases ou des lipases qui lysent la paroi fongique (Chet & Inbar, 1994).

1.1.4.3.2. Compétition

Dans les niches de la rhizosphère qu'elles colonisent, les PGPR sont en compétition avec les microorganismes pathogènes pour la disponibilité des nutriments contenus dans les exsudats racinaires (Raaijmakers *et al.*, 2009). Cette compétition ralentit le développement des bactéries pathogènes, ce qui participe indirectement à la défense de la plante contre leurs attaques et à la stimulation de la croissance de la plante (Weller, 1988; Raaijmakers *et al.*, 1995). Les PGPR peuvent éliminer certains agents pathogènes par la dégradation des composés organiques ou la diminution de la concentration des oligoéléments (comme les ions fer) indispensables à leur croissance (Lemanceau *et al.*, 1992; Fravel *et al.*, 2003).

En liaison avec leur prolifération dans la rhizosphère, les PGPR produisent des molécules antagonistes à travers le système de Quorum Sensing. Ce système permet aux bactéries de communiquer entre elles à travers l'échange de signaux moléculaires comme les lactones N-acyle homosérine (AHLs) (Lugtenberg *et al.*, 2002). Celui-ci est aussi impliqué dans la production de composés antifongiques (antifungal metabolites, AFMs), d'antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (Teplitski *et al.*, 2000).

1.1.4.3.3. Résistance Systémique Induite (ISR)

Certaines PGPR peuvent élever le niveau de défense naturelle des plantes. Cet effet est appelé résistance systémique induite (ISR) (Van Loon, 2000). Contrairement à la résistance systémique acquise (SAR), l'ISR n'implique pas l'apparition de nécroses (Van Loon *et al.*, 1998) : l'activation de l'ISR ne se traduit par l'apparition d'aucun symptôme visible. Au niveau moléculaire, l'ISR et la SAR ne passent pas par les mêmes voies de signalisation. L'activation de la SAR repose sur la production d'acide salicylique (Van Loon & Glick, 2004), alors que l'activation de l'ISR implique les voies de signalisation de l'éthylène et de l'acide jasmonique (Bakker *et al.*, 2007). L'activation de l'ISR peut résulter de la perception par la plante de molécules bactériennes comme la chaîne latérale des protéines-lipopolysaccharides de la membrane externe de la bactérie (Leeman *et al.*,

1995), les fractions flagellaires (Zipfel *et al.*, 2004), des pyoverdines (Maurhofer, 1994), le 2,4-DAPG (Iavicoli *et al.*, 2003; Siddiqui & Shahid Shaukat, 2003).

1.2. Utilisation d'un système modèle pour identifier des éléments de la réponse de la plante aux PGPR

L'utilisation des PGPR dans l'agriculture ouvre la voie à l'utilisation des biofertilisants et phytostimulateurs, ou engrais biologiques, pour l'amélioration de la croissance des plantes et l'augmentation des rendements de production. Cependant, afin de maîtriser cette utilisation, il faut avoir de bonnes connaissances sur le mode d'action de la bactérie et sur la réponse de la plante envers ces bactéries. Nos connaissances sur ces interactions plantes-bactéries bénéfiques sont limitées, du fait de la grande diversité de plantes et des microorganismes utilisées et de la complexité des voies élicitées chez la plante par la bactérie. L'identification d'éléments des voies de signalisation de la plante impliquées dans les réponses aux PGPR requiert de travailler sur une plante modèle. L'équipe de recherche au sein de laquelle ce travail de thèse s'est réalisé a développé une approche basée sur l'utilisation d'*Arabidopsis thaliana*. La PGPR utilisée dans l'équipe est *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, souche bactérienne isolée des racines de colza cultivé en champ. Les données disponibles sur *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 sont présentées ci-dessous.

1.2.1. *Phyllobacterium*, une bactérie principalement tellurique de la famille des *Rhizobiaceae*

La première isolation de souches de *Phyllobacterium* est rapportée par Zimmermann (1902), et la dénomination du genre *Phyllobacterium* a été faite pour la première fois par Knösel (1962). Les premières descriptions de ce genre ont été basées sur des caractères phénotypiques, le genre ne comportant alors que deux espèces décrites, *Phyllobacterium myrsinacearum* et *Phyllobacterium rubiacearum* (Knösel, 1984). C'est après la réalisation des études moléculaires sur ces deux espèces (hybridation DNA-DNA et composition en acide gras) que Mergaert *et al.* (2002) a fusionné la seconde espèce avec *Phyllobacterium myrsinacearum*. Actuellement, le genre *Phyllobacterium* est placé dans

l'ordre des *Rhizobiales* de la classe des *Alphaproteobacteria*. Toutes les espèces de *Phyllobacterium* identifiées à ce jour ont été isolées à partir de plantes (Tableau 1.1) sauf *P. catacumbae* qui a été isolée à partir des roches des catacombes romaines en Italie (Jurado *et al.*, 2005).

Tableau 1.1. Principales espèces de *Phyllobacterium*.

Espèce	Région géographique	Plante hôte	Référence
<i>P. myrsinacearum</i>	NI Espagne, Belgique	Nodosités de feuilles d' <i>Ardisia crispa</i> Nodosités de feuilles de <i>Pavetta zimmermaniana</i> Rhizoplan de <i>Saccharum officinarum</i>	(Knösel, 1962, 1984) (Von Faber, 1912; Knösel, 1984) (Lambert <i>et al.</i> , 1990)
<i>P. ifriqiense</i>	Sud de la Tunisie	Nodosités de racines de <i>Lathyrus numidicus</i> Nodosités de racines d' <i>Astragalus algerianus</i>	(Mantelin <i>et al.</i> , 2006b)
<i>P. brassicacearum</i>	France	Racines de <i>Brassica napus</i>	(Bertrand <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. bourgogneuse</i>	France	Racines de <i>Brassica napus</i>	(Bertrand <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. leguminum</i>	Sud de la Tunisie	Nodosités de racines d' <i>Astragalus algerianus</i> Nodosités de racines d' <i>Argyrolobium uniflorum</i>	(Mantelin <i>et al.</i> , 2006b)
<i>P. trifolii</i>	Espagne	Nodosités de racines de <i>Trifolium pratense</i>	(Valverde <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. catacumbae</i>	Italie		(Jurado <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. endophyticum</i>	Espagne	Nodosités de racines de <i>Phaseolus vulgaris</i>	(Flores-Félix <i>et al.</i> , 2013)

NI : Non identifiée.

1.2.1.1. *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, une bactérie isolée de la rhizosphère du colza

Pour identifier des bactéries qui colonisent naturellement la rhizosphère du colza, des racines de plantes cultivées en Bourgogne (France) ont été prélevées, stérilisées en surface et broyées avec un diluant, et les bactéries récoltées ont été ensemencées sur milieu NFB (Nitrogen Free Broth) après dilutions. Treize bactéries Gram négatif capables de se développer dans ce milieu pauvre en azote ont été isolées. Parmi les bactéries identifiées, des souches appartenant à quatre genres différents ont stimulé la croissance de colza dans un bio-test : *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Agrobacterium* et *Phyllobacterium*. La souche qui a montré l'effet stimulateur de croissance le plus fort appartient au genre *Phyllobacterium* (Bertrand *et al.*, 2001). Dans des expériences indépendantes, cette souche s'est montrée à nouveau stimulatrice de la croissance du colza (Bertrand *et al.*, 2001; Larcher *et al.*, 2003)

et d'*Arabidopsis thaliana* (Mantelin *et al.*, 2006a). Cette souche a été caractérisée comme une nouvelle espèce appelée *Phyllobacterium brassicacearum* avec la référence de souche STM196 (Mantelin *et al.*, 2006b).

1.2.1.2. Caractéristiques de *Phyllobacterium brassicacearum* STM196

Une étude sur le genre *Phyllobacterium* par Mantelin *et al.* (2006b) a permis une identification de caractéristiques phénotypiques et biochimiques de la souche STM196 (Tableau 1.2). Grâce aux travaux microbiologiques de Thèse de Larcher (2002) sur certaines caractéristiques de cette souche reconnues chez d'autres PGPR, plusieurs mécanismes ont été observés :

- Synthèse d'auxine à partir du tryptophane (mais celle-ci est extrêmement faible comme démontré par Contesto *et al.* (2010)).
- Activité ACC désaminase.
- Réduction du nitrate en nitrite puis en ammonium.

L'application de STM196 sur le colza a montré sa capacité à stimuler la croissance de la plante (Bertrand *et al.*, 2001). On observe également une stimulation de croissance chez *Arabidopsis thaliana* accompagnée d'un effet sur le développement racinaire similaire à celui observé chez le colza (Mantelin *et al.*, 2006a; Contesto *et al.*, 2008).

La production d'auxine par STM196 est extrêmement faible et ne participe pas à la stimulation de croissance ni à son effet positif sur l'élongation des racines latérales. La voie de signalisation de l'auxine est pourtant bien requise dans cette dernière réponse, comme le montre l'absence de réponse chez des mutants d'*Arabidopsis* altérés dans le transport d'auxine ou dans sa voie de transduction (Contesto *et al.*, 2010). Ceci indique que, comme cela a également été démontré pour la souche BG03 de *Bacillus subtilis* (Zhang *et al.*, 2007), STM196 modifie le transport polarisé d'IAA dans la plante et induit ainsi des modifications du développement sans que la bactérie ne fournisse de l'auxine à la plante.

La présence de la séquence du gène *Acds* dans le génome de STM196 a été confirmée mais l'impact de l'activité AcdS sur la plante est très faible : un mutant *acds⁻* de la souche STM196 induit un allongement des poils racinaires légèrement plus élevé que la souche sauvage comme attendu pour une augmentation d'éthylène dans la racine

consécutives à l'absence d'activité AcdS (Contesto *et al.*, 2008). En revanche, la mutation *acds*⁻ n'induit pas de différence dans l'effet de STM196 sur les racines latérales et la croissance de la plante.

Bien que STM196 possède une activité nitrate réductase, celle-ci n'affecte pas la nutrition azotée de la plante. En effet, dans un milieu où le nitrate est la seule source d'azote, l'inoculation avec STM196 ne parvient pas à restaurer la croissance de doubles mutants *nr1-nr2* (G4-5), affectés dans leurs deux activités nitrate réductase NR1 et NR2 (Thèse Contesto, 2007). Ceci démontre que la bactérie n'est pas capable d'augmenter le niveau de ressource d'azote à une plante qui ne peut pas utiliser NO₃⁻, indiquant que l'activité de réduction de nitrate de la bactérie ne constitue pas une source de NH₄⁺ significative à la plante. De plus, ceci indique que si la bactérie possède une activité nitrogénase (ce qui est peu probable, car une séquence *NifA* complète n'a pas été trouvée), celle-ci ne serait pas suffisante pour fournir des quantités significatives d'azote assimilable par la plante.

Tableau 1.2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques de *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 (Mantelin et al., 2006b).

Caractéristiques	<i>P brassicacearum</i> STM196
DNA proportion de (G+C) (moles %)	55.5
Croissance dans/à:	
pH 4	–
35 °C	–
37 °C	–
2% (w/v) NaCl	+
3% (w/v) NaCl	–
LB broth	+
Assimilation de:	
Glutarate	–
L-Tyrosine	–
1-O-Methyl α -D-glucofuranoside	–
p-Hydroxybenzoate	+
α -Ketoglutarate	+
Xylitol	–
Maltotriose	+
Protocatechuate	+
Citrate	+
(2)-Quinate +	+
D-Tagatose	–
Ethanolamine	+
(2)-L-Arabitol	–
D-Saccharate	–
Adonitol	–
DL- α -Amino-n-butyrate	+
DL-Glycerate	+
L-Serine	+
(+)-D-Melezitose	–
cis-Aconitate	+
Trigonelline	+
Succinate	+
Maltitol	+
Mucate	–
trans-Aconitate	+
Betaine	+
Dulcitol	+
Fumarate	+
(+)-D-Malate	+
(2)-L-Malate	+
5-Keto-D-gluconate	+
DL- β -Hydroxybutyrate	+
L-Aspartate	+
L-Alanine	+
Propionate	–
i-Erythritol	–
D-Glucuronate	–
D-Galacturonate	–
Malonate	+
Palatinose	+
1-O-Methyl β -D-galactopyranoside	+

1.3. Réponses physiologiques d'*Arabidopsis* à l'inoculation par une PGPR

Après la découverte des PGPR, de nombreuses études ont été conduites sur les caractéristiques écologiques des bactéries, leur capacité à stimuler la croissance de la plante, ainsi que sur leur identification taxonomique. Cependant, pendant plusieurs décennies il n'y a eu aucune étude précise de la réponse de la plante à la PGPR, les physiologistes des plantes ne portant pas d'intérêt à ce type d'interaction (à l'opposé de l'interaction *Rhizobium*-légumineuse, très étudiée). Il n'y a qu'une dizaine d'années que sont rapportés dans la littérature scientifique les résultats de travaux sur la réaction de la plante à l'inoculation avec une PGPR. La plupart de ces travaux ont été réalisés sur *Arabidopsis thaliana*, plante modèle qui fournit plus d'outils génétiques que toute autre, et pour laquelle on dispose du plus grand nombre de données de physiologie et de biologie cellulaire. La majorité des études faites sur les interactions entre une PGPR et *Arabidopsis thaliana* ont été réalisées *in vitro* (en boîte de Pétri, sur milieu minéral gélosé inoculé ou non avec la souche bactérienne étudiée) à un stade jeune de la plante. Ce dispositif donne un accès expérimental privilégié à l'étude du développement racinaire. Par contre, le développement aérien reste peu étudié, la période de culture étant trop courte et le confinement relatif des plantes dans les boîtes de Pétri limitant les échanges gazeux, et donc la photosynthèse. La PGPR peut affecter plusieurs voies de signalisations chez la plante, qui vont par la suite stimuler sa croissance et son développement. L'étude de l'implication de ces voies repose sur l'utilisation de mutants d'*Arabidopsis* affectés dans différentes étapes de voies de régulation telles que la synthèse, le transport, la perception et la transduction d'hormones (Desbrosses *et al.*, 2012).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'hypothèse la plus couramment utilisée par les microbiologistes pour expliquer l'effet stimulateur de croissance des PGPR est la production d'auxine par ces bactéries ; selon cette hypothèse, la stimulation du développement des racines par l'auxine bactérien augmenterait la surface racinaire, ce qui se traduirait par une augmentation de l'absorption d'eau et de nutriments. Finalement, dans cette hypothèse l'augmentation de croissance des organes aériens ne serait qu'une conséquence de l'augmentation de la nutrition minérale consécutive à l'effet de la bactérie

sur le développement racinaire. Dans une revue récente, Desbrosses *et al.* (2012) expliquent les biais dans cette hypothèse. D'abord, les hormones végétales ont des effets systémiques sur la plante et leur impact n'est jamais limité à un seul organe ; il est donc peu probable que la bactérie affecte le développement racinaire à travers les voies hormonales de la plante sans modifier celui de la partie aérienne. Ensuite, les transporteurs d'ions dans les racines sont régulés par des signaux internes, en relation avec les besoins nutritionnels de la plante (Imsande & Touraine, 1994; Lappartient & Touraine, 1996; Lappartient *et al.*, 1999; Nazoa *et al.*, 2003), de sorte que le développement racinaire et les activités des transporteurs d'ions sont coordonnés de manière antagoniste pour maintenir le taux d'acquisition (Touraine, 2004). Ainsi, les mécanismes de régulation dépendant du statut nutritionnel devraient réguler à la baisse les systèmes d'absorption d'ions pour maintenir stable le niveau d'acquisition des nutriments en dépit de l'augmentation de surface racinaire (Mantelin & Touraine, 2004). Pour obtenir à la fois une augmentation d'absorption des éléments nutritifs et une stimulation de la croissance des plantes, la PGPR doit donc interférer avec les voies de régulation du développement par le statut nutritionnel. Pour ce faire, elle doit stimuler la croissance de la partie aérienne non comme une conséquence de l'augmentation de la surface racinaire, mais agir directement pour augmenter la croissance de la plante entière, feuilles et racines simultanément ; cette augmentation de vitesse de croissance conduit automatiquement à augmenter la vitesse d'absorption des nutriments pour soutenir la production de biomasse supplémentaire. D'autre part, les travaux de Cartieaux *et al.* (2003) sur le transcriptome d'*Arabidopsis* inoculé avec différentes souches de PGPR (dont STM196) ont montré que le profil d'expression génique est plus modifié dans les feuilles que dans les racines. Ainsi, tout indique que les modifications induites par les PGPR concernent autant les feuilles que les racines.

L'utilisation d'*Arabidopsis* a permis de confirmer l'implication de la voie de l'auxine dans la réponse de la plante aux PGPR, mais en identifiant un nouveau mécanisme : la modification du transport d'auxine endogène sans qu'un composé auxinique ne soit fourni à la plante par la bactérie. Cette découverte a été réalisée dans deux études, l'une utilisant la souche *Bacillus subtilis* GB03 émettrice de composés organiques volatils (VOC) (Zhang *et al.*, 2007) et l'autre utilisant *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 (Contesto *et al.*, 2010).

L'utilisation de la lignée transgénique d'*Arabidopsis* exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur *DR5* inductible par l'auxine révèle que l'exposition des plantes aux VOC émis par GB03, entraîne une diminution de l'accumulation de l'auxine dans les feuilles et une augmentation de son accumulation dans les racines (Zhang *et al.*, 2007). Cette redistribution de l'auxine indique que les VOC de GB03 activent le transport d'auxine vers les racines. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 (non productrice de VOC). La stimulation de l'élongation des racines latérales par cette bactérie requiert la voie de l'auxine : les mutants d'*Arabidopsis aux1* (affecté dans le transport d'auxine) et *axr1* (affecté dans la transduction du signal) ne présentent pas cette réponse (Contesto *et al.*, 2010). Pourtant, la souche STM196 produit des quantités très faibles d'auxine et l'inoculation d'*Arabidopsis* avec cette souche n'induit pas d'augmentation de la concentration moyenne d'auxine dans les racines. Ceci suggère que l'auxine est impliquée dans la réponse, mais qu'il s'agit d'auxine endogène et non d'auxine produite par la bactérie. L'augmentation de la coloration GUS dans les apex des racines primaires et latérales et l'augmentation de la longueur de la région colorée dans le cylindre central en amont du méristème chez les plantes *DR5::GUS* inoculée avec STM196 suggère que STM196 affecte le transport d'auxine dans la plante (Contesto *et al.*, 2010), comme cela a été observé avec GB03 (Zhang *et al.*, 2007).

Le développement racinaire est contrôlé de manière négative par la concentration de nitrate (Scheible *et al.*, 1997a; Forde & Lorenzo, 2001). La souche de PGPR *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 stimulant au contraire l'allongement des racines latérales, l'équipe de Bruno Touraine a posé la question de l'interaction entre les voies de régulation dépendant du nitrate et celles dépendant de la PGPR (Mantelin *et al.*, 2006a). Les résultats de cette étude montrent qu'il existe un antagonisme entre ces deux régulations, les PGPR levant l'inhibition de la croissance des racines latérales normalement exercée par les concentrations élevées de nitrate. De plus, l'inoculation d'*Arabidopsis* avec STM196 casse la corrélation négative qui lie normalement le développement des racines latérales avec la concentration foliaire de nitrate. Ceci indique que la PGPR doit affecter une étape en aval de la perception du statut azoté. Les facteurs impliqués dans la régulation du développement des racines latérales par STM196 et qui interfèrent avec le contrôle par le statut nutritionnel ne sont pas identifiés. Il est intéressant de remarquer que l'auxine est impliquée dans l'effet de STM196 sur les racines (Contesto *et al.*, 2010) et que les

modifications de statut azoté à la suite d'un changement de la concentration externe de nitrate induisent des modifications dans la distribution de l'auxine entre feuilles et racines (Walch-Liu *et al.*, 2006). Ainsi, l'auxine pourrait être impliquée dans l'interaction entre régulations dépendante du nitrate et dépendante de STM196, à un niveau qui reste à être identifié. L'étude transcriptomique sur les gènes des transporteurs d'ammonium et de nitrate n'a pas donné des modifications significatives du niveau des transcrits, suite à l'inoculation d'*Arabidopsis thaliana* avec STM196, à l'exception des gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* pour lesquels une forte surexpression a été observée (Mantelin *et al.*, 2006a).

L'utilisation d'*Arabidopsis* a également permis d'investiguer l'implication de la voie de l'éthylène dans l'effet des PGPR. Comme cela a été mentionné précédemment, plusieurs PGPR possèdent une activité ACC désaminase et l'hypothèse que cette activité puisse détourner le précurseur de la synthèse d'éthylène chez la plante, et ainsi lever partiellement l'inhibition de croissance exercée par cette hormone sur la racine de la plante, a été évoquée par plusieurs auteurs (Glick *et al.*, 1998). Les souches de *Pseudomonas putida* GR12-2 et UW4 affectées dans leur gène ACC désaminase (*acds*⁻) se montrent incapables de stimuler l'élongation des racines de colza, suggérant l'implication de la voie de l'éthylène dans la réponse de croissance racinaire aux souches sauvages correspondantes (Glick *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000). Cette conclusion n'est pas générale : la plupart des travaux réalisés avec *Arabidopsis* concluent à une implication modeste ou nulle de la voie de l'éthylène dans les réponses aux PGPR. Ainsi, la réponse de mutants d'*Arabidopsis* affectés dans des récepteurs de l'éthylène ou des éléments de sa voie de transduction est identique à la réponse des plantes sauvages quand ces plantes sont exposées aux VOC émis par *Bacillus subtilis* GB03 (Ryu *et al.*, 2003) ou inoculées par *B. megaterium* UMCV1 (López-Bucio *et al.*, 2007). Contesto *et al.* (2008) n'ont observé aucune différence dans la réponse d'architecture racinaire de plantules d'*Arabidopsis* à l'inoculation avec des bactéries mutantes *acds*⁻ ou les souches sauvages correspondantes : *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Pseudomonas putida* UW4, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K et *Mesorhizobium loti* MAFF303099. Finalement, l'activité *AcidS* des bactéries et son effet sur la voie de l'éthylène chez la plante ne semblent pas impliqués dans la stimulation du développement racinaire par la PGPR.

Si la plupart des études sur les interactions PGPR-plante se sont intéressées au phénotype d'architecture racinaire, les PGPR induisent une autre modification

morphologique d'intérêt, l'élongation des poils racinaires (Contesto *et al.*, 2008; Desbrosses *et al.*, 2009). Comme l'éthylène est un facteur clé dans la régulation de l'allongement des poils racinaires (Tanimoto *et al.*, 1995), la question du rôle de cette hormone dans l'effet de la PGPR sur leur élongation se pose. Afin d'étudier cette hypothèse, Contesto *et al.* (2008) ont inoculé des plantules d'*Arabidopsis* avec 4 souches de bactéries mutantes déficientes en activité AcdS (*acds*⁻) ou avec les souches sauvages correspondantes. La prédiction est que les mutants *acds*⁻ ne diminuent pas la quantité d'éthylène produite dans les racines comme peuvent le faire les bactéries sauvages qui ont une activité AcdS ; l'éthylène étant un régulateur positif de l'élongation des poils racinaires, ceux-ci doivent être plus longs chez les plantes inoculées avec une souche *acds*⁻ qu'avec une souche sauvage. C'est bien ce qu'observent Contesto *et al.* (2008). Cependant, ces résultats montrent que l'activité AcdS chez les souches PGPR sauvages peut expliquer une diminution de longueur des poils racinaires, non leur augmentation. Or ces souches PGPR induisent un allongement des poils racinaires d'un facteur 3 à 5 par rapport aux plantes non inoculées. Ainsi, si les PGPR peuvent affecter le développement racinaire via la voie de l'éthylène et leur activité AcdS, elles doivent aussi, de façon plus importante et positive, l'affecter par une autre voie. Chez *Arabidopsis*, l'élongation des poils racinaires est contrôlée essentiellement par deux hormones, l'éthylène et l'auxine (Pitts *et al.*, 1998). Or les travaux de Desbrosses *et al.* (2009) montrent que STM196 maintient son effet stimulateur sur l'élongation des poils racinaires chez des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans des gènes de la voie de l'éthylène comme dans celle de l'auxine. En conclusion, cet ensemble de résultats montre que la stimulation de l'élongation des poils racinaires par les PGPR implique une voie indépendante de l'éthylène et de l'auxine. Ce résultat est très original, tant les modèles d'élongation des poils racinaires envisagent un contrôle très majoritairement exercé par ces deux hormones, mais cette voie induite par les PGPR reste à identifier.

Le stress salin peut endommager les plantes par plusieurs mécanismes, le déficit en eau (stress osmotique causé par la forte concentration en sels), toxicité des ions Na⁺ et Cl⁻, déséquilibre nutritif, stress oxydatif. La tolérance au stress salin peut reposer sur différents mécanismes, dont le mouvement des ions Na⁺ et K⁺ évitant une accumulation trop forte des premiers et le maintien d'une nutrition potassique suffisante, et la production de composés osmoprotecteurs compatibles avec le fonctionnement cellulaire tels que la proline, la glycine bêtaïne et des polyols de sucre. L'exposition de plantules d'*Arabidopsis* aux VOC

de *B. subtilis* GB03 entraîne des modifications dans l'expression du gène *HKT1* : le niveau de transcrits diminue dans les racines tandis qu'il augmente dans les feuilles (Zhang *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis*, le produit de ce gène a une fonction de transporteur dans le phloème des feuilles : il récupère le Na^+ du xylème pour le charger dans le phloème et ainsi faciliter sa recirculation des feuilles vers les racines (Berthomieu *et al.*, 2003). Ce transfert de Na^+ vers les racines permet de diminuer la concentration de Na^+ dans les feuilles et par conséquent, de maintenir un rapport K^+/Na^+ suffisant dans cet organe. D'autre part, *HKT1* est impliqué dans l'absorption de Na^+ par les racines (Rus *et al.*, 2001). La différence dans la réponse d'expression de ce gène entre les feuilles et les racines suite à l'exposition de la plante à GB03 permet la diminution de l'accumulation de Na^+ et l'augmentation de K^+ dans les deux organes de la plante.

La seconde manière dont GB03 améliore la tolérance d'*Arabidopsis* au stress salin/osmotique repose sur la synthèse de composés osmoprotecteurs (choline et glycine bêtaïne). L'analyse du transcriptome montre la surexpression du gène *PEAMT* qui code l'enzyme phosphoethanolamine *N*-methyltransferase qui catalyse les trois étapes de méthylation nécessaire pour produire la choline, précurseur de la glycine bêtaïne. De manière complémentaire, le mutant d'*Arabidopsis xipotl* affecté dans la synthèse de cette enzyme a montré une faible tolérance au mannitol (Zhang *et al.*, 2010).

En utilisant encore le modèle d'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et la PGPR *Bacillus subtilis* GB03 productrice de VOC, il a été montré qu'une PGPR peut activer le mécanisme d'acquisition de fer par la plante, conduisant à une augmentation de son assimilation (Zhang *et al.*, 2009). D'abord, GB03 entraîne une acidification de la rhizosphère par stimulation de l'activité H^+ -ATPase de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme et du cortex de la racine. D'autre part, l'exposition aux VOC de GB03 induit une surexpression des gènes *FRO2* et *IRT1* codant respectivement la Fe^{3+} chélate réductase et le transport de Fe^{2+} à travers les racines. GB03 induit aussi l'expression du facteur de transcription *FIT1* qui régule positivement l'expression de *FRO2* et *IRT1* (Zhang *et al.*, 2009).

En plus d'améliorer la nutrition minérale, les PGPR semblent stimuler la photosynthèse et la fixation de carbone par les plantes. Ainsi, les travaux de Zhang *et al.* (2008) montrent que la souche GB03 induit une augmentation de la photosynthèse et du

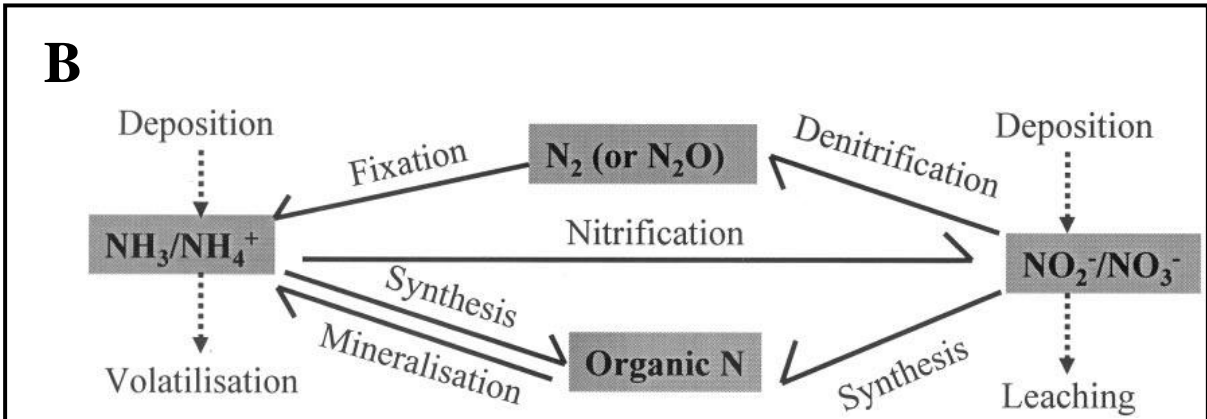
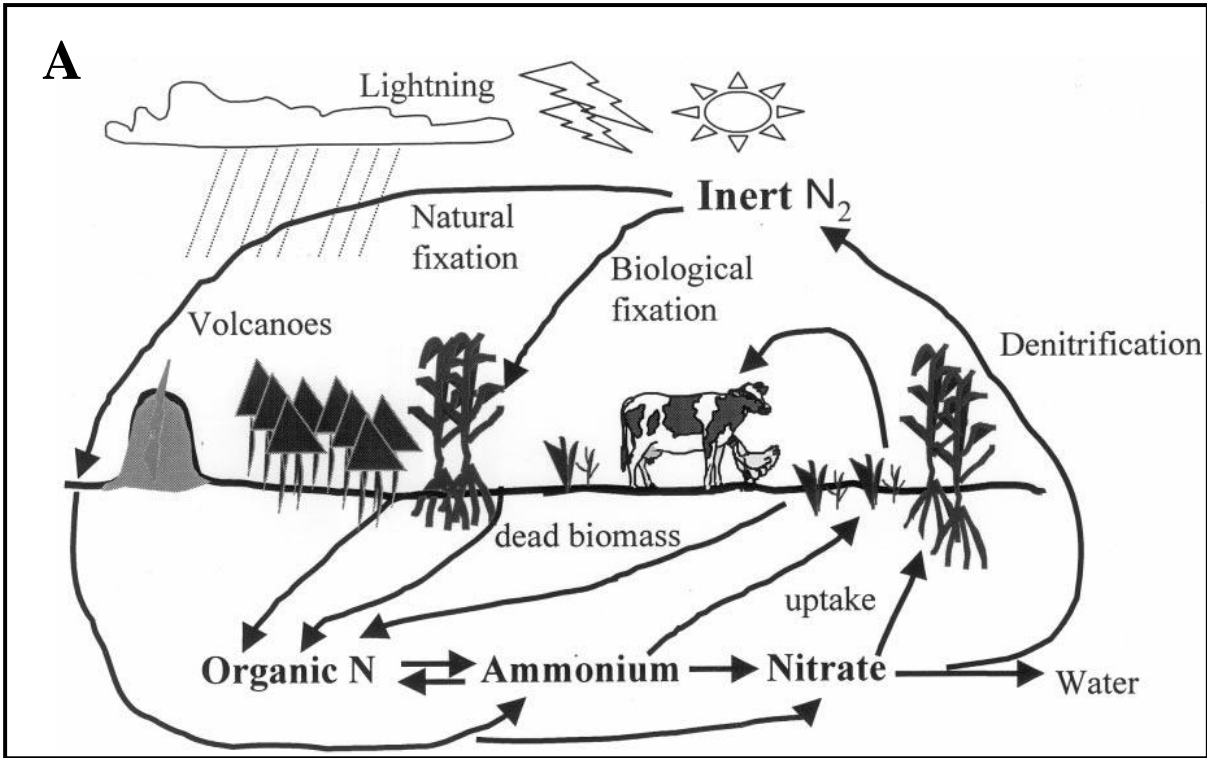


Figure 1.2. Cycle de l'azote selon Lin *et al.* (2000): (A) cycle de l'azote dans un écosystème à l'équilibre, (B) principaux processus impliqués dans le cycle biogéochimique de l'azote.

contenu en chlorophylle chez *Arabidopsis*. D'autre part, GB03 inhibe la voie classique de signalisation carbonée.

1.4. Nutrition azotée de la plante

L'azote passe par un cycle auquel participent des microorganismes, des végétaux et des animaux, ainsi que des facteurs environnementaux. Ceci est représenté sur la figure 1.2 (Lin *et al.*, 2000). Quantitativement, l'azote est le quatrième élément nutritif pour la plante après C, H et O. Il intervient de manière essentielle dans la composition de plusieurs molécules biologiques fondamentales telle que les nucléotides, les acides aminés et les protéines. Comme la disponibilité d'azote assimilable par la plante est généralement limitée dans la nature, c'est souvent la clé pour la croissance et le développement des plantes. La majorité des plantes peuvent absorber l'azote du sol sous forme organique et inorganique, mais privilégient les formes minérales nitrate (NO_3^-) et ammonium (NH_4^+). Les concentrations de ces ions varient selon le type de sol, la température et les différentes activités microbiennes. En condition agronomique, les formes minérales d'azote sont souvent apportées sous forme d'engrais. Les principales formes organiques présentes dans le sol sont l'urée, les acides aminés, les peptides et les protéines (Näsholm *et al.*, 2009).

1.4.1. Généralités sur la nutrition azotée

L'azote terrestre est majoritairement représenté par l'azote atmosphérique, N_2 , qui occupe 78% de l'atmosphère. La majorité des organismes vivants sont incapables d'utiliser cette forme d'azote très stable du fait de la triple liaison qui relie les deux atomes d'azote (Bloom, 2010). Certaines plantes sont capables de s'alimenter indirectement à partir de cette forme d'azote grâce à leur symbiose avec des microorganismes spécifiques ; ces derniers fixent l'azote atmosphérique et le convertissent en ammonium au sein de la nodosité formée par les tissus de la racine infectés par la bactérie (exemples : symbiose légumineuse-*Rhizobium*, symbiose *Casuarina-Frankia*). Des petites quantités de l'azote atmosphérique peuvent être déposées de l'atmosphère à la surface des feuilles et utilisées directement par ces organes ; cependant, cette source d'azote est anecdotique par rapport aux besoins de la plante (Orsel & Miller, 2010). La source d'azote de la majorité des plantes se trouve donc dans le sol. Comme cela a été mentionné ci-dessus, l'azote existe

sous deux grandes formes, minérale et organique, qui peuvent être directement utilisées par la plante (Bloom, 2010). Cependant, l'apport d'azote le plus élevé pour la plante est constitué par les formes minérales, NH_4^+ et NO_3^- . Dans la plupart des sols, l'activité nitrificatrice est rapide, transformant la plus grande partie des ions NH_4^+ en ions NO_3^- . De ce fait, dans la majorité des sols, les racines des plantes sont souvent en présence de concentrations de nitrate plus élevées que celle d'ammonium (Miller *et al.*, 2007).

L'absorption de NH_4^+ par la plante passe par des transporteurs AMT. L'analyse phylogénique chez *Arabidopsis* révèle la présence de deux familles de transporteurs d'ammonium AMT1 et AMT2 (Loqué & Wirén, 2004). L'utilisation d'un simple mutant affecté dans le gène *AMT1;1* réduit la capacité de la plante à absorber l'ammonium de 30% (Kaiser *et al.*, 2002). Le même résultat a été obtenu avec un simple mutant affecté dans le gène *AMT1;3*; le double mutant affecté dans ces deux gènes montre un effet additif des deux mutations (Loqué *et al.*, 2006).

L'accumulation d'ammonium peut être toxique pour la plante. Cependant, cette accumulation n'a pas lieu car, une fois absorbé, NH_4^+ est assimilé rapidement grâce à la coopération de deux enzymes. La glutamine synthétase (GS) catalyse la fixation d'un groupe amine au glutamate pour produire la glutamine; la glutamine oxoglutarate aminotransférase (GOGAT), ou glutamate synthase, catalyse le transfert d'un groupement amide de la glutamine au 2-oxoglutarate pour produire deux molécules de glutamate (Brugière *et al.*, 2001). Les différents acides aminés sont ensuite formés par des aminotransférases à partir d'acides cétoniques et du glutamate ou de la glutamine. Les acides aminés sont transportés dans la plante, entre cellules, grâce à des transporteurs spécifiques de la membrane plasmique; de nombreux gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés (Ortiz-Lopez *et al.*, 2000), d'urée (Liu *et al.*, 2003), d'oligopeptides (Steiner *et al.*, 1994; Koh *et al.*, 2002), de purines (Gillissen *et al.*, 2000) et de nucléosides (Li *et al.*, 2003) ont été identifiés. Ces transporteurs pourraient également être impliqués dans l'absorption d'azote organique par les racines mais leur rôle dans la nutrition azotée reste incertain à l'exception de l'urée (Miller & Cramer, 2004) qui semble pouvoir être une source d'azote importante (Witte, 2011).

1.4.2. L'absorption de nitrate

Les ions NO_3^- représentant la principale source d'azote pour la majorité des plantes. L'absorption de NO_3^- , c'est-à-dire la traversée de la membrane plasmique d'une cellule de l'épiderme ou du cortex racinaires par les ions NO_3^- est donc une étape particulièrement importante, puisque c'est celle qui détermine la quantité d'azote prélevée par la plante pour sa croissance.

1.4.2.1. Aspects physiologiques de l'absorption de NO_3^-

Les travaux pionniers d'Epstein (1953) sur le transport de potassium ont mis en évidence l'équivalence entre les cinétiques d'absorption (vitesse d'absorption en fonction de la concentration de l'ion dans le milieu de culture) du potassium dans les racines et les cinétiques enzymatiques (vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat). Cette démarche a abouti à l'hypothèse de systèmes de transports protéiques catalysant la traversée des ions à travers la membrane plasmique à la manière des enzymes qui catalysent la transformation d'un produit en substrat (Epstein, 1953). Les points expérimentaux obtenus en mesurant les influx de K^+ sur des temps courts (de l'ordre de la minute) en fonction de la concentration de K^+ externe s'ajustent mathématiquement selon deux courbes (Epstein & Hagen, 1952; Epstein, 1953, 1966). Aux faibles concentrations externes ($< 1 \text{ mM}$), les points expérimentaux s'ajustent à une hyperbole assimilable à une cinétique enzymatique de type Michaelis-Menten d'ordre 1. Aux concentrations externes plus élevées, les points expérimentaux s'écartent de cette hyperbole, indiquant la présence d'un second système de transport qui se superpose au premier, saturé aux concentrations supérieures à 1 mM . La courbe mathématique déduite par soustraction de l'influx maximal calculé pour la première courbe des points expérimentaux obtenus pour les valeurs de concentration externe de l'ion supérieures à 1 mM a d'abord été ajustée par Epstein à une seconde hyperbole. Cette analyse l'a conduit à émettre l'hypothèse de l'existence de deux systèmes de transport : un système de transport de type I caractérisé par une forte affinité et une faible capacité (opérant dès les faibles concentrations) et système de transport de type II caractérisé par une faible affinité et une forte capacité (opérant aux fortes concentrations).

Le formalisme décrit par Epstein d'abord pour les ions K^+ a ensuite été retrouvé pour tous les ions absorbés par la racine. Si la courbe d'influx en fonction de la concentration externe est toujours hyperbolique (donc caractérisée par une constante d'affinité K_m et une vitesse maximum d'absorption V_{max}), le meilleur ajustement de celle qui décrit le fonctionnement du système de transport II peut être hyperbolique ou linéaire selon l'espèce végétale et l'ion considéré. Ainsi, pour NO_3^- , il est généralement décrit un ajustement à une hyperbole pour des concentrations inférieures à 0,5 mM et un ajustement à une droite pour les concentrations de l'ordre de la millimole à la dizaine de millimoles par litre (Siddiqi *et al.*, 1990). Les travaux de l'équipe d'Anthony Glass ont caractérisé en détail ce fonctionnement et les facteurs affectant les deux systèmes de transport renommés Système de Transport à Forte Affinité (HATS) pour le système de transport de type I et Système de Transport à Faible Affinité (LATS) pour le système de transport de type II. Ainsi, deux systèmes HATS ont été distingués selon que les plantes aient été ou non privées de nitrate pour des périodes de plusieurs jours avant de les installer sur différentes concentrations pendant quelques minutes pour mesurer la vitesse d'absorption. La valeur de V_{max} du HATS sont beaucoup plus faibles chez les plantes privées de nitrate ; la réalimentation des plantes avec du nitrate pendant quelques heures suffit à atteindre des valeurs élevées de V_{max} indiquant que l'ion NO_3^- a permis l'induction de systèmes de transport. Les valeurs de K_m calculées pour le HATS chez les plantes préalablement privées de nitrate ou réalimentées en nitrate étant différentes, on a admis l'existence de deux HATS différents, l'un inductible noté iHATS et l'autre constitutif noté cHATS (Siddiqi *et al.*, 1990; Aslam *et al.*, 1992; Glass & Siddiqi, 1995).

Du point de vue énergétique, l'absorption de NO_3^- est toujours réalisée contre le gradient de potentiel électrochimique de l'ion du fait de la différence de potentiel électrique négative entre le cytoplasme et l'apoplasme (-100 à -250 mV) et de la concentration cytosolique de nitrate généralement supérieure à la concentration externe ; même dans les cas où la concentration externe est très élevée et supérieure à la concentration cytosolique, le gradient de concentration n'est jamais suffisamment en faveur de l'entrée de l'ion pour que la composante osmotique du potentiel électrochimique compense la composante électrique très positive (Miller & Smith, 1996). L'absorption de nitrate requiert donc de l'énergie. Celle-ci est fournie par les ions H^+ transportés avec les ions NO_3^- par des systèmes de co-transport (symport $NO_3^-:H^+$) : le transport spontané des H^+ de l'extérieur vers le cytoplasme entraîne celui des ions NO_3^- dans le même sens. La

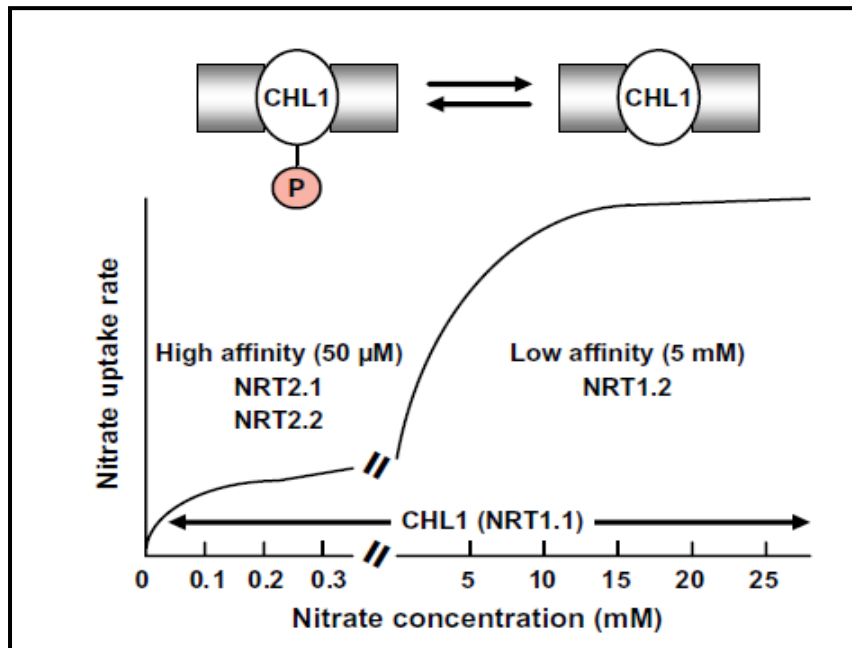


Figure 1.3. Les deux systèmes d'absorption de nitrate chez *Arabidopsis* selon Tsay *et al.* (2007). AtNRT1.1 (CHL1) est un transporteur fonctionnant comme un système à forte et à faible affinité (HATS et LATS, respectivement) selon son état de phosphorylation. AtNRT2.1 et AtNRT2.2 sont des transporteurs de nitrate à forte affinité inductibles par les ions NO_3^- (iHATS). AtNRT1.2 est un transporteur de nitrate à faible affinité constitutif (cLATS).

stoechiométrie du symport est de 2 H⁺ transportés avec 1 NO₃⁻, rendant ce symport électrogène dépolarisant (Thibaud & Grignon, 1981).

1.4.2.2. Transporteurs de NO₃⁻

Les transporteurs de nitrate ont été identifiés dans les années 1990 chez différentes espèces végétales mais surtout chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* par des approches génétiques et moléculaires (Touraine *et al.*, 2001). Les transporteurs de nitrate identifiés appartiennent à deux familles : la famille « Nitrate-Nitrite Porter » (NNP) et la famille « Peptide Transporter family » (PTR).

Le premier transporteur de nitrate identifié au niveau moléculaire chez les plantes est NRT1.1, cloné chez *Arabidopsis* grâce à des mutants résistants au chlorate, analogue toxique du nitrate (Tsay *et al.*, 1993). Le gène *NRT1.1* appartient à la famille PTR qui compte 53 membres chez *Arabidopsis* (Tsay *et al.*, 2007). L'analyse fonctionnelle a indiqué que seules les protéines NRT1.1 à NRT1.8 sont impliquées dans le transport de nitrate. NRT1.1 est en général un transporteur à faible affinité (Touraine & Glass, 1997) mais il semble pouvoir se comporter comme un transporteur de nitrate à faible ou à forte affinité selon son état de phosphorylation (Figure 1.3) (Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Dans le système racinaire, l'expression du gène *NRT1.1* est localisée dans les apex des racines principales et secondaires (Guo *et al.*, 2001). Ce profil d'expression suggère qu'il ne joue pas un rôle important dans l'absorption de nitrate par la plante puisque, les vaisseaux xylémiens n'étant pas matures dans ces régions de la racine, elles ne peuvent pas participer à l'alimentation en azote des organes aériens. L'étude fonctionnelle de mutants perte-de-fonction dans *NRT1.1* confirme cette prédiction (Touraine & Glass, 1997). Ho *et al.* (2009) ont montré que NRT1.1 a également une fonction dans la perception du nitrate en amont de processus de signalisation impliqués dans le contrôle du développement racinaire et de la germination des graines (Ho & Tsay, 2010). De plus, Krouk *et al.* (2010) ont montré que NRT1.1 est capable de faciliter le transport d'auxine, cette fonction étant antagoniste de celle de transport de nitrate. Cette découverte les a conduit à proposer l'hypothèse de l'implication de NRT1.1 dans la répression de la croissance des racines latérales à des concentrations faibles de nitrate (dans ces conditions de non compétition avec le nitrate, compte tenu de la localisation cellulaire de NRT1.1, le transport d'auxine hors des racines est stimulé). L'expression du gène *NRT1.2* est localisée

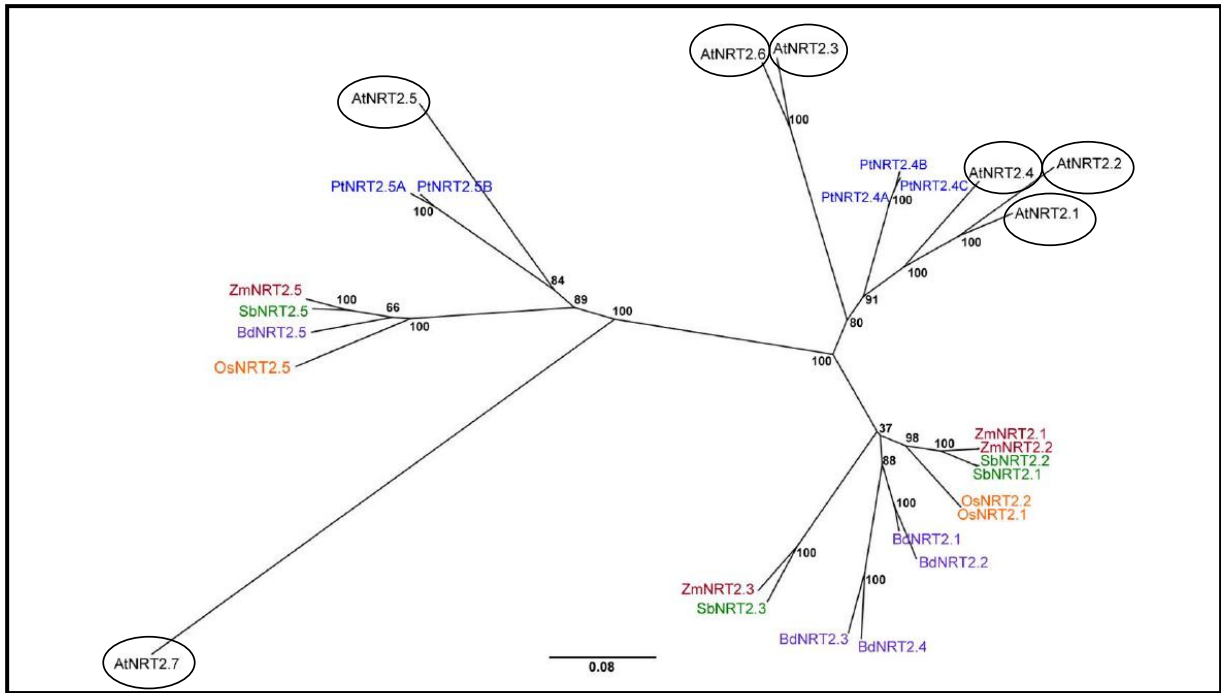


Figure 1.4. Arbre phylogénique de la famille des transporteurs de nitrate NRT2 chez *Arabidopsis* (noire), peuplier (bleu) et 4 espèces de graminées : riz (orange), sorgho (vert), maïs (rouge) et *Brachypodium* (violet) (Plett *et al.*, 2010).

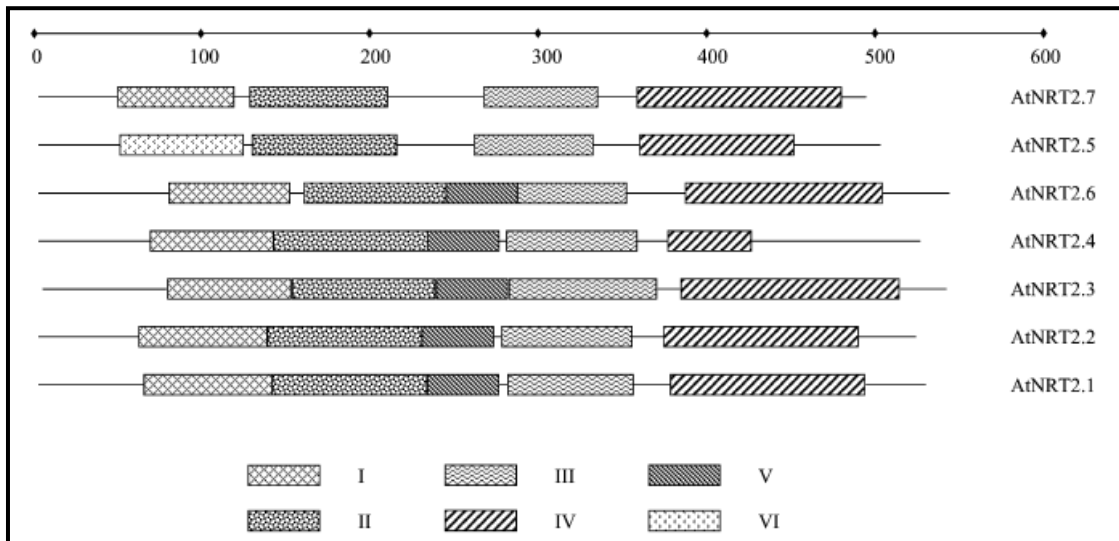


Figure 1.5. Comparaison des différentes séquences en acides aminés des 7 protéines de la famille NRT2 d'*Arabidopsis* d'après Orsel *et al.* (2002).

dans les poils racinaires et les cellules épidermiques des racines, suggérant que la protéine NRT1.2 est impliquée dans l'absorption de nitrate (Huang *et al.*, 1999). L'expression de *NRT1.3* dans les racines est réprimée par l'exposition au nitrate et induite par le manque de nitrate, comme celle de *NRT1.1* (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). Quant au gène *NRT1.4*, il est exprimé dans les pétioles et la nervure principale des feuilles mais non dans les racines ; il coderait donc pour un transporteur impliqué dans le stockage du nitrate et sa distribution dans les feuilles (Chiu *et al.*, 2004). Le gène *NRT1.5* est exprimé dans les cellules du péricycle et il pourrait opérer dans le sens de l'efflux de nitrate du péricycle vers les vaisseaux du xylème et ainsi participer dans la charge en nitrate de la sève brute dans les racines (Lin *et al.*, 2008). Le gène *NRT1.6* est exprimé dans les tissus vasculaires des siliques où il assure le transport de nitrate des tissus maternelles vers les embryons en voies de développement mais ne semble pas avoir de rôle dans l'absorption de nitrate (Almagro *et al.*, 2008). *NRT1.7* joue un rôle dans la remobilisation de nitrate des vieilles feuilles vers les feuilles jeunes (Fan *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2010) ont montré que le gène *NRT1.8* est exprimé dans les cellules parenchymateuses du xylème, dans les feuilles comme dans les racines, et son rôle serait la décharge du nitrate de la sève brute dans les tissus environnants, dans les régions âgées de la racine et dans les organes aériens.

Les transporteurs de nitrate de la famille NNP sont des transporteurs à forte affinité comprenant des cHATS et des iHATS (Tsay *et al.*, 2007). Cette famille, dénommée NRT2, comporte 7 membres. La figure 1.4 présente l'arbre phylogénique de cette famille chez *Arabidopsis* et 5 autres espèces végétales réalisé par Plett *et al.* (2010).

La figure 1.5 présente une analyse de comparaison de séquences protéiques prédites.

Le premier membre de la famille NRT2 à avoir été caractérisé, *NRT2.1*, est localisé au niveau de la membrane plasmique (Chopin *et al.*, 2007b). Il est fortement exprimé dans la racine, et plus particulièrement dans les zones matures de cet organe, suggérant un rôle important dans l'absorption de NO_3^- (Naoza *et al.*, 2003). L'étude de mutants a démontré qu'il est le transporteur principal pour l'absorption de NO_3^- et qu'il a les caractéristiques d'un iHATS (Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004). Le gène *NRT2.2* a été localisé à proximité du gène *NRT2.1* sur le chromosome 1 d'*Arabidopsis* (Li *et al.*, 2007). L'expression de *NRT2.2* a également été retrouvée dans les racines. Un effet de compensation entre ces deux gènes a été observé : quand l'expression de l'un d'eux est réduite, l'autre gène est fortement exprimé. Cependant, l'étude des simples et des doubles

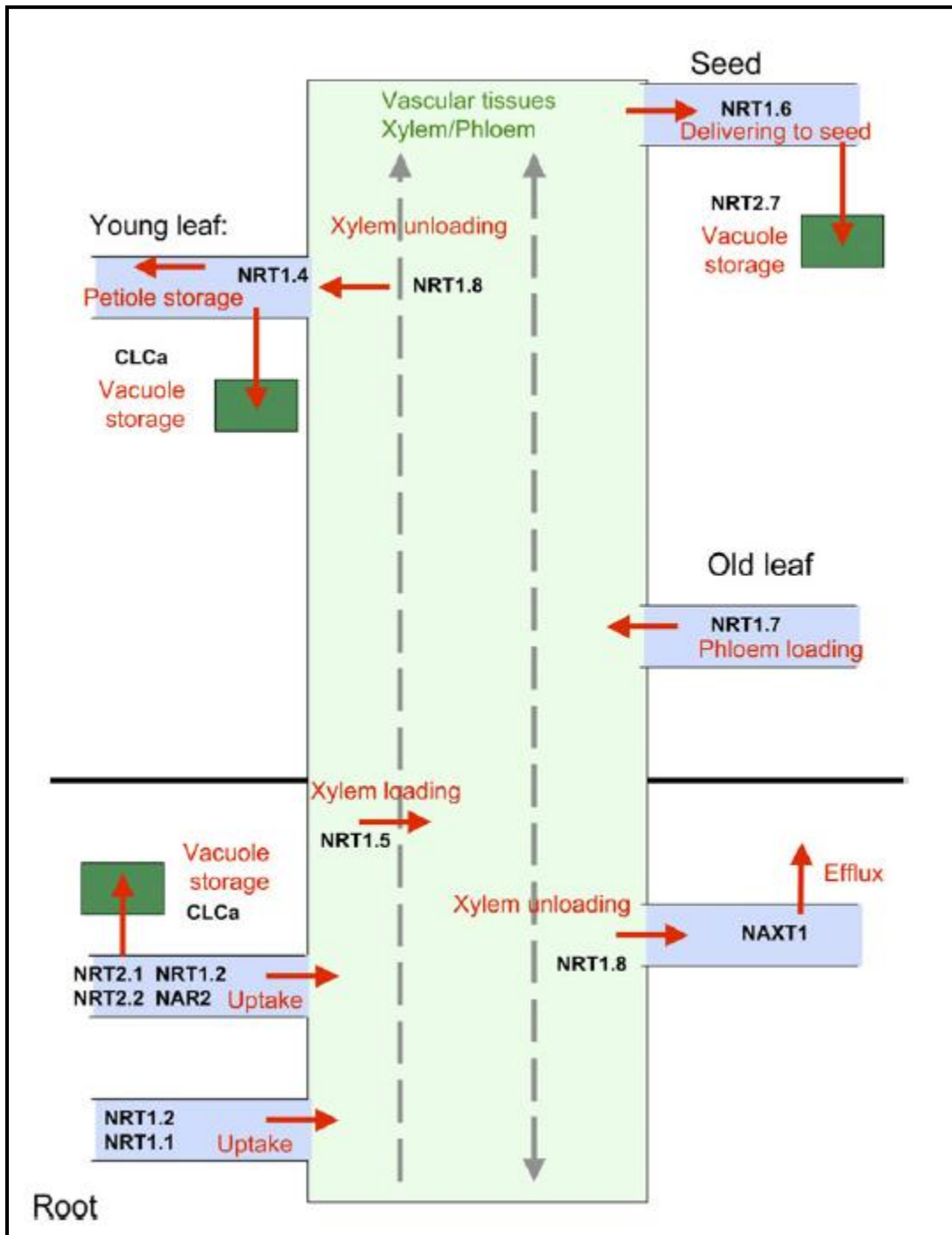


Figure 1.6. Implication des différents transporteurs de nitrate dans les mouvements de l'ion dans la plante *Arabidopsis thaliana* d'après Dechornat *et al.* (2011).

mutants de ces deux gènes a montré que NRT2.1 est responsable de 72% de l'activité du HATS de NO_3^- tandis que NRT2.2 ne contribue que faiblement à l'absorption de NO_3^- (Li *et al.*, 2007). L'expression du gène *NRT2.3* est variable au cours du cycle de développement de la plante, mais il ne constitue pas non plus un acteur important de l'absorption de NO_3^- (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). La protéine NRT2.4 est localisée au niveau de la membrane plasmique des épidermes des racines latérales et à proximité du phloème dans les parties aériennes (Kiba *et al.*, 2012). Les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* sont plus fortement exprimés dans les feuilles que dans les racines (Mantelin *et al.*, 2006a), mais le rôle des protéines qu'ils codent n'est pas connu. Quant au gène *NRT2.7*, la localisation de son expression dans les organes reproducteurs et la localisation de la protéine dans le tonoplaste suggèrent un rôle dans le stockage de NO_3^- dans les graines (Chopin *et al.*, 2007a).

La figure 1.6 représente le rôle des différents transporteurs de NO_3^- dans les différentes fonctions de transport de nitrate dans la plante.

1.4.3. Assimilation du nitrate

Une fois absorbé par la racine, le nitrate peut soit être stocké temporairement dans les vacuoles des cellules racinaires, soit être assimilé dans ces cellules pour synthétiser des acides aminés, soit être transporté vers les feuilles par la sève brute dans le xylème. Dans les organes aériens, les ions NO_3^- peuvent être soit accumulés dans les vacuoles soit assimilés en acides aminés. La concentration de NO_3^- dans le cytoplasme est maintenue à un niveau relativement bas (de l'ordre de la millimole par litre). L'alimentation en NO_3^- du métabolisme azoté, qui débute dans le cytoplasme et se poursuit dans le plaste, est entretenue par la remobilisation rapide du NO_3^- vacuolaire. Les fortes concentrations vacuolaires de nitrate participent au maintien de la pression osmotique de la cellule, et donc à sa turgescence (Meyer & Stitt, 2001).

L'assimilation du nitrate en acides aminés implique une série d'enzymes (Figure 1.7). La première étape consiste dans la réduction des ions NO_3^- en NO_2^- (nitrite) par la nitrate réductase (NR), enzyme cytosolique utilisant NADH comme pouvoir réducteur. Les ions NO_2^- doivent ensuite gagner le plaste où ils sont réduits en NH_4^+ (ammonium) par la nitrite réductase (NiR) en utilisant la ferrédoxine comme source de pouvoir réducteur. L'assimilation des ions NH_4^+ implique deux enzymes, la glutamine synthétase (GS) et la

glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) ou glutamate synthase, qui opèrent également dans le plaste (Miller & Cramer, 2004).

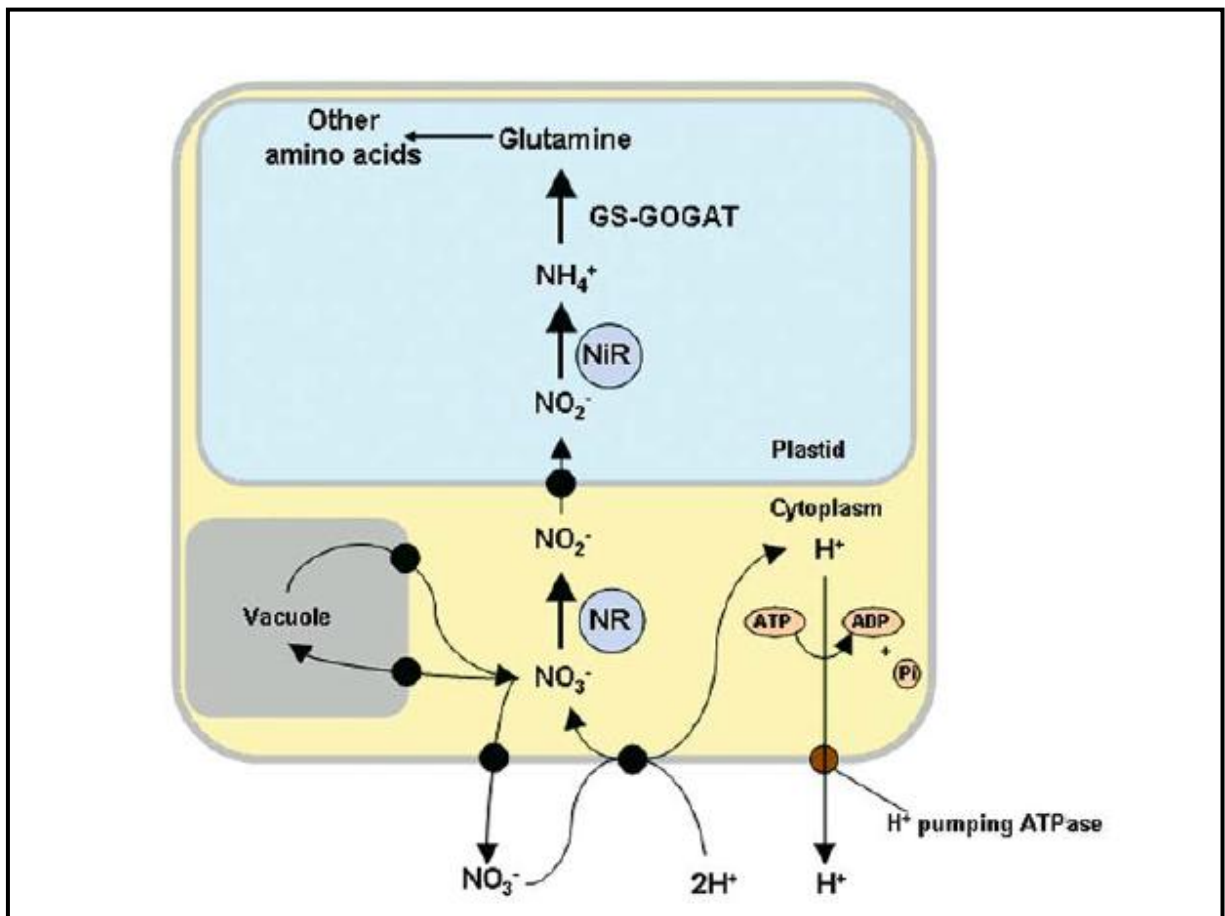
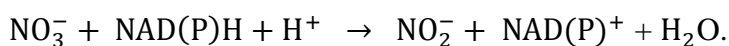


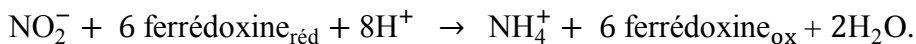
Figure 1.7. Assimilation du nitrate dans une cellule végétale. NR, nitrate réductase ; NiR, nitrite réductase ; GS, glutamine synthétase ; GOGAT, glutamine oxoglutarate aminotransférase (Crawford *et al.*, 2000).

La nitrate réductase est un homodimère ; chaque sous-unité catalyse le transfert de deux électrons de NAD(P)H aux ions NO_3^- à travers plusieurs centres redox : une flavine adénine dinucléotide (FAD), un hème (Cytochrome 557) et un cofacteur à molybdoptérine (Solomonson & Barber, 1990). On trouve trois formes de NR chez les plantes, selon que leur donneur d'électrons est spécifiquement le NADH, ou spécifiquement le NADPH, ou encore alternativement l'un ou l'autre. Chez *Arabidopsis*, on ne trouve que des NR spécifiques pour le NADH (Wilkinson & Crawford, 1993). La réaction catalysée par la NR dans le cytoplasme est la suivante (Miller & Cramer, 2004) :



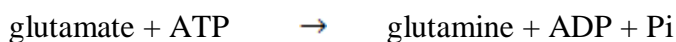
Chez *Arabidopsis*, il existe deux gènes codant une NR, dénommés *NIA1* et *NIA2* ou *NR1* et *NR2* respectivement. Les analyses de simples et de doubles mutants ont montré que *NR2* (*NIA2*) est responsable d'environ 90% de la réduction du nitrate dans la plante, et que celle-ci est majoritairement localisée dans les feuilles chez *Arabidopsis*. L'expression des gènes *NR* est fortement induite par son substrat NO_3^- . De manière générale, cet ion est considéré comme un signal pour l'induction de toute la voie d'assimilation de nitrate, de son absorption à l'assimilation de l'ammonium en passant par la réduction du nitrate (Crawford, 1995; Daniel-Vedele & Caboche, 1996; Sivasankar & Oaks, 1996). Cette induction est rapide même à des concentrations très faibles ($<10\mu\text{M}$), ce qui suggère que, dans ce processus de régulation, le nitrate agit plus comme un signal (comme le ferait une hormone) que comme un nutriment (Crawford, 1995).

La nitrite réductase (NiR) une enzyme plastidiale (plastides des racines et chloroplastes des feuilles) codée par le génome nucléaire (Wray, 1993). Cette enzyme à deux centres redox, un sirohème et un groupe fer-soufre et catalyse la réduction de NO_2^- en NH_4^+ en transférant 6 électrons de la ferrédoxine réduite au NO_2^- (Miller & Cramer, 2004) selon la réaction suivante (Farineau & Morot-Gaudry, 2006) :

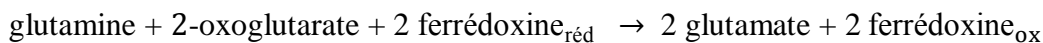


La NiR est induite par NO_3^- et NO_2^- (Barneix *et al.*, 1984).

L'ammonium formé à partir de la réduction de NO_3^- par la NR et la NiR est assimilé par les enzymes GS et GOGAT. La première greffe un groupement NH_2 au glutamate en consommant de l'ATP pour produire de la glutamine (Miller & Cramer, 2004) selon la réaction suivante (Farineau & Morot-Gaudry, 2006) :



La glutamate synthase (GOGAT) catalyse le transfert du groupement amide de la glutamine au 2-oxoglutarate (ou α -cétoglutarate), pour produire deux molécules de glutamate (Miller & Cramer, 2004) ; cette réaction consomme de la ferrédoxine réduite (Farineau & Morot-Gaudry, 2006):



Il existe deux formes de GS: l'une présente dans les plastes (GS2) et l'autre localisé dans le cytosol (GS1), cette dernière étant plus présente dans les racines (Brugière *et al.*, 2001). De même, la GOGAT présente deux types d'activité: l'une dépend de la ferrédoxine (Fd-GOGAT) et l'autre des pyridines nucléotides (NAD(P)H-GOGAT), mais les deux sont localisées dans les plastes (Brugière *et al.*, 2001; Miller & Cramer, 2004; Farineau & Morot-Gaudry, 2006).

Chapitre 2 :

Effet de différentes concentrations de nitrate extérieures sur la croissance de la plante en présence de la mutation *nrt2.1* et de la PGPR *Phyllobacterium brassicacearum* STM196

2.1. Introduction

La souche PGPR *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 est une bactérie isolée de la rhizosphère du colza qui induit une stimulation de la croissance de cette plante (Bertrand *et al.*, 2001; Larcher *et al.*, 2003). Cette même souche a également la capacité de stimuler la croissance de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Mantelin *et al.*, 2006a). L'équipe où a été effectué ce travail de thèse étudie les voies de signalisations activées chez la plante par la bactérie, en utilisant l'interaction STM196 – *Arabidopsis* comme modèle d'étude.

Les données précédemment publiées montrent que STM196 augmente la vitesse de croissance (production de biomasse) (Mantelin *et al.*, 2006a). L'augmentation du poids de matière sèche est parallèle à celle du poids de matière fraîche, indiquant que la bactérie ne change pas le statut hydrique des plantes (Bruno Touraine, communication personnelle). La stimulation de la vitesse de croissance s'accompagne d'une stimulation de l'allongement des racines latérales (Mantelin *et al.*, 2006a; Contesto *et al.*, 2010) et de l'élongation des poils racinaires (Contesto *et al.*, 2008). Du point de vue nutritionnel, le surcroît de biomasse produite ne se traduit pas par une dilution de l'azote : le rapport C/N est plus faibles chez les plantules inoculées alors qu'elles produisent plus de biomasse que les plantes non inoculées (Mantelin *et al.*, 2006a). Ceci suggère que, soit STM196 agit en priorité sur la nutrition minérale, azotée en particulier, et c'est l'augmentation de celle-ci qui entraîne l'augmentation de la vitesse de croissance, soit elle agit bien sur le développement comme l'hypothèse en a été souvent émise pour les PGPR (« phytostimulation ») mais l'augmentation de croissance entraîne indirectement une augmentation de l'absorption pour soutenir la production de biomasse (en altérant les mécanismes de régulation par le statut nutritionnel qui, autrement, limitent l'absorption). Comme on sait que, chez des plantes non inoculées, la concentration extérieure de NO_3^- affecte à la fois la croissance de la plante par fourniture d'azote au métabolisme et le développement racinaire par des voies régulatrices, la question de la relation entre les effets de STM196 sur la plante et la nutrition azotée se pose de manière centrale. Ce chapitre présente des données d'expériences visant à préciser cette relation.

Considéré comme la principale source d'azote pour la plante pour la majorité des espèces et dans la majorité des écosystèmes, l'ion NO_3^- n'est pas qu'un nutriment qui

participe à la biosynthèse des acides aminés (et par la suite de toutes les molécules organiques azotées), à travers sa réduction en NO_2^- puis en NH_4^+ . Il est également indispensable comme un des principaux anions mobiles dans la plante : il participe au maintien de la turgescence cellulaire (Waraich *et al.*, 2011) et c'est un élément essentiel pour la conduction des ions entre les cellules des racines et des feuilles, dans la sève brute où il assure une large part de la neutralité électrique (Salsac *et al.*, 1987). Il joue également un rôle de signal de régulation dans le contrôle du métabolisme et du développement (Crawford, 1995; Stitt, 1999). Parmi les processus développementaux régulés par NO_3^- on peut citer la germination (Alboresi *et al.*, 2005), l'architecture racinaire (Zhang *et al.*, 1999), l'émergence et la croissance des feuilles (Guo *et al.*, 2002; Rahayu *et al.*, 2005) et la floraison (Castro Marín *et al.*, 2011). Les analyses des modifications du transcriptome d'*Arabidopsis* induites par la carence en azote (la seule source de N étant NO_3^- dans ces expériences) ou par la fourniture de NO_3^- à des plantes préalablement carencées dans cet ion ont montré l'importance de ses effets sur la régulation de l'expression génique : des modifications d'expression de plus de 10% du transcriptome détecté ont été rapportées (Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004). Ces variations sont très rapides (quelques minutes), suggérant que c'est l'ion NO_3^- lui-même, et non un produit de son métabolisme, qui agit comme un signal régulateur.

Les ions NO_3^- exercent un double contrôle sur le développement des racines latérales : à faible concentration, ils stimulent leur allongement tandis qu'à concentration élevée (> 10 mM), ils l'inhibent. L'inhibition du développement des racines latérales est observée chez les mutants affectés dans leur activité nitrate réductase (Zhang *et al.*, 1999), indiquant qu'elle ne dépend pas du métabolisme azoté ou d'un composé formé par celui-ci, mais de l'ion NO_3^- lui-même. Il existe une corrélation négative entre la concentration de NO_3^- foliaire et la longueur des racines de plantes dont la nutrition azotée est manipulée soit par la concentration extérieure de NO_3^- soit génétiquement (mutations dans les gènes de nitrate réductase). Ceci a été montré chez *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 1999; Tranbarger *et al.*, 2003), mais l'étude la plus exhaustive a été réalisée chez le tabac (Scheible *et al.*, 1997b). L'augmentation de la teneur foliaire de NO_3^- qui est due à une augmentation de la concentration de l'ion dans la solution de culture (permettant une meilleure croissance de la plante) ou celle qui est due à une diminution de l'activité nitrate réductase chez un mutant (réduisant la croissance de la plante) ont le même effet inhibiteur sur le développement racinaire : une même corrélation négative relie l'allocation relative de

biomasse aux racines à la concentration foliaire de NO_3^- . Ceci indique que (i) l'inhibition du développement des racines latérales en alimentation nitrique élevée ne dépend pas de la concentration externe de l'ion mais de sa concentration interne, (ii) le pool régulateur est un pool foliaire et cette régulation est donc systémique, impliquant la circulation d'un signal de la feuille jusque dans la racine. La nature de ce signal n'est pas connue. Une hypothèse propose que cette régulation implique l'auxine, hormone circulant majoritairement des parties aériennes vers les racines. Le nitrate accumulé dans les feuilles pourrait inhiber ce flux d'auxine et diminuer son accumulation dans les méristèmes racinaires qui sont responsables de la croissance de ces organes (Forde, 2002). Cette hypothèse est renforcée par les résultats de Walch-Liu *et al.* (2006) sur des plantes d'*Arabidopsis* transférées d'une solution de culture à concentration de NO_3^- très élevée (50 mM) à une solution de culture à concentration de NO_3^- modérée (1 mM). Dans ces expériences, la concentration moyenne d'auxine diminue dans les parties aériennes et augmente dans les racines après le transfert des plantes. Ces observations sont compatibles avec l'hypothèse d'une allocation de l'auxine aux racines plus forte chez les plantes qui ont une teneur en NO_3^- foliaire plus faible. Une autre hormone, l'acide abscissique (ABA), pourrait aussi être impliquée dans l'inhibition du développement des racines latérales aux concentrations extérieures de NO_3^- élevées. En effet, l'inhibition du développement des racines latérales aux concentrations élevées de NO_3^- est en partie levée chez des mutants altérés dans la voie de signalisation de l'ABA (Signora *et al.*, 2001). Inversement, l'ajout d'ABA augmente l'effet inhibiteur sur les racines latérales (De Smet *et al.*, 2003).

A côté de l'effet inhibiteur de NO_3^- sur le développement des racines latérales décrit dans le paragraphe précédent, les ions NO_3^- ont aussi un effet stimulateur sur le développement des racines latérales. Il existe deux grandes différences entre ces deux effets : (i) alors que l'effet inhibiteur est systémique, l'effet stimulateur est local (les racines qui sont en contact avec NO_3^- se développent plus que celles qui n'ont pas de NO_3^- dans leur environnement) ; (ii) il suffit de faibles concentrations de NO_3^- pour stimuler la croissance des racines latérales (la présence de NO_3^- stimule leur croissance localement, mais l'augmentation de la concentration de cet ion l'inhibe par l'effet systémique) (Zhang & Forde, 1998). Plusieurs résultats suggèrent que la voie de l'auxine est également impliquée dans cette stimulation localisée. Le premier élément en faveur de cette hypothèse est que le mutant résistant à l'auxine *axr4* est inhibé dans la réponse locale des racines latérales à NO_3^- (Zhang *et al.*, 2009). Le second élément a été identifié plus

récemment par une équipe montpelliéraine : Krouk *et al.* (2010) ont montré que le gène *NRT1.1*, d'abord identifié seulement comme un transporteur de NO_3^- à faible affinité (Tsay *et al.*, 1993; Touraine & Glass, 1997), contrôle la distribution de l'auxine dans les racines latérales émergentes en relation avec la concentration locale de NO_3^- . L'interaction entre flux d'auxine et NO_3^- est expliquée par le fait que *NRT1.1* est à la fois un transporteur de NO_3^- et un transporteur d'acide 3-indole acétique (IAA), et que l'activité de transport d'IAA est inhibée par NO_3^- . En absence de NO_3^- , *NRT1.1* transporterait l'IAA de la pointe de la racine émergente vers sa base, ce qui maintiendrait un niveau d'accumulation d'auxine faible dans le méristème de la jeune racine émergente ; en présence de NO_3^- , l'inhibition du transport d'IAA entraînerait une forte accumulation d'auxine dans le méristème de la jeune racine latérale. Ainsi, en absence de NO_3^- , la racine latérale ne pourrait pas se développer par manque d'auxine dans le méristème et la présence de NO_3^- lèverait cette inhibition. Un autre transporteur de NO_3^- , le transporteur à forte affinité *NRT2.1*, a été identifié comme impliqué dans la régulation de l'architecture racinaire. Tandis que les effets précédents (régulation systémique et régulation locale dépendante de *NRT1.1*) contrôlent l'activité des primordia racinaires et/ou des méristèmes des racines émergentes, *NRT2.1* serait impliqué dans le contrôle d'un stade plus précoce, l'initiation des primordia (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006).

L'effet de STM196 sur le développement des racines latérales est très similaire mais opposé à l'effet systémique des fortes concentrations de NO_3^- (même stade post-émergence affecté). Une étude combinant l'inoculation avec STM196 avec différentes concentrations de NO_3^- dans le milieu a démontré qu'il s'agit bien d'effets antagonistes, STM196 levant l'inhibition exercée par les fortes concentrations de NO_3^- (Mantelin *et al.*, 2006a). Ceci indique que la bactérie affecte une voie de signalisation commune, au moins en partie, avec la régulation systémique exercée par le nitrate. D'autre part, Mantelin *et al.* (2006a) ont également identifié deux gènes codant pour des transporteurs potentiels de NO_3^- , *NRT2.5* et *NRT2.6*, comme cibles de la bactérie (leur expression est fortement stimulée par STM196). Le rôle de ces deux gènes dans la réponse d'*Arabidopsis* à STM196 est étudié dans le chapitre 3. Avant de réaliser cette étude, des analyses préliminaires étaient nécessaires. Ce chapitre présente ces travaux dont les objectifs sont : (i) caractériser la courbe de croissance de STM196 afin de maîtriser la préparation de l'inoculum, (ii) vérifier l'effet de l'inoculation sur la croissance de plantes cultivées en terreau avec différents niveaux d'apports d'azote, et (iii) analyser la réponse d'architecture

racinaire à STM196 chez des plantules de mutant *nrt2.1* cultivées *in vitro*, en boîtes de Pétri verticales. Le gène *NRT2.1* code pour le principal transporteur racinaire de NO_3^- à forte affinité (Filleur *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007). Notre raisonnement est que sa mutation perte de fonction doit diminuer fortement l'approvisionnement en azote, et donc la croissance de la plante, mais doit diminuer encore plus fortement l'accumulation de NO_3^- ; ceci doit nous permettre d'étudier d'une autre manière que Mantelin *et al.* (2006a), la relation entre l'effet de l'inoculation et la régulation de l'architecture racinaire par NO_3^- et par STM196. Les plantules, sauvages comme mutantes *nrt2.1*, sont cultivées à trois concentrations de NO_3^- : 40 μM , très limitante pour la croissance des plantules, 2 mM qui permet une croissance optimale dans les conditions *in vitro* (cf. Mantelin *et al.*, 2006a) et 20 mM qui est une concentration très élevée pour ces conditions et induit une forte inhibition du développement des racines latérales chez des plantules non inoculées.

Chapitre 3 :

NRT2.5 et NRT2.6 sont impliqués dans la stimulation de croissance par STM196

Partie 1

Création des doubles mutants *nrt2.5xnrt2.6*,
nrt2.1xnrt2.6 et *nrt2.1xnrt2.5*

3.1. Introduction

L'information héréditaire est transmise des parents à leur descendance. Cependant, il a fallu attendre les travaux de Johann Gregor Mendel en 1866 qui en analysant les produits de croisements de *Pisum sativum* de différents phénotypes, a établi que la transmission de ce patrimoine obéit à des lois. Chaque caractère peut se présenter sous différents allèles, soit dominant, soit récessif. Pour tout individu diploïde, soit les allèles de ce caractère sont identiques, soit ils sont différents. On parle d'individu homozygote ou hétérozygote pour le caractère considéré. Les travaux d'Oswald Théodore Avery et ses collaborateurs en 1944 sur des souches bactériennes ont permis de démontrer que l'ADN est le support de l'information héréditaire. Par la suite, les expériences de Thomas Hunt Morgan sur des drosophiles mutantes, ont montré que ce patrimoine génétique est localisé au niveau de chromosomes. Enfin, James Watson et Francis Crick, ont établi que l'ADN avait une structure en double hélice ce qui rend facile la réplication de l'ADN (Watson & Crick, 1953).

Une fois l'importance fonctionnelle, la chimie et la structure de l'ADN établit, l'étude du fonctionnement des gènes a débuté. Ces études ont été rendues possibles grâce à la mise au point des techniques de séquençage de l'ADN par Frederick Sanger et Walter Gilbert (Maxam & Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977) et le développement de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). La première avancée significative sur le fonctionnement des gènes a été la mise en évidence de la régulation de leur expression. Ce sont les travaux de Jacob & Monod (1961) qui en disséquant l'opéron lactose sur des souches d'*E. Coli* ont jeté les bases moléculaires de l'expression des gènes comme par exemple le besoin d'un promoteur, d'une phase ouverte de lecture.... Ces recherches ont ouvert la voie vers la biologie moléculaire.

L'utilisation de mutants est devenue un outil indispensable à l'étude des fonctions des gènes ainsi que les interactions qui peuvent exister entre eux. Si un gène est responsable d'une fonction et donc d'un phénotype, alors on doit pouvoir identifier dans une population un mutant qui ne présente plus ce phénotype. La mutation est un changement dans la structure de l'ADN d'un gène ou d'un chromosome qui n'est pas présente dans le génome de la plante sauvage. Cette mutation peut arriver spontanément comme elle peut être créée en utilisant une variété d'agents mutagènes dont le rôle est d'altérer la séquence de l'ADN. Ils peuvent être d'ordre physique (comme les rayons X,

rayon γ ou des radiation de neutrons rapides (FNR : Fast Neutron Radiation)), chimique (Comme l'ethylmethanesulfonate (EMS) ou le N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)) ou biologique (comme l'insertion de T-DNA ou de transposon) (Curtis & Grossniklaus, 2007).

L'analyse du phénotype va nous renseigner sur la fonction des gènes. La recherche d'un individu dans une population ayant un phénotype dans la fonction étudiée est appelée génétique directe. Celle-ci est considérée comme une excellente méthode pour l'identification des gènes responsables d'un phénotype particulier. La caractéristique fondamentale de cette approche est qu'elle est sans a priori sur la nature et le nombre de gènes impliqués dans la fonction. Les progrès dans l'étude des génomes ont montré qu'il existait des éléments transposables, mobiles et qui peuvent inactiver un gène (les travaux de Barbara McClintock (McClintock, 1989)). Ceci a permis de définir une nouvelle approche pour identifier la fonction d'un gène : la génétique inverse. Le principe de cette méthode est de connaître la séquence d'un gène et de poser la question de la fonction dont il est responsable en identifiant un ou des mutants dans ce gène. On va donc isoler un ou plusieurs mutants dans ce gène, et découvrir si un phénotype correspond à la mutation. (Ahringer, 2006). La génétique inverse, nécessite dans un premier de disposer d'une collection de mutants. Mais à la différence des bactéries pour lesquelles une recombinaison homologue permet d'inactiver de façon précise un gène, la mutagenèse –quel que soit le type d'agent mutagène utilisé- réalisée chez les plantes est aléatoire. Elle est faite en masse, sans se préoccuper de savoir quel gène est touché. Il faut donc impérativement pouvoir identifier les gènes qui ont fait l'objet d'une altération par la mutagenèse.

L'identification de mutations dans un gène précis, nécessite de connaître la séquence nucléotidique du génome de la plante utilisée. Cependant, de nombreuses plantes, y compris une partie des principales plantes cultivées, ont des génomes très grands car soit ils contiennent des séquences d'ADN hautement répétitives soit sont polyploïdes. Ces inconvénients font qu'à de rares exceptions près (par exemple le soja : *Glycine max* et le riz : *Oryza sativa*), les plantes de grande culture ne sont pas des bons modèles pour des études ayant recours à une approche de génétique inverse.

Le modèle biologique idéal pour mener à bien des études sur l'identification de gènes et la compréhension de leur fonctionnement correspond à des plantes possédant un génome simple, dont le mode de reproduction (autogame) permet de concilier à la fois des

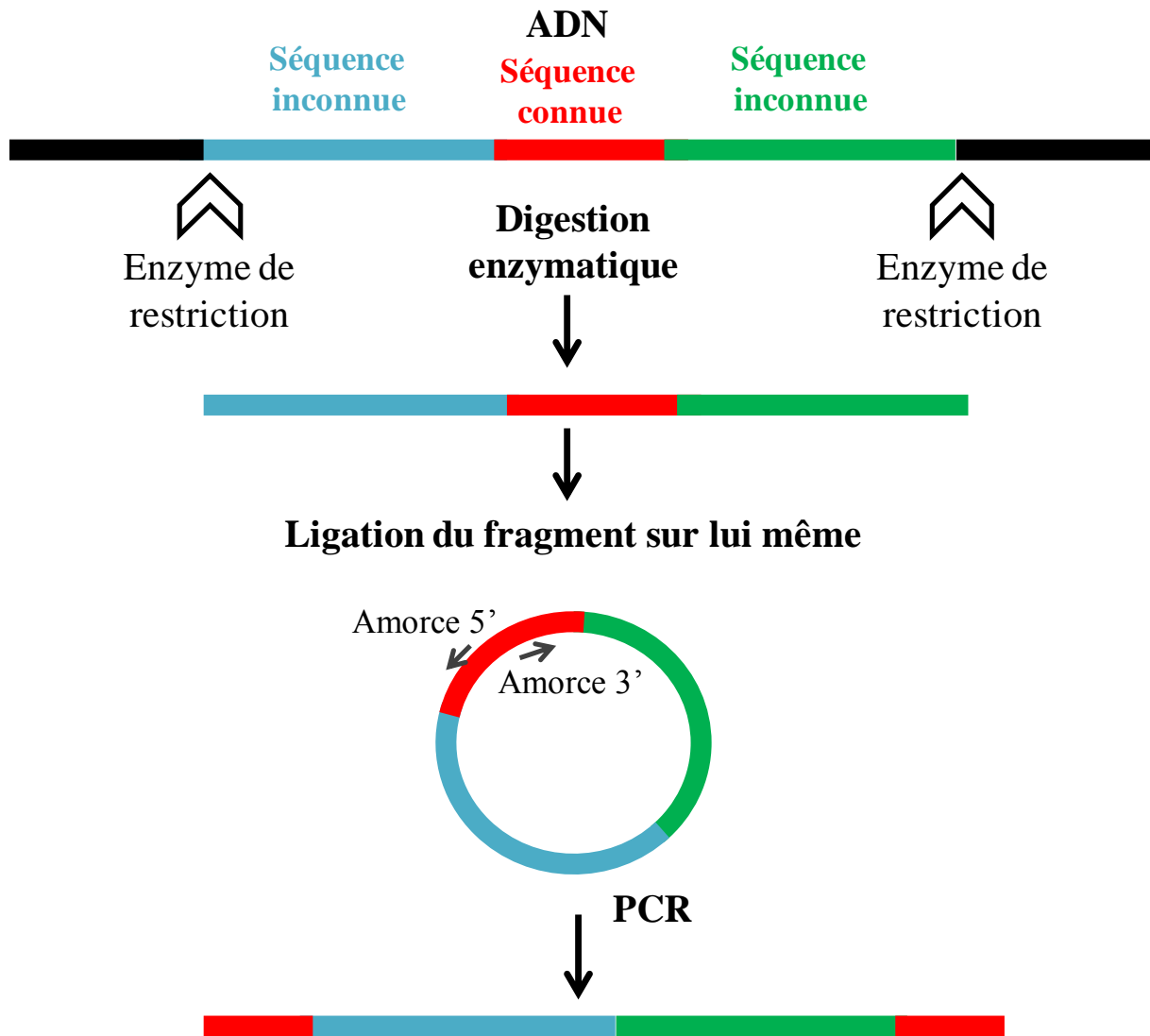


Figure 3.1. PCR inverse.

L'ADN génomique de la plante mutante est fragmenté par une enzyme de restriction. Le fragment obtenu est reliqué sur lui-même et le produit de ligation va servir de matrice pour une PCR en utilisant les amorces dessinées dans la séquence connue de l'ADN.

études de génétique directe (classique) mais aussi des études de génétique inverse et moléculaires (Page & Grossniklaus, 2002). Les deux principales plantes qui satisfont ce cahier des charges sont *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa* (riz) (Curtis & Grossniklaus, 2003). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* a été le premier génome de plante à être complètement séquencé (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Cette plante appartient à la famille des *Brassicaceae*, et plusieurs écotypes ont été collectés dans la nature et sont utilisés dans les analyses expérimentales. Les génotypes d'*Arabidopsis* les plus utilisés sont Columbia (Col-0) et Landsberg (Ler) (Meinke *et al.*, 1998). *Arabidopsis thaliana* se caractérise par sa petite taille, son cycle de croissance rapide (entre 5 et 6 semaines sous des conditions de croissance optimales), sa capacité de croître sous des conditions de croissance contrôlées (que ce soit en sol ou en milieu de culture), sa fécondité élevée (plus que 10 000 graines par plante) et le caractère autogame de sa reproduction (Page & Grossniklaus, 2002). En plus de ces caractéristiques, *Arabidopsis thaliana* a un petit génome d'environ 125 Mb réparti sur 5 chromosomes de tailles différentes (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Le génome d'*Arabidopsis* est relativement « moins » riche de séquences répétitives comparé au génome d'autres plantes supérieures (Leutwiler *et al.*, 1984; Pruitt & Meyerowitz, 1986). L'ensemble de ces caractéristiques font d'*Arabidopsis* l'une des plantes les plus utilisée pour les études moléculaires et génétiques sur la fonction des gènes.

Dans une approche de génétique inverse, l'inactivation du gène peut être de plusieurs types. Cette inactivation peut toucher le contrôle de l'expression du gène et être totale (*Knock out*) ou partielle (*Knock down* : niveau d'expression plus faible, *Knock up* : niveau d'expression plus fort). Cette inactivation peut toucher le fonctionnement de la protéine codée par le gène (modification de son site actif, de sa régulation, de sa conformation). La génétique inverse a rendu possible d'une part en raison du séquençage des génomes, mais aussi la transformation génétique. La mutagenèse la plus fréquemment rencontrée pour générer des populations de mutants est la transformation par T-DNA ou par la mobilisation d'un transposon. Dans ce cas, l'identification de la mutation dans le gène d'intérêt se fait à l'aide de PCR inverses (Figure 3.1). Des amorces sont dessinées de part et d'autres du T-DNA. L'ADN génomique de la plante mutante est purifié, puis fragmenté par une enzyme de restriction. Chaque fragment est reliqué sur lui-même. Les produits de ligation obtenus vont servir de matrice pour une PCR en utilisant les amorces dessinées dans le T-DNA. Après amplification, les produits de PCR sont séparés sur un gel

Nom du mutant: *Ko nrt2.1*
 Référence du gène *NRT2.1*: AT1G08090,T6D22
 Référence sur SALK: SALK 035429
 Référence sur NASC: N535429

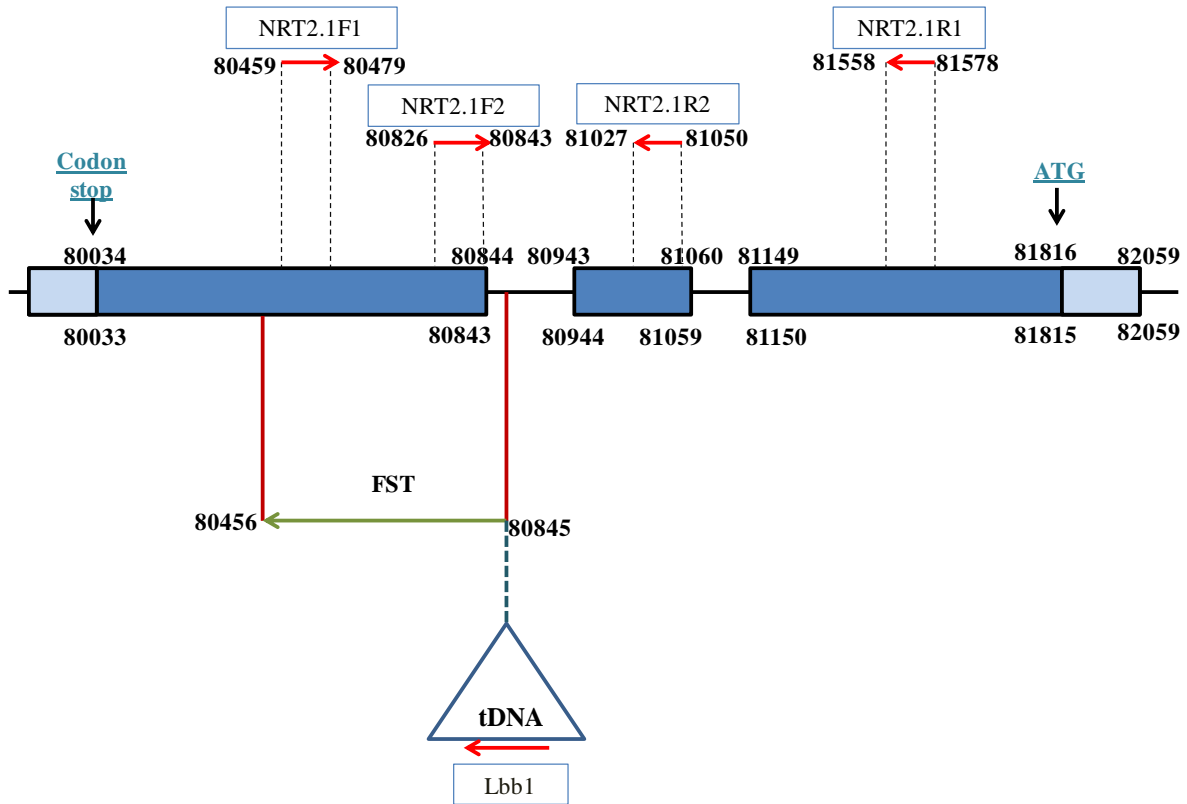


Figure 3.2. Carte génétique du mutant *nrt2.1* avec les différentes amorces utilisées.

Les couples d'amorces utilisées pour la PCR semi quantitative pour la détection du gène sauvage *NRT2.1* sont : (*NRT2.1* F1 et *NRT2.1* R1), et pour la détection de la mutation *nrt2.1* sont : (*NRT2.1* F1 et Lbb1), quant aux paires d'amorces du gène *NRT2.1* utilisées pour la qPCR sont : (*NRT2.1* F2 et *NRT2.1* R2).

d'électrophorèse, purifiés et séquencés. Cette approche permet d'isoler la séquence d'ADN génomique qui flanque l'insertion (FST pour Flanking Sequence Tag). Cette démarche est automatisable. Pour *Arabidopsis* ou le Lotier, conduite à large échelle pour un nombre très grand de plantes, elle a permis d'élaborer des bases de données regroupant les séquences nucléotides des différentes séquences flankantes. (SALK, <http://signal.salk.edu/>, Gabikat www.gabi-kat.de/, Miyakogusa www.kazusa.or.jp/lotus/) (Alonso *et al.*, 2003; Urbański *et al.*, 2012). Ces bases de données ont ouvert une nouvelle voix vers la recherche génomique, en facilitant le travail et l'avancement des recherches.

Pour résumer, on peut distinguer 4 phases pour une approche de génétique inverse : identification de son gène d'intérêt, identification de la mutation désirée (*Knock out*, *Knock down*), prédiction du phénotype et observation du phénotype.

3.2. Caractérisations moléculaire des simples mutants

nrt2.1, *nrt2.5* et *nrt2.6*

Le simple mutant *nrt2.1*, nous a été fourni par Dr A Gojon (BPMP, INRA-Monpellier, France), le mutant *nrt2.1* que nous avons utilisé fait partie de la collection SALK (SALK_035429). Chez cette lignée, la phase ouverte de lecture du gène *NRT2.1* est interrompue par une insertion de T-DNA (Figure 3.2). Cette insertion doit conduire à l'inactivation du gène. Nous avons vérifié cela à l'aide d'une PCR semi quantitative avec un couple d'amorces dessiné pour amplifier le gène sauvage et un autre pour celle de l'insertion (Figure 3.2).

Lorsque la PCR est conduite à l'aide du couple d'amorce conçu pour amplifier le gène *NRT2.1* sauvage en utilisant comme matrice l'ADN du mutant *nrt2.1*, on observe une absence d'amplification. En revanche, la même expérience conduite à l'aide du couple d'amorce conçu pour amplifier l'insertion permet d'observer une amplification en utilisant comme matrice l'ADN du mutant *nrt2.1*. L'absence d'amplification avec le couple d'amorce sauvage n'est pas due à une dégradation de l'ADN. Lorsque les mêmes couples d'amorces sont utilisés avec comme matrice l'ADN de la plante sauvage, on observe avec le couple d'amorce sauvage une amplification et en revanche aucune amplification avec le couple d'amorce pour l'insertion. Par conséquent, l'absence d'insertion avec le couple d'amorce conçu pour l'insertion ne s'explique pas par une dégradation de l'ADN. On peut

Ko *nrt2.5*
 Référence du gène *NRT2.5*: AT1G12940, F13K23
 Référence sur Gabi KAT : GK 213H10
 Référence sur NASC: N420446

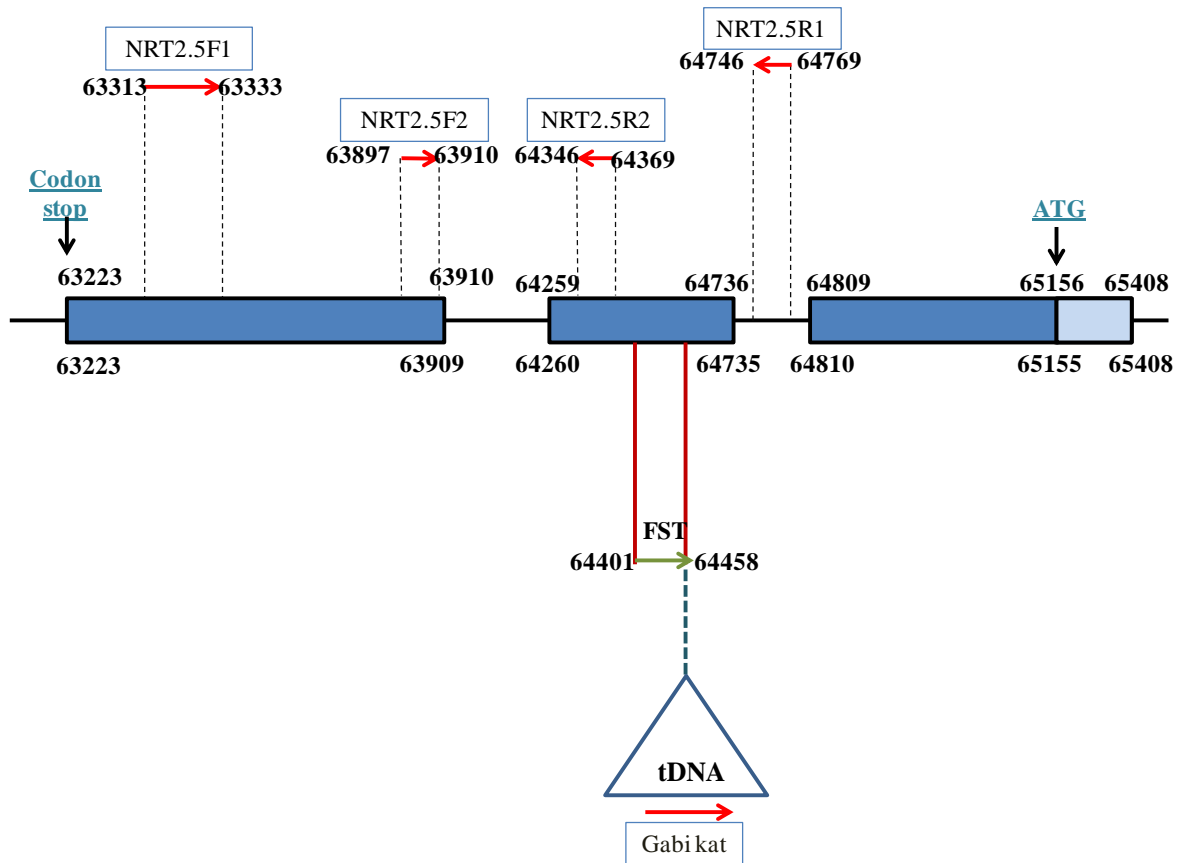


Figure 3.4. Carte génétique du mutant *nrt2.5* avec les différentes amorces utilisées.

Les couples d'amorces utilisées pour la PCR semi quantitative pour la détection du gène sauvage *NRT2.5* sont : (*NRT2.5* F1 et *NRT2.5* R1) et pour la détection de la mutation *nrt2.5* sont : (Gabi kat et *NRT2.5* R1), quant aux paires d'amorces du gène *NRT2.5* utilisées pour la qPCR sont : (*NRT2.5* F2 et *NRT2.5* R2).

donc conclure, que l'on confirme que le mutant *nrt2.1* possède une insertion avec un T-DNA dans la phase ouverte de lecture du gène. Une quantification fine des transcrits par qPCR montre l'absence totale de transcrits *NRT2.1* (Figure 3.3). Le gène *NRT2.1* est knocked-out chez le mutant *nrt2.1-3*.

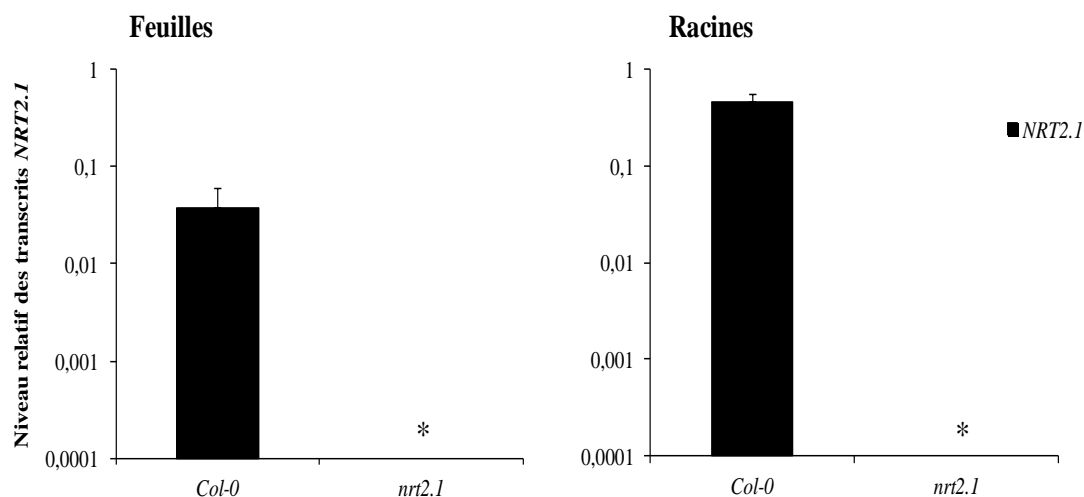


Figure 3.3. Absence des transcrits *NRT2.1* chez le mutant *nrt2.1*.

Le niveau d'expression du gène *NRT2.1* a été mesuré par PCR quantitative. Des ARN totaux de racines et de feuilles de plantes âgées de 2 semaines soit de génotype sauvage (barre noire) soit de génotype mutant ont été isolés puis retrotranscrit en cDNA. L'abondance de transcrit *NRT2.1* a été mesurée. Les valeurs d'accumulation sont relatives à l'abondance du transcrit des gènes de référence Actine2 (At3g18780) et Ubiquitine (At4g05320). Nous confirmons que le gène *NRT2.1* est plus exprimé dans les racines que dans les feuilles.

Les graines du simple mutant *nrt2.5*, nous ont été fournies par Dr Ann Krapp et Dr Françoise Vedèle (NAP, INRA-Versailles, France). Ce mutant, fait partie de la collection GABI KAT (GK 213H10). La phase ouverte de lecture du gène *NRT2.5* est interrompue par l'insertion d'un T-DNA (Figure 3.4). Cette insertion devrait contribuer à inactiver totalement l'activité du gène. Pour vérifier cela, nous avons réalisé une PCR semi quantitative avec le couple d'amorces dessiné pour amplifier le gène sauvage de part et d'autre de l'insertion (Figure 3.4), on observe une amplification pour Col-0, mais aucune amplification chez le mutant *nrt2.5*. Avec le couple d'amorce dessinée pour amplifier la séquence flanquante, on observe une amplification chez le mutant *nrt2.5*, mais aucune amplification chez Col-0. Une analyse par qPCR de l'abondance des transcrits du gène

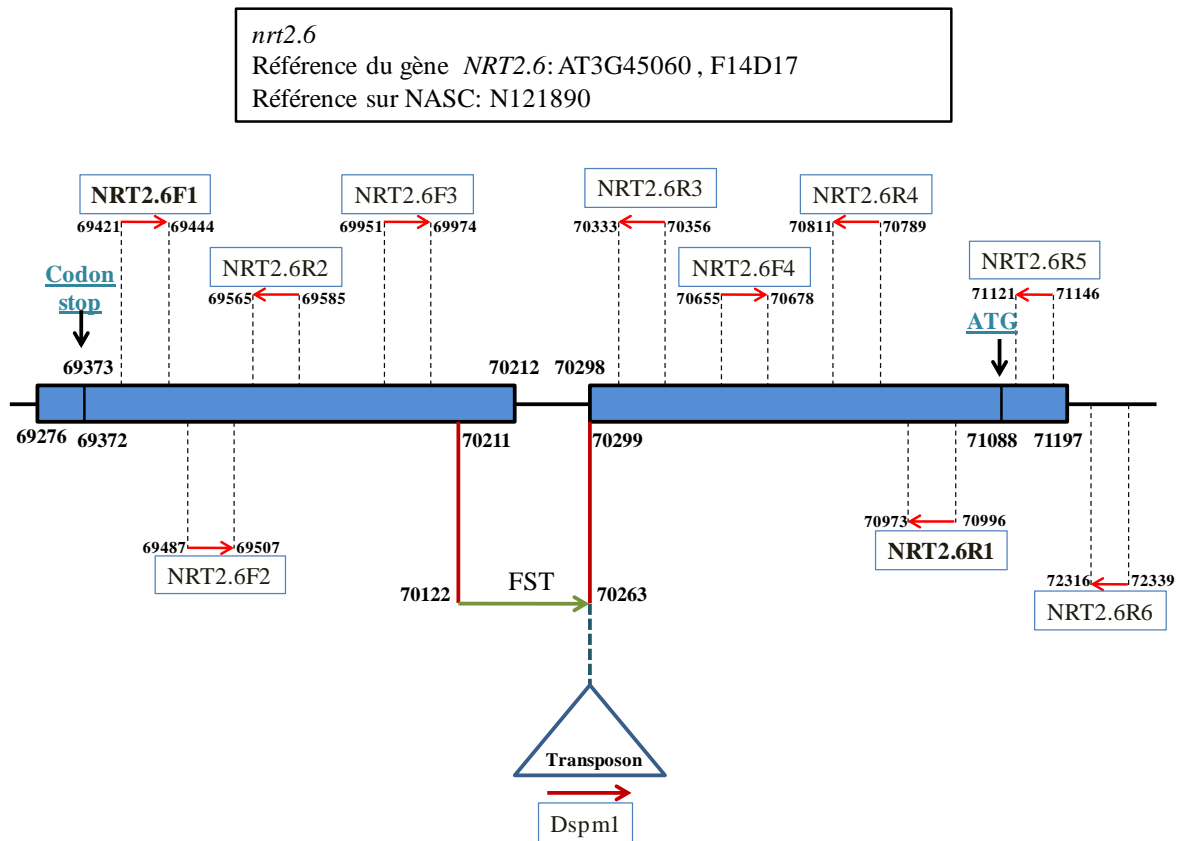


Figure 3.6. Carte génétique du mutant *nrt2.6* avec les différentes amorces utilisées.

Les couples d'amorces utilisées pour la PCR semi quantitative pour la détection du gène sauvage *NRT2.6* sont : (*NRT2.6* F1 et *NRT2.6* R1), et pour la détection de la mutation *nrt2.6* sont : (dspml et *NRT2.6* R1), quant aux paires d'amorces du gène *NRT2.6* utilisées pour la qPCR sont : (*NRT2.6* F2 et *NRT2.6* R2).

NRT2.5 chez Col-0 et chez le mutant, révèle une absence totale de produits spécifiques du gène *NRT2.5* (Figure 3.5). Cela confirme que la mutation inactive totalement le gène *NRT2.5*.

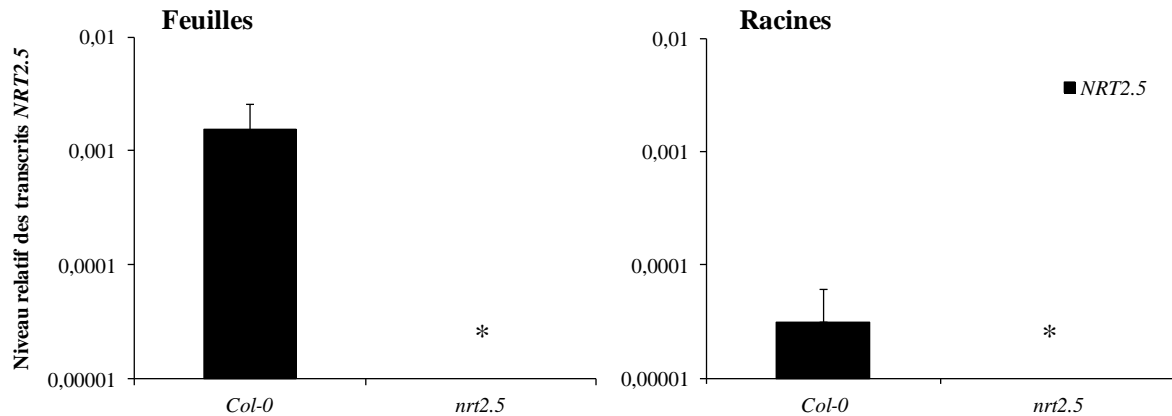


Figure 3.5. Absence des transcrits *NRT2.5* chez le mutant *nrt2.5*.

Le niveau d'expression du gène *NRT2.5* a été mesuré par PCR quantitative. Des ARN totaux de racines et de feuilles de plantes âgées de 2 semaines soit de génotype sauvage (barre noire) soit de génotype mutant ont été isolés puis retrotranscrits en cDNA. L'abondance de transcrit *NRT2.1* a été mesurée. Les valeurs d'accumulation sont relatives à l'abondance du transcrit des gènes de référence Actine2 (*At3g18780*) et Ubiquitine (*At4g05320*). Nous confirmons que le gène *NRT2.5* est plus exprimé dans les feuilles que dans les racines.

Les graines du mutant *nrt2.6*, nous ont été fournies par Dr Ann Krapp et Dr Françoise Vedèle (NAP, INRA-Versailles, France). Ce mutant, fait partie de la collection SLAT-line (SM 3.35179). A la différence des 2 lignées précédentes, la mutation a été obtenue grâce à la remobilisation d'un transposon (Tissier *et al.*, 1999; Meissner *et al.*, 1999). Le transposon est inséré dans la phase ouverte de lecture du gène *NRT2.6* (Figure 3.6). La position de l'insertion a été confirmée par PCR semi quantitative est réalisée avec deux paires d'amorces (Figure 3.6) sur les ADN du mutant *nrt2.6* et du sauvage Col-0. Avec le couple d'amorces dessiné pour amplifier le gène sauvage de part et d'autre de l'insertion, on observe une amplification pour Col-0, mais aucune amplification chez le mutant *nrt2.6*. Avec le couple d'amorce dessinée pour amplifier la séquence flanquante, on observe une amplification chez le mutant *nrt2.6* mais aucune amplification chez Col-0.

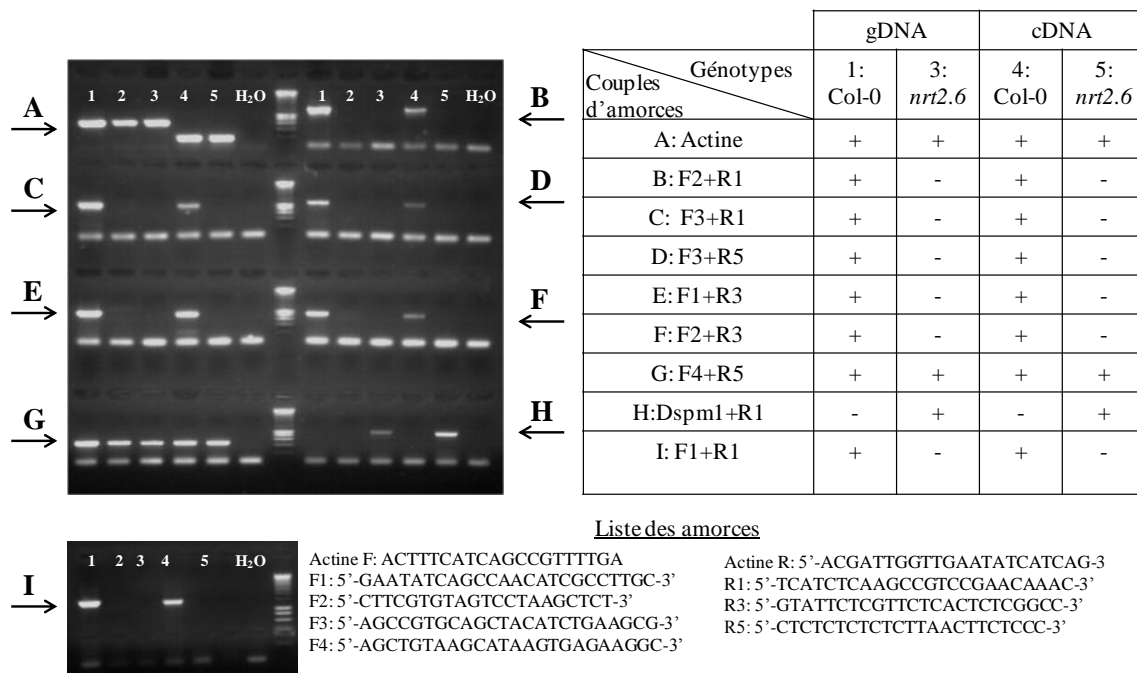


Figure 3.8. Différents résultats de PCR semi quantitative avec différents couples d'amorces du gène *NRT2.6*.

Pour confirmer que l'insertion affecte le niveau d'expression du gène *NRT2.6*, nous avons réalisé un ensemble de PCR avec les couples d'amorces détaillé dans le tableau ci dessus et dont la position dans le gène *NRT2.6* est indiqué dans la figure 3.6. On observe une amplification de l'actine avec les cDNA1, 2 et 3. On observe également une amplification avec le couple d'amorce F4 et R5 pour tous ces gDNA testés. En revanche, toutes les combinaisons d'amorces de part et d'autres de l'insertion (B, C, D, E, F et I) permettent d'amplifier un produit dans les cDNA 1 et 4. En conclusion, on ne détecte pas de cDNA du gène *NRT2.6* chez le mutant *nrt2.6* quand on utilise des amorces disposées de part et d'autres du site d'insertion. Nous pouvons conclure que le gène *nrt2.6* est bien *Knock out*.

Par contre, Une première analyse de l'abondance des transcrits *NRT2.6* chez la plante sauvage et la plante mutante, montre une forte accumulation de transcrits *NRT2.6* chez le mutant *nrt2.6* par rapport au sauvage Col-0 (Figure 3.7).

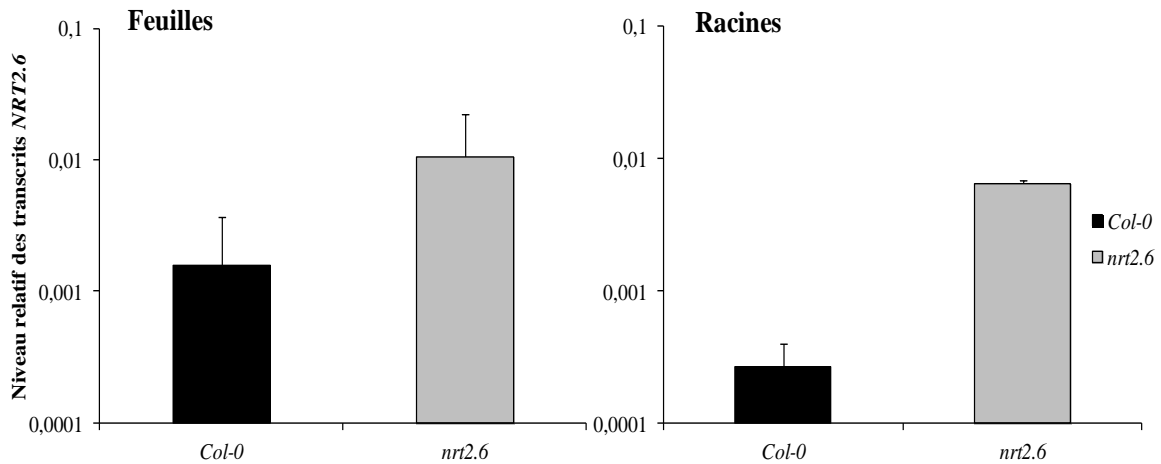


Figure 3.7. Différence dans le niveau d'expression du gène *NRT2.6* entre le mutant *nrt2.6* et le sauvage Col-0.

Le niveau d'expression du gène *NRT2.6* a été mesuré par PCR quantitative. Des ARN totaux de racines et de feuilles de plantes âgées de 2 semaines soit de génotype sauvage (barre noire) soit de génotype mutant (barres grises) ont été isolés puis retrotranscrit en cDNA. L'abondance de transcrit *NRT2.1* a été mesurée. Les valeurs d'accumulation sont relatives à l'abondance du transcrit des gènes de référence Actine2 (*At3g18780*) et Ubiquitine (*At4g05320*). Nous confirmons que le gène *NRT2.6* est plus exprimé dans les feuilles que dans les racines. Le niveau d'expression du gène *NRT2.6* serait plus abondant chez le mutant, suggérant l'existence d'un rétrocontrôle de l'expression de *NRT2.6* par le produit de son propre gène.

Cependant les amorces utilisées pour la PCR quantitative n'encadrent pas le site de l'insertion du transposon et sont situées en amont du site d'insertion. Il se peut que la qPCR détecte un transcrit tronqué du gène *NRT2.6*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une série de PCR semi-quantitatives avec plusieurs couples d'amorces du gène *NRT2.6* sur des cDNA ainsi que sur du gDNA pour confirmer la localisation de l'insertion du mutant *nrt2.6*. Les différents couples d'amorces du gène *NRT2.6* qui entourent la zone de l'insertion n'ont jamais permis l'amplification chez le mutant *nrt2.6* d'un produit PCR de la taille attendue. En revanche, ces amorces nous ont permis d'obtenir les bons produits lorsque l'ADN du Col-0 a été utilisé (Figure 3.6, Figure 3.8, B, C, D, E,

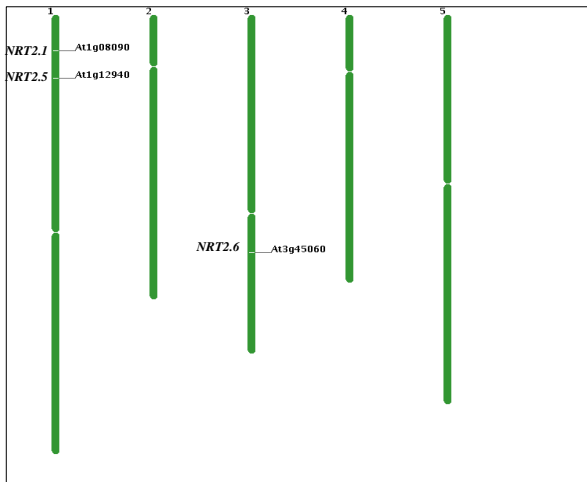


Figure 3.9. Position des gènes *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6*. (Tair).

La position des gènes *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6* a été déterminée en utilisant les ressources en lignes dédiés à la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org). Les gènes *NRT2.1* et *NRT2.5* sont situés tous les deux sur le bras nord du chromosome 1. Ces gènes sont liés. En revanche, le gène *NRT2.6* est isolé.

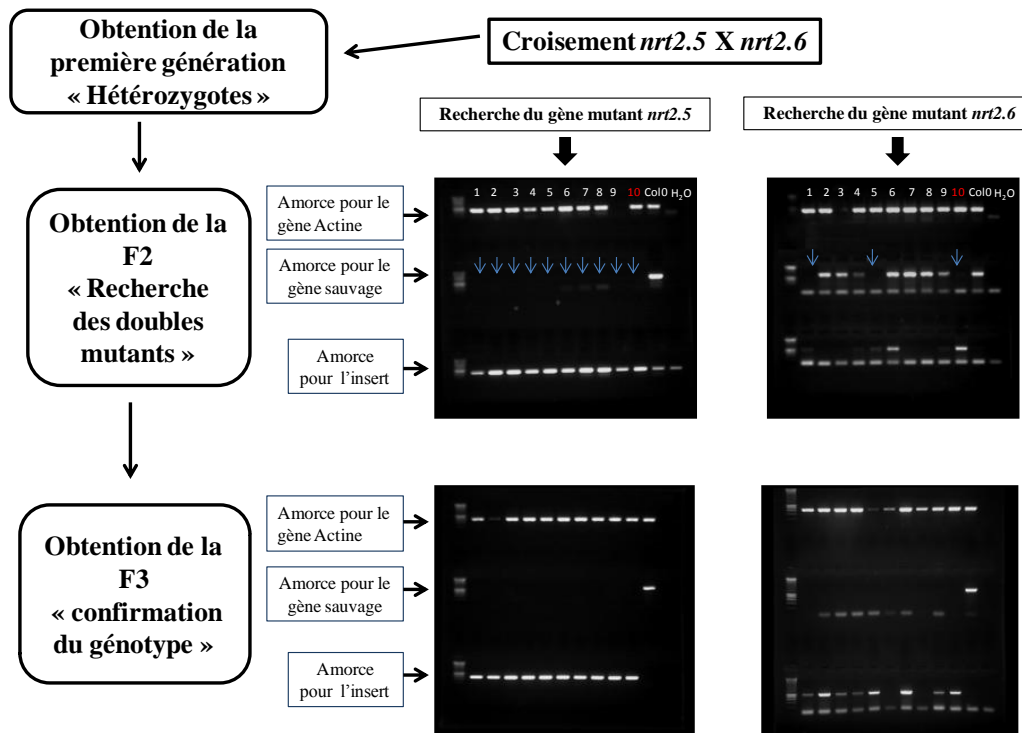


Figure 3.10. Analyses effectuées après croisement pour l'identification du double mutant *nrt2.5xnrt2.6*.

Pour rechercher un double mutant *nrt2.1xnrt2.6*, on a extrait l'ADN génomique (gDNA) de 20 plantules F2. Pour vérifier l'intégrité de l'ADN, les PCR ont été réalisées avec le couple d'amorce conçu pour amplifier l'actine. Pour identifier un double mutant, on a d'abord isolé les individus homozygotes pour le gène *nrt2.1* puis testé s'ils étaient également homozygotes pour la mutation *nrt2.6*. Les lignées 2, 3, 6 et 7 sont des doubles mutants homozygotes. Nous avons autofécondé ces lignées puis confirmé à nouveau leur génotype en F3.

F, I). A l'inverse, une amplification a toujours été observée avec de l'ADN du mutant *nrt2.6* en utilisant une amorce spécifique du transposon et une amorce dans le gène. (Figure 3.6 et 3.8 H). Seules les couples d'amorces qui encadrent une zone dépourvue de l'insertion ont été capables de produire une amplification chez le sauvage Col-0 et le mutant *nrt2.6* (Figure 3.6 et 3.8 G). L'ensemble de ces résultats confirme la présence de l'insertion au niveau du gène *NRT2.6* et que cette insertion, dans la phase ouverte de la lecture du gène, doit conduire à l'inactivation du gène. La forte accumulation du transcrite du gène *NRT2.6* dans le fond génétique du mutant *nrt2.6* pourrait indiquer que l'expression du gène est régulée par un retro contrôle exercé par sa propre activité.

3.3. Obtention des différentes combinaisons de mutants

Afin d'obtenir des doubles mutants, nous avons croisé les simples mutants *nrt2.5* avec *nrt2.6*, *nrt2.1* avec *nrt2.6* et *nrt2.1* avec *nrt2.5*. Le croisement s'effectue sur les trois simples mutants *nrt2.1*, *nrt2.5* et *nrt2.6*, qui ont été semés en terre. A la floraison, on réalise les croisements. Pour cela on isole à partir d'une inflorescence, un ou 2 boutons floraux qui sont sous le point de s'ouvrir (minimisation de l'autofécondation). Ils serviront de parents femelles. On émascule ces boutons floraux à l'aide d'une pince fine, puis on pollinise à l'aide du pollen prélevé d'une fleur du parent mâle. Le croisement a pris lorsqu'on observe un allongement de l'ovaire de la fleur. Les graines qui seront récoltées de ce croisement seront semées en terre et leur génotype vérifié par PCR.

Les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* sont deux gènes indépendants, le gène *NRT2.5* se retrouve sur le chromosome 1 et le gène *NRT2.6* sur le chromosome 3 (Figure 3.9). Après le croisement entre les deux simples mutants *nrt2.5* et *nrt2.6*, la vérification par PCR de la population F1 a donné un génotype hétérozygote pour les deux gènes *NRT2.5/nrt2.5* *NRT2.6/nrt2.6*. (voir chapitre matériel et méthodes). Les graines hétérozygotes de la F1 sont semées en terre, et on laisse les plantes s'autoféconder pour obtenir la F2. Les graines issues de la F2 sont semées à leur tour. On isole l'ADN génomique d'environ 20 individus F2 sur lesquels on réalise des PCR en utilisant les amorces spécifiques des insertions *nrt2.5* et *nrt2.6*, mais aussi les amorces pour amplifier les gènes sauvages (Figure 3.10). On a isolé l'ADN de 20 individus et identifié de cette population 4 doubles mutants (Tableau 3.1). Ce ratio n'est pas conforme à la ségrégation attendue de 2 gènes indépendants. Mais

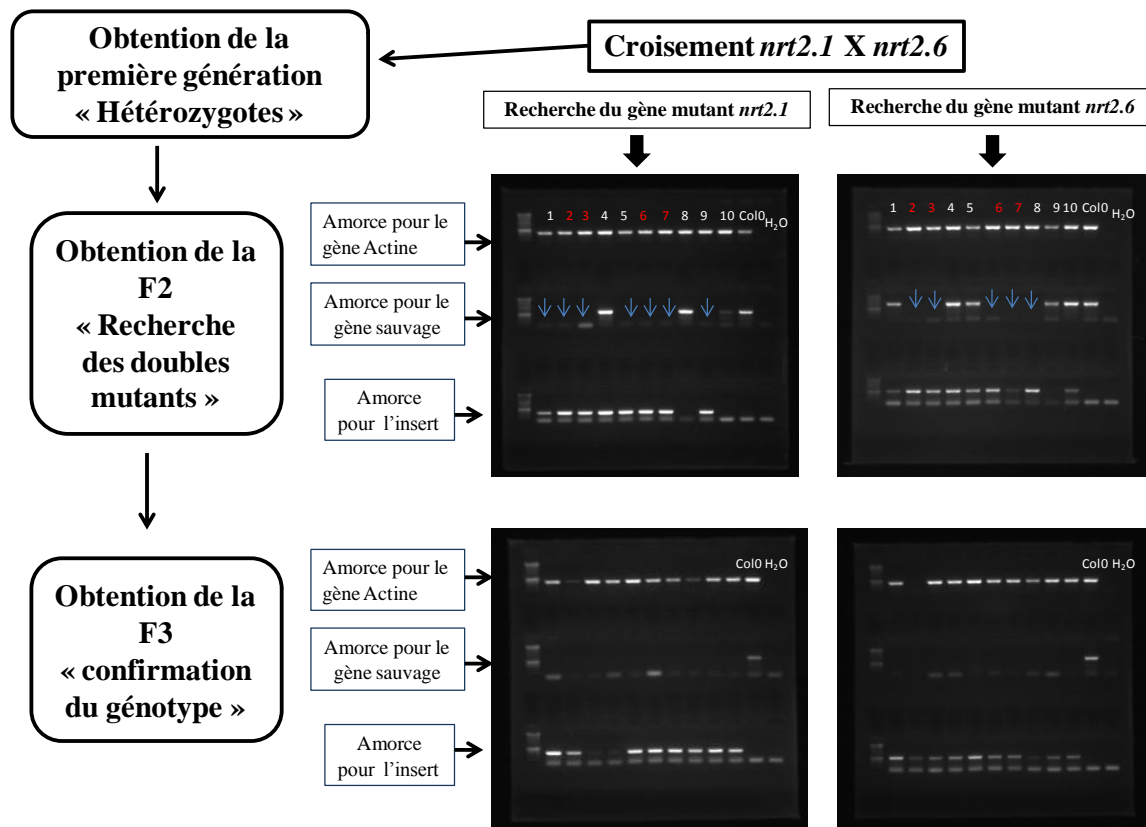


Figure 3.11. Analyses effectuées après croisement pour l'identification du double mutant *nrt2.1xnrt2.6*.

Pour rechercher un double mutant *nrt2.5xnrt2.6*, on a extrait l'ADN génomique (gDNA) de 20 plantules F2. Pour vérifier l'intégrité de l'ADN, les PCR ont été réalisées avec le couple d'amorce conçu pour amplifier l'actine. Pour identifier un double mutant, on a d'abord isolé les individus homozygotes pour le gène *nrt2.1* puis testé s'ils étaient également homozygotes pour la mutation *nrt2.6*. La lignée 10 est double mutante homozygote. Nous avons autofécondé ces lignées puis confirmé à nouveau leur génotype en F3.

la taille de l'effectif testé est trop petite pour confirmer qu'il existerait une distorsion de ségrégation.

Tableau 3.1. Résultats de la F2 du croisement entre *nrt2.5* et *nrt2.6*.

Phénotype	Sauvage				Homozygote <i>nrt2.5</i>		Homozygote <i>nrt2.6</i>		Double mutant
	Double Homozygote	Homozygote <i>NRT2.5</i> Hétérozygote <i>NRT2.6</i>	Homozygote <i>NRT2.6</i> Hétérozygote <i>NRT2.5</i>	Double hétérozygote	Homozygote <i>NRT2.6</i>	Hétérozygote <i>NRT2.6</i>	Homozygote <i>NRT2.5</i>	Hétérozygote <i>NRT2.5</i>	
Nombre	0	0	0	0	10	6	0	0	4
Total = 20	0				16		0		4
Pourcentage	0%				80%		0%		20%

Une procédure similaire a été suivie pour obtenir le double mutant *nrt2.1nrt2.6* (Figure 3.11). On a isolé l'ADN de 20 individus et identifié de cette population 6 doubles mutants (Tableau 3.2).

Tableau 3.2. Résultats de la F2 du croisement entre *nrt2.1* et *nrt2.6*.

Phénotype	Sauvage				Homozygote <i>nrt2.1</i>		Homozygote <i>nrt2.6</i>		Double mutant
	Double Homozygote	Homozygote <i>NRT2.1</i> Hétérozygote <i>NRT2.6</i>	Homozygote <i>NRT2.6</i> Hétérozygote <i>NRT2.1</i>	Double hétérozygote	Homozygote <i>NRT2.6</i>	Hétérozygote <i>NRT2.6</i>	Homozygote <i>NRT2.1</i>	Hétérozygote <i>NRT2.1</i>	
Nombre	1	3	0	1	1	6	2	0	6
Total = 20	5				7		2		6
Pourcentage	25%				35%		10%		30%

Les gènes *NRT2.5* et *NRT2.1* sont tous 2 localisés sur le chromosome 1 (Figure 3.9). L'obtention d'un double mutant *nrt2.1nrt2.5* nécessite un événement de recombinaison génétique (crossing over). Compte tenu de la distance (1.89Mb) qui sépare les 2 gènes, la ségrégation entre ces 2 gènes sera liée. Il nous faudra donc analyser un plus grand nombre d'individus en F2 afin de trouver le bon génotype (Figure 3.12). Nous avons donc isolé l'ADN d'une soixantaine d'individus F2 et testé le génotype de chacun par PCR. Nous n'avons obtenus aucun individu double mutant homozygote. Nous avons pu isoler un seul individu homozygote pour le locus *nrt2.1* mais hétérozygote pour le locus *nrt2.5* (Tableau 3.3).

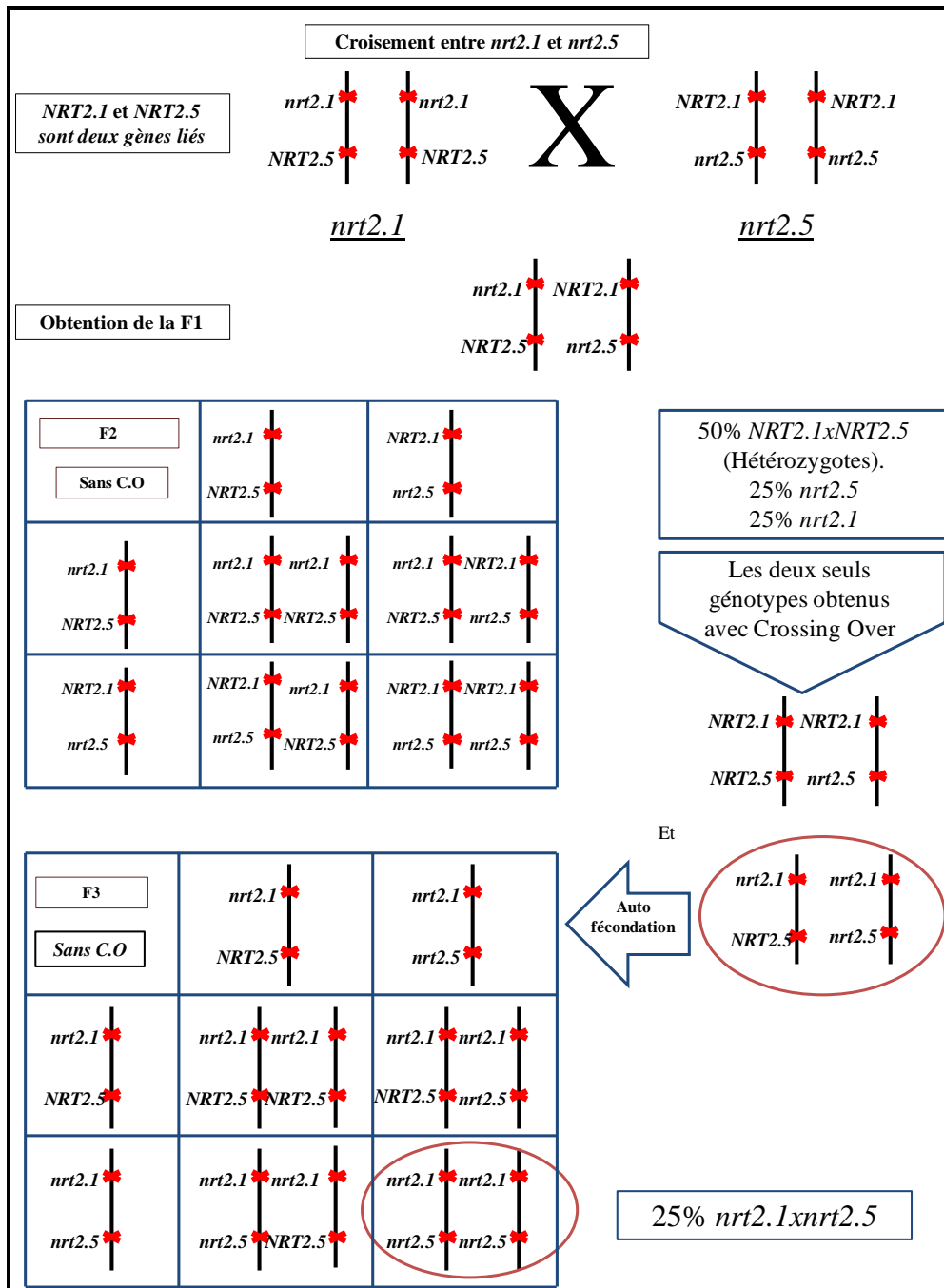


Figure 3.12. Différentes étapes réalisées pour l'obtention du double mutant *nrt2.1xnrt2.5*.

Pour rechercher un double mutant *nrt2.1xnrt2.5*, dont les deux gènes *NRT2.1* et *NRT2.5* sont liés, on a extrait l'ADN génomique (gDNA) d'une soixantaine de plantules F2. Aucune plantule de la F2 n'a présenté un double mutant *nrt2.1xnrt2.5*, un seul génotype dans la F2 qui a eu un Crossing over dans son locus *nrt2.1*, en donnant un homozygote *nrt2.1*, c'est à partir de cette plantule qu'une autofécondation a été réalisée et c'est jusqu'à la F3 que le double mutant *nrt2.1xnrt2.5* a été obtenu.

Tableau 3.3. Résultats de la F2 du croisement entre *nrt2.1* et *nrt2.5*.

Phénotype	Sauvage				Homozygote <i>nrt2.1</i>		Homozygote <i>nrt2.5</i>		Double mutant
Génotype	Double Homozygote	homozygote <i>NRT2.1</i> Hétérozygote <i>NRT2.5</i>	homozygote <i>NRT2.5</i> Hétérozygote <i>NRT2.1</i>	Double hétérozygote	Homozygote <i>NRT2.5</i>	Hétérozygote <i>NRT2.5</i>	Homozygote <i>NRT2.1</i>	Hétérozygote <i>NRT2.1</i>	Double homozygote <i>nrt2.1</i> et <i>nrt2.5</i>
Nombre	2	2	0	27	13	1	17	0	0
Total = 62	31				14		17		0
Pourcentage	50%				22.6%		27.4%		

Les graines F3 de cette plante ont été semées et autofécondées. Nous avons isolé l'ADN d'une vingtaine de ces individus en F3. Leur génotypage nous a permis d'isoler 6 individus doubles homozygotes mutant. Le génotype du double mutant *nrt2.1/nrt2.1 nrt2.5/nrt2.5* a été reconfirmé dans la F4 (Figure 3.12).

En conclusion, dans ce travail, nous avons pu confirmer les mutations pour les lignées *nrt2.1*, *nrt2.5* et *nrt2.6*. Nous avons pu également confirmer que chacune de ces mutations était de type *Knock out*. Nous avons pu confirmer enfin que le gène *NRT2.1* était exprimé préférentiellement dans les racines alors que les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* étaient préférentiellement exprimés dans les feuilles. Nous avons réalisé des doubles mutants *nrt2.1xnrt2.6*, *nrt2.5xnrt2.6* et enfin *nrt2.1xnrt2.5*. Ce travail illustre parfaitement l'intérêt de la génétique inverse. On peut réaliser les croisements de mutants que l'on désire à partir du moment où les gènes qui nous intéressent ont bien été identifiés. Au cours du criblage des mutants, nous n'avons pas observé de phénotype particulier dans le développement des plantes en dehors de la mutation qu'elles portent dans leur génome. La seule exception notable est que dans nos conditions de culture, la mutation *nrt2.1* provoque un développement très faible de la plante par rapport à Col-0 prouvant l'importance du gène *NRT2.1* dans le transport de nitrate. Cela pourrait suggérer que les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* ne jouent pas un rôle important ou alors que nous n'avons pas été dans les bonnes conditions de culture pour observer un phénotype. Ceci illustre parfaitement l'une des limites majeures de la génétique inverse. L'absence de phénotype est en effet très fréquente. On doit alors conclure que les gènes mutés ne jouent pas un rôle dans la condition de culture testée. En revanche, une autre condition de culture pourrait permettre de montrer un phénotype. La grande difficulté est d'identifier la condition de culture qui serait susceptible de révéler un phénotype. Dans notre cas, nous savons que les transcrits des gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* sont plus abondant en présence de STM196. C'est donc dans cette condition de culture, en présence de STM196 que nous allons étudier si ces mutants

ont un phénotype. De même, les doubles mutants vont nous permettre de détecter s'il y a des régulations génétiques entre ces trois gènes en absence ou en présence de STM196.

Partie 2

The *NRTR2.5* and *NRT2.6* genes are involved in growth promotion of *Arabidopsis* by the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 (***New Phytologist, 2013***)

The *NRT2.5* and *NRT2.6* genes are involved in growth promotion of *Arabidopsis* by the PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196

Maya Kechid^{1,2}, Guilhem Desbrosses¹, Wafaa Rokhsi¹, Fabrice Varoquaux¹, Abdelhamid Djekoun² and Bruno Touraine^{1*}

¹Laboratory of Tropical and Mediterranean Symbioses (UMR113, Université Montpellier 2, Institut de Recherche pour le Développement, Cirad, Montpellier SupAgro, Institut National de la Recherche Agronomique), Université Montpellier 2, CC002, Place E. Bataillon, F34095 Montpellier Cedex 5, France; ²Genetic, Biochemistry and Plant Biotechnology Laboratory (Département de Biologie Végétale-Ecologie, Faculté de Science de la nature et de la vie), Mentouri University, Route de Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria.

*Corresponding author:

Bruno Touraine

Tel: +33 (0)4 6714 4799

E-mail: bruno.touraine@univ-montp2.fr

Keywords: Rhizobacteria, PGPR, *Arabidopsis*, NitRate Transporters 2.5 and 2.6 (*NRT2.5*, *NRT2.6*), root system architecture, growth promotion

Summary

- The *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 strain stimulates *Arabidopsis thaliana* growth and antagonises high nitrate inhibition of lateral root development. A previous study identified two STM196-responsive genes, *NRT2.5* and *NRT2.6* (Mantelin *et al.*, 2006, *Planta* 223:591-603).
- We investigated the role of *NRT2.5* and *NRT2.6* in plant response to STM196 using single and double *Arabidopsis* mutants. The single mutants were also crossed with an

nrt2.1 mutant, lacking the major nitrate root transporter, to distinguish the effects of NRT2.5 and NRT2.6 from potential indirect effects of nitrate pools.

- The *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations abolished the plant growth and root system architecture responses to STM196. Determining nitrate content revealed that NRT2.5 and NRT2.6 do not play an important role in nitrate distribution between plant organs. Conversely, NRT2.5 and NRT2.6 appeared to play a role in the plant response independently from nitrate uptake. Using a nitrate-reductase mutant confirmed that NRT2.5/NRT2.6-dependent plant-signalling pathway is independent from nitrate-dependent regulation of root development.
- Our findings demonstrate that NRT2.5 and NRT2.6 that are preferentially expressed in leaves play an essential role in plant growth promotion by the rhizospheric bacterium STM196.

Introduction

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are naturally occurring soil microorganisms that colonise roots and stimulate plant growth. It is currently accepted that PGPR promote plant growth through the bacterial production of plant hormones, particularly indole-3-acetic acid (Asghar *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Spaepen *et al.*, 2007; Lugtenberg & Kamilova, 2009). This idea primarily relies on studies of microbial activities (Lugtenberg & Kamilova, 2009). The plant molecular targets and signalling pathways elicited by PGPR have only recently been investigated. Thus, experimental evidence for the involvement of hormones of bacterial origin in plant responses is primarily circumstantial because of the scarcity of plant studies. However, in the last decade, investigations using the model plant *Arabidopsis thaliana* have provided a series of results, illustrating the diverse and complex responses triggered by PGPR (Desbrosses *et al.*, 2012). The implication of IAA in some of these responses has been confirmed, but it has also been shown that the auxin-signalling pathway can be elicited by PGPR without the provision of microbial-originating auxin (Zhang *et al.*, 2007; Contesto *et al.*, 2010). Indeed, inoculation with either the VOC (Volatile Organic compounds)-emitting strain *Bacillus subtilis* GB03 (Zhang *et al.*, 2007) or the *Phyllobacterium brassicacearum* strain STM196 (STM196) into plant nutrient medium (Contesto *et al.*, 2010) has demonstrated that PGPR can interfere with plant-auxin polar transport in the roots, which participates in lateral root growth stimulation.

The PGPR-induced changes in plants are so diverse that auxin provision to roots' apices, whether of bacterial or plant origin, is likely not the sole mechanism. Instead, growth promotion likely results from a complex combination of multiple rhizobacteria-induced mechanisms that affect both development and nutrition (the "Additive Hypothesis", Bashan *et al.*, 2004). The inoculation of the model plant *Arabidopsis thaliana* with various PGPR showed that the bacteria affects hormone signalling pathways, ion transporters and photosynthetic activity (Desbrosses *et al.*, 2012). Still, the identified molecular changes are primarily secondary responses, and the primary targets of PGPR remain unknown.

In a previous study (Mantelin *et al.*, 2006a), we showed that STM196 antagonises the effects of high nitrate supply on lateral root development. In that work, we also identified two putative NO₃⁻ transporter genes of the *NRT2* family, *NRT2.5* and *NRT2.6*, as being strongly upregulated in response to inoculation with STM196. Recently, two reports identified a role for genes of the *NRT2* family in plant defense responses, respectively *NRT2.1* in the priming against *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Camañes *et al.*, 2012) and *NRT2.6* in the resistance against *Erwinia amylovora* (Dechorgnat *et al.*, 2012). Despite the elusive roles of *NRT2.5* and *NRT2.6* regarding NO₃⁻ transport *in planta*, we speculated that these genes might be part of the mechanism for the regulation of the N control of root development in the presence of the bacteria. However, the role of *NRT2.5* and *NRT2.6* in NO₃⁻ transport in *planta* remains unknown. Nevertheless, these two genes might play a role in the effects of STM196 on N nutrition and the interactions between N- and STM196-dependent control of root development. Here, we show that both genes are required for STM196-induced plant growth promotion, thus identifying two new genes in beneficial biotic interactions. Using *nrt2.5* and *nrt2.6* single knockout mutants revealed that both the lateral root response to STM196 and plant growth promotion largely depend upon *NRT2.5* and *NRT2.6*. The results of epistatic studies suggest that these two gene products are likely to act in the same signalling pathway. Analysing NO₃⁻ accumulation in plant parts and using genotypes with modified levels of NO₃⁻ content, we showed that *NRT2.5*- and *NRT2.6*-dependent responses to STM196 are unrelated to the plant N status. In summary, our results indicate that *NRT2.5* and *NRT2.6* are important genes for plant growth promotion by the PGPR strain STM196, and these genes participate in a pathway that alters the classically described regulation of shoot:root biomass allocation and root development through plant N status.

Materials and Methods

Biological material

The *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col-0 genotype was used in this study along with 4 single mutants affected in genes coding for nitrate transporters of the NRT2 family or a nitrate reductase gene: *nrt2.1-3* (SALK 035429), *nrt2.5* (GK 213H10), *nrt2.6* (SM 3.35179) and the G5 *nr2* mutant (Wilkinson & Crawford, 1991). These mutant lines are in the Col-0 background. Dr A. Gojon (BPMP, INRA-Monpellier, France) kindly provided the *nrt2.1-3* mutant line, and Dr Ann Krapp and Dr Françoise Vedèle (NAP, INRA-Versailles, France) provided the *nrt2.5* and *nrt2.6* lines. The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 (STM196), which has been previously characterised (Bertrand *et al.*, 2001; Mantelin *et al.*, 2006b), was also used in this study.

Generation of double mutant lines

The *NRT2.6* gene is localised to chromosome 3. In contrast, the *NRT2.1* and *NRT2.5* genes are potentially linked, as both genes are localised to chromosome 1 on the same DNA strand at an interval of 1.89 Mb. The *nrt2.1-3* mutant was crossed with the *nrt2.5* and *nrt2.6* mutants, while the *nrt2.5* was crossed with *nrt2.6*. Approximately 20 F2 plants generated from the cross between *nrt2.1Xnrt2.6* and 20 F2 plants from the *nrt2.5Xnrt2.6* cross were randomly selected, and their respective DNA was extracted. Genotyping of the various lines was performed using PCR on DNA extracted according to the methods of Shure *et al.* (1983) using the following primers: *NRT2.1* forward (5'-GTTCTCCATGAGCTTCGTGAG-3') and *NRT2.1* reverse (5'-GCAAGCGACTATCATCACTCC-3'), *NRT2.5* forward (5'-GCAACAACCTTCCGACTATTC-3') and *NRT2.5* reverse (5'-CAATCAAGCAACTCAATACCAAAA-3'), and *NRT2.6* forward (5'-TCATCTCAAGCCGTCCGAACAAAC-3') and *NRT2.6* reverse (5'-GAATATCAGCCAACATCGCCTTGC-3'). These primers were used in pairs (detection of wild type allele) or in combination with primers specific to the T-DNA (Lbba, dSPM and GABI_KAT for *NRT2.1*, *NRT2.6* and *NRT2.5*, respectively). All PCR reactions were performed using the following programme: 95 °C for 5 min, followed by 39 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 10 min. Each reaction contained 5 µl of a 1:10 (v/v) dilution of the DNA, 2 µl of buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl of dNTPs (2.5 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 0.05 µl of Go taq DNA

polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 0.95 μ l of milliQ H₂O and 1 μ l of primer pairs (10 μ M).

The genotypes of the putative double mutants were evaluated, and the positive lines were self-pollinated. The genotype of the resulting F3 population was confirmed, and the seeds of that population were used in subsequent experiments. In the case of the *nrt2.1xnrt2.5* double mutant, only 1 out of 100 F2 plants was *nrt2.1/nrt2.1 nrt2.5/NRT2.5*. This plant was self-pollinated. Approximately 20 F3 plants were randomly selected, and their DNA was extracted and analysed using PCR. Putative double mutants were identified and self-pollinated. The double mutant genotype was confirmed in the F4 population, and the seeds were used in subsequent experiments.

Plant growth condition

The *Arabidopsis* seeds were surface-sterilised through immersion in 0.57% sodium hypochlorite (v/v) supplemented with 0.095% Tween 20 (v/v) for 15 min. The seeds were washed five times in sterile distilled water and sown in square Petri dishes (12x12 cm) on 1.2% (w/v) agar (Sigma, St Louis, Mo, USA) mineral medium with 2 mM KNO₃ (Mantelin *et al.*, 2006a). The Petri dishes were sealed with Micropore™ tape and stored in a cold and dark room at 4 °C for 2 days. After cold treatment, the seeds were vertically germinated in a growth chamber as previously described (Mantelin *et al.*, 2006a). Seven days after germination, the plantlets were transferred to new square Petri dishes containing fresh agar mineral medium inoculated or not with 10⁸ CFU ml⁻¹ of STM196 (see below). The Petri dishes were aligned vertically, and the plants were grown for 7 additional days.

STM196 was cultivated on solid E' plate medium 1.5% (w/v) agar (Sigma, St Louis, Mo, USA) at 25 °C, as previously described (Mantelin *et al.*, 2006a). After 3 days, a single colony was inoculated into 20 ml of liquid E' media to prepare a preculture and grown for 18 h at 25 °C on a rotary shaker (145 rpm). To obtain the final culture, 500 ml of liquid E' media was inoculated with the preculture to reach an initial density of STM196 of 2.6.10⁹ CFU/ml. The final culture was incubated for 24 h under the same conditions as the preculture. To prepare the bacterial inoculum, the culture was pelleted through centrifugation at 7000 rpm for 5 min. The bacterial pellet was resuspended in 20 ml of sterile plant liquid medium, and the abundance of bacteria was measured at an absorbance of $\lambda=595$ nm. The bacteria inoculum was mixed with solid plant media at 50 °C to a final quantity of 10⁸ CFU/ml and poured into square Petri dishes.

Measurements of fresh weight and NO₃⁻ accumulation

To determine the fresh weight, the shoots and roots of each genotype inoculated or not with STM196 were harvested and weighed at 8 days after the transplantation of the plantlets.

To measure the NO₃⁻ content, the shoots and roots were collected separately, transferred to Eppendorf tubes and weighed. The NO₃⁻ ions were extracted using 700 µl of 0.1 M HCl. The tubes were incubated at 4 °C for 48 h. The NO₃⁻ concentration in the extracts was measured using a continuous-flow automated analyser (Autoanalyzer II Technicon, Tarrytown, NY, USA) through the reduction of NO₃⁻ to NO₂⁻ and subsequent reactions with sulphanilamide and N-naphtyl ethylene diammonium dichloride. The absorbance of the formed compound was measured spectrophotometrically at λ=540 nm and compared with a standard curve to determine the NO₃⁻ concentration in each sample (Henricksen & Semer-Olsen, 1970).

Root architecture analysis

The root system architecture was assessed at 7 days after transfer onto inoculated or non-inoculated media, as previously described (Contesto *et al.*, 2010). The following root growth parameters were measured: the primary root length, the number of lateral roots and the lateral root length.

Analysis of transcript levels by quantitative real time PCR

For total RNA extraction, the roots and shoots of 15-day-old plants were harvested at the middle of the photoperiod of the growth chamber and sampled separately into 2-ml Eppendorf tubes. The samples were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for a few days prior to extraction. Typically, 100 mg of frozen tissues was ground in a mixing mill (Retsch MM200, Retsch Hann, Germany), and total RNA was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. The quantity of total RNA was assessed using UV spectrophotometry (Nanodrop N D1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

The cDNA was synthesised using 1.5 µg of total RNA. To remove genomic DNA contamination, total RNA was incubated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. First-strand cDNA was synthesised using the Super-Script II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The

absence of genomic DNA contamination was verified through PCR using a primer pair (Actin2 Forward 5'-ACTTTCATCAGCCGTTTTGA-3' and Actin2 reverse 5'-ACGATTGGTTGAATATCATCAG-3').

For quantitative real-time PCR, 0.1 µl of first-strand cDNA was mixed with 5 µl of a 1-µM solution of the primer pair of interest together with 10 µl of Brilliant II Sybr Green qPCR Mastermix (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The PCR reaction was performed using an MX3005P qPCR System (Agilent, Santa Clara, CA, USA) using the following programme: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. After 40 cycles, all qPCR reactions were heated to 95 °C for 1 min, cooled to 55 °C for 30 s and heated to 95 °C for 30 s. The primer pairs used to measure the transcript accumulation of the NRT2 gene family have been previously described (Mantelin *et al.*, 2006a). To determinate the abundance of the various transcripts, all qPCR results were standardised to two constitutive genes, Actin2 (At3g18780) and Ubiquitin (At4g05320), using gene-specific primers (Actin2 forward 5'-TCCCTCAGCACATTCCAGCAGAT-3' and Actin2 reverse 5'-AACGATTCTGGACCTGCCTCATC-3') and (Ubiquitin forward 5'-CACACTCCACTTGGTCTTGCGT-3' and Ubiquitin reverse 5'-TGGTCTTTCCGGTGAGAGTCTTCA-3').

Statistical analysis

Each experiment was repeated independently at least three times. The data for fresh weight, NO₃⁻ accumulation and root system architecture were analysed using XLSTAT 2010. The significance between the mean of different treatments was evaluated using a Fisher's LSD test (P = 0.0001).

Results

NRT2.5 and NRT2.6 are required for growth promotion and lateral root response to STM196

To investigate whether the *NRT2.5* and *NRT2.6* genes play a role in *Arabidopsis thaliana* growth promotion by *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, we grew two mutant lines, *nrt2.5* and *nrt2.6*, in vertical Petri dishes on mineral plant nutrient medium, which was inoculated or not with the rhizobacterial strain. Because both genes displayed

marked overexpression in response to the inoculation with STM196 (Mantelin *et al.*, 2006a), we could not rule out the possibility that their functions overlap; thus, each of the two genes could complement a mutation in the other gene. To eliminate this possibility, we created an *nrt2.5xnrt2.6* double mutant line. None of the three mutant lines, *nrt2.5*, *nrt2.6* and *nrt2.5xnrt2.6*, exhibited a significant increase in biomass in either the roots or shoots upon inoculation with STM196, while the Col-0 wild-type line showed a 40% increase in root biomass and a 30% increase in shoot biomass (Fig. 1a, b).

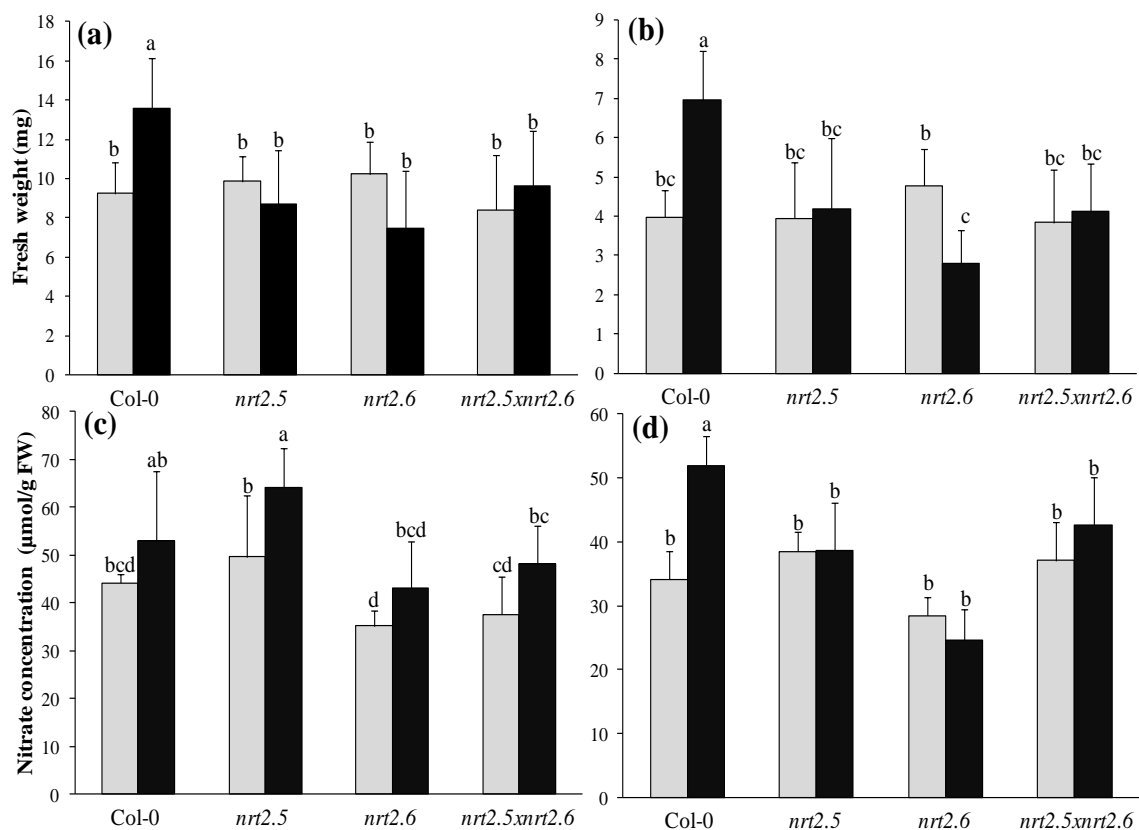


Fig. 1. The growth promotion and nitrate accumulation in roots triggered by STM196 are impaired in *nrt2.5*, *nrt2.6* and *nrt2.5xnrt2.6* mutant plants.

The seeds of *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type plants or mutant plants were germinated and grown on a mineral medium containing 2 mM NO_3^- as the unique N source in vertically oriented Petri dishes for 7 days. Five to 6 homogeneous plantlets were subsequently transferred into new media inoculated (black) or not (grey) with 10^{-8} cfu.ml $^{-1}$ STM196. Eight days after the transfer, the shoots (a) and roots (b) were harvested separately and weighed. The content of nitrate was measured in plant shoots (c) and roots (d). Error bars indicate SE (n = 20-25 plants per condition). Different letters represent significant difference of the means using Fisher's LSD test at $P = 0.0001$.

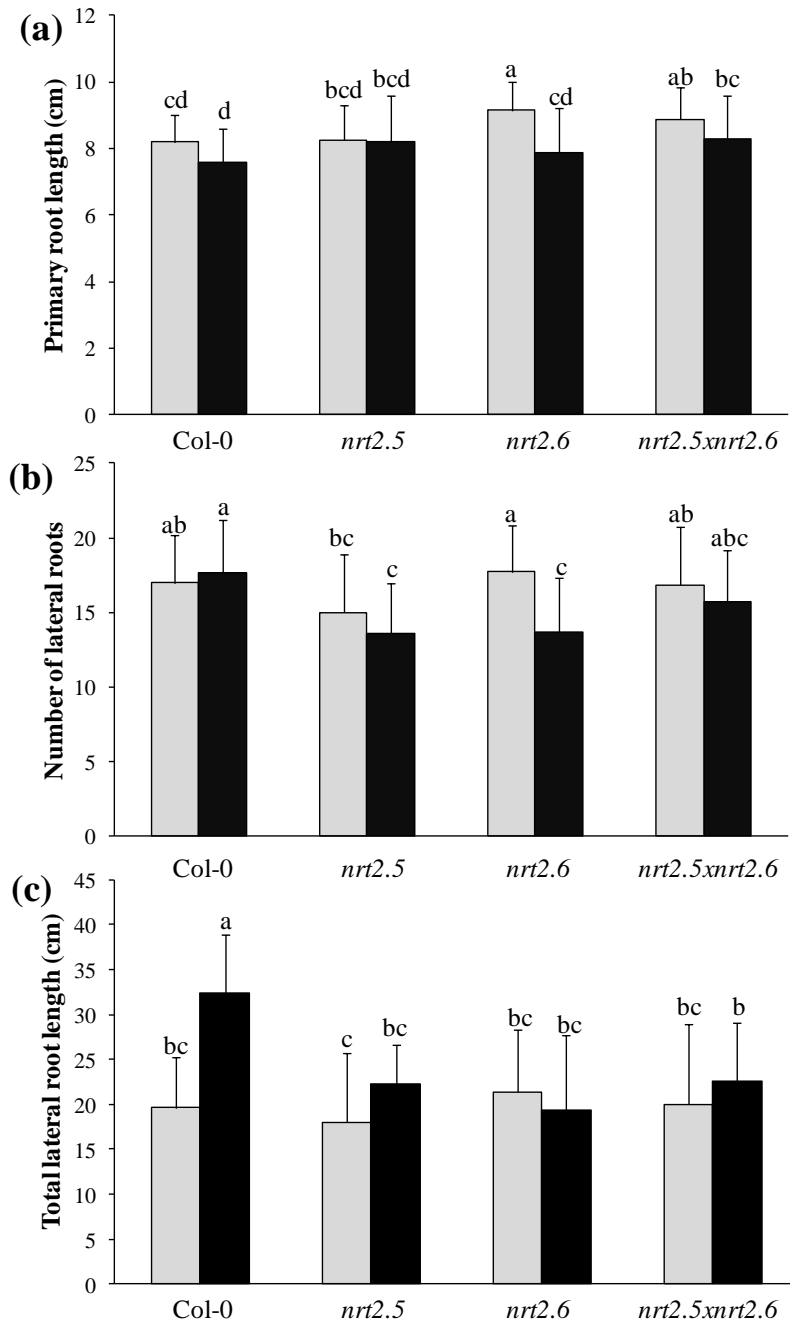


Fig. 2. The *nrt2.5*, *nrt2.6* and *nrt2.5xnrt2.6* mutant plants' root architecture response to STM196 is impaired.

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type or mutant plantlets either inoculated (black) or not (grey) were grown and transferred as described in Figure 1. The primary root length (a), number of lateral roots (b) and total lateral root length (c) were measured at 7 days after plants transfer. Error bars indicate SE (n = 20-25). Different letters represent significant difference of the means using Fisher's LSD test at $P = 0.0001$.

As previously reported (Mantelin *et al.*, 2006a; Contesto *et al.*, 2010), the STM196 strain induced an increase in the lateral root growth rate, while a weak effect or no effect was observed on either primary root growth or lateral root number. We confirmed this root architecture response phenotype in Col-0 (Fig. 2). The *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations did not significantly change the root architecture parameters under non-inoculated conditions. However, STM196 induced no increase of the length of lateral roots in either *nrt2.5*, *nrt2.6* or *nrt2.5xnrt2.6* mutant plants (Fig. 2c). This lack of lateral root length response is consistent with impaired root growth promotion in these 3 mutant lines (Fig. 1b). The number of lateral roots remained essentially unchanged in all the three mutants and the Col-0 wild-type plants (Fig. 2b).

To characterise the response of the lateral root rate to inoculation, we analysed the distribution of lateral root length in classes (Fig. 3). In wild-type plants, inoculation with STM196 led to a diminution in the sizes of the shorter lateral root classes and an increase in the sizes of the longer lateral root classes. The lateral root distribution curve shifted from a shape with a peak in the short-root classes to a bell-shaped curve centred on a longer root class. This result is indicative of an increase in individual lateral root growth rate. Under non-inoculated conditions, the *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations did not significantly alter the pattern of lateral root distribution within the length classes. Inoculation of the single and double mutants with STM196 led to slight modifications of this lateral root distribution pattern that are much reduced when compared with the shifts between lateral root length classes in Col-0 (Fig. 3). Therefore, the mutations in *NRT2.5* and *NRT2.6* inhibited the positive effect of STM196 on lateral root growth, although this effect was not totally abolished.

We previously showed that STM196 alleviates the nitrate-dependent regulation of lateral root development. Considering that *NRT2.5* and *NRT2.6* code for putative NO_3^- transporters, we analysed the NO_3^- accumulation pattern in the roots and shoots of non-inoculated and inoculated plants of the wild type *Arabidopsis* Col-0 and the *nrt2.5*, *nrt2.6* and *nrt2.5xnrt2.6* mutant lines (Fig. 1c, d). The *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations had no significant effect on NO_3^- accumulation and distribution between the roots and shoots, indicating that neither *NRT2.5* nor *NRT2.6* plays a major role in NO_3^- transport within the plant, at least at the young vegetative stage and under conditions of NO_3^- supply used in this study. The inoculation of wild-type *Arabidopsis* Col-0 plants with STM196 induced no significant change in the shoot NO_3^- content, as previously observed (Mantelin *et al.*,

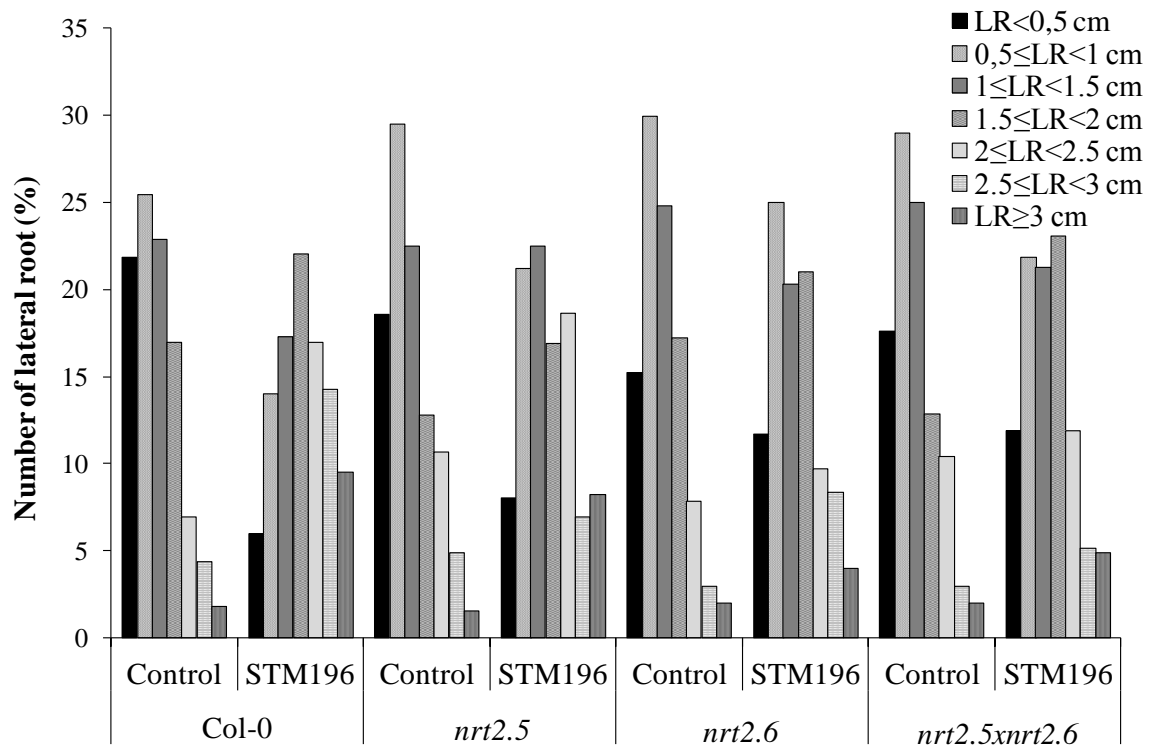


Fig. 3. The pattern of lateral root development in response to STM196 inoculation is affected in *nrt2.5*, *nrt2.6* and *nrt2.5xnr2.6* mutant plants.

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type or mutant plantlets were grown and transferred as described in Figure 1. The values presented are the percentage of lateral roots, which belongs to a given length class calculated for 20-25 individual plants at 8 days after transfer onto uninoculated or STM196-inoculated medium.

2006a). In contrast, a strong increase in the NO_3^- root pool was observed in STM196-inoculated Col-0 plants, consistent with our previous results. This STM196-induced NO_3^- accumulation in the roots was abolished through *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations.

The *nrt2.6* mutation has been shown to decrease the reactive oxygen species (ROS) accumulation in leaves of *Arabidopsis* infected by *E. amylovora* (Dechorgnat *et al.*, 2012). Since this recent report suggests a role of NRT2.6 in the defense response, we visualized H_2O_2 in wild-type and mutant plants, inoculated or not with STM196, using diaminobenzidine (DAB). We failed to detect differences in the staining of roots of *nrt2.5* and *nrt2.6* single and double mutant plants compared with those of the wild-type plants (Fig. S1). This indicates that the NRT2.5- and NRT2.6-dependent control of growth promotion is independent from ROS production.

NRT2.1 is not involved in growth promotion and lateral root response to STM196

The phenotypes of *nrt2.5* and *nrt2.6* loss-of-function mutants might be explained by a lack of NO_3^- transport. To test this hypothesis, we analysed the growth promotion response to STM196, root architecture and NO_3^- accumulation of an *nrt2.1* loss of function mutant, which is deficient in the primary root uptake system (Filleur *et al.*, 2001; Nazoa *et al.*, 2003). We also assessed the impact of the *nrt2.1* mutation on phenotypic changes induced through *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations. For this purpose, *nrt2.1xnrt2.5* and *nrt2.1xnrt2.6* double mutants were generated.

Compared with non-inoculated Col-0 wild-type plants, the *nrt2.1* mutant plants exhibited an approximately 70% loss in biomass production in both the roots and shoots (Fig. 4a, b). This drastic alteration in the growth rate reflects the fact that NO_3^- was the unique source of nitrogen in our experiments and that NRT2.1 is primarily responsible for NO_3^- uptake (Filleur *et al.*, 2001; Nazoa *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). Plants from the *nrt2.1xnrt2.5* and *nrt2.1xnrt2.6* double mutant lines displayed the same growth rates as those of the *nrt2.1* mutant line. The epistatic effect of the *NRT2.1* mutation suggests that NRT2.5 and NRT2.6 act downstream of the *NRT2.1* gene. The inoculation of either the *nrt2.1* single mutant or the *nrt2.1xnrt2.5* and *nrt2.1xnrt2.6* double mutants with STM196 did not increase biomass accumulation in either the roots or shoots (Fig. 4a, b). The *NRT2.1* gene remained epistatic to *NRT2.5* and *NRT2.6* in the presence of STM196, suggesting that the NRT2.1-dependent NO_3^- uptake is essential for plant growth stimulation, similar to normal plant growth.

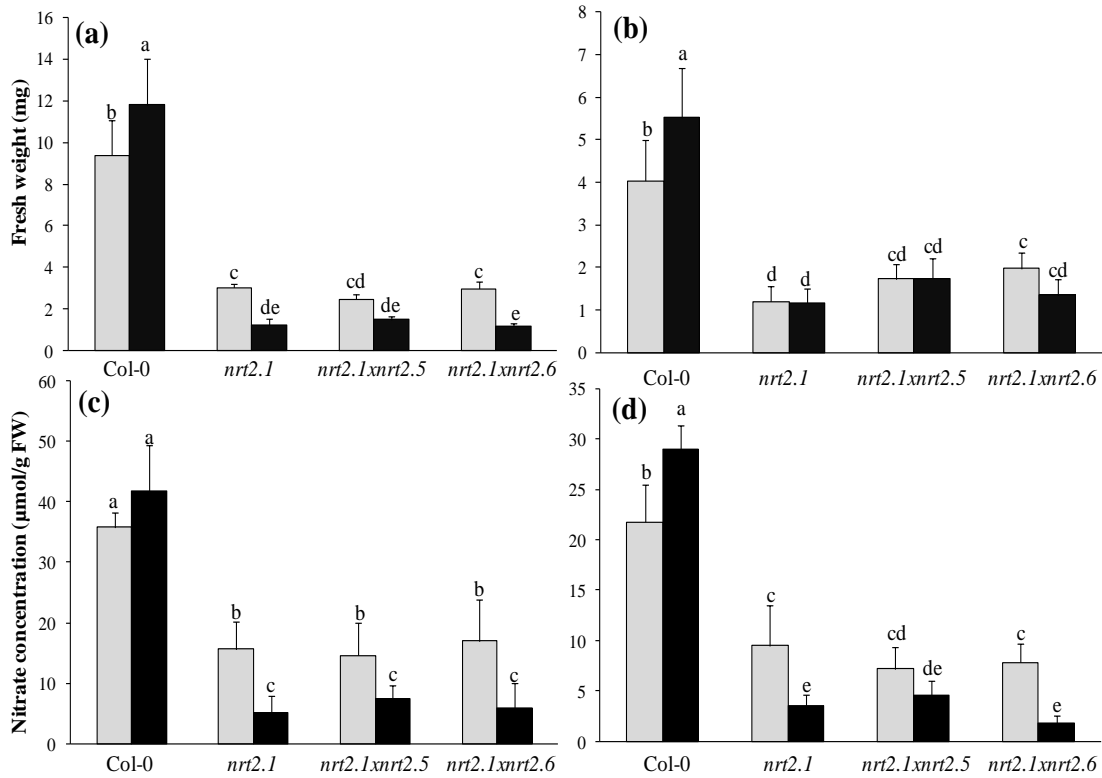


Fig. 4. The effect of the *nrt2.1* mutation on the plant fresh weight and nitrate content is epistatic to the *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations under both control and treated conditions.

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type or mutant plantlets were grown and transferred as described in Figure 1. Eight days after transfer, the shoots (a) and roots (b) of Col-0 and of *nrt2.1*, *nrt2.1xnrt2.5*, and *nrt2.1xnrt2.6* mutant plants inoculated with STM196 (black) or not (grey) were harvested and weighed. The amount of NO_3^- was measured in the shoots (c) and roots (d). Error bars indicate SE ($n = 20-25$). Different letters represent significant difference of the means using Fisher's LSD test ($p = 0.0001$).

A strong decrease of all three root architecture parameters measured (primary root length, number of lateral roots and lateral root length) accompanied the negative effect of the *nrt2.1* mutation on root growth, with the most dramatic effect observed on the lateral root length (Fig. S2). Notably, the root architecture change due to *nrt2.1* mutation exhibited concomitant decreases in primary root length and lateral root number, and the density of lateral roots was essentially unchanged. The knockout mutations of *NRT2.5* and *NRT2.6* did not further reduce primary root growth, lateral root number and lateral root growth in the *nrt2.1* background. The inoculation with STM196 did not complement, to any extent, the negative effects of the *nrt2.1* mutation on primary and lateral root growth; moreover, a strong reduction of lateral root number in the *nrt2.1* single mutants and the *nrt2.1xnrt2.5* and *nrt2.1xnrt2.6* double mutants was observed. Thus, *NRT2.1* is functionally epistatic to *NRT2.5* and *NRT2.6*, indicating that the N shortage in the *nrt2.1* mutant cannot be complemented through the pathway involved in the STM196 response, and consequently, the growth promotion and root architecture changes triggered through this bacterium are abolished.

As expected, a reduction in NO_3^- accumulation was observed in both the roots and shoots of *nrt2.1* mutant plants compared with the Col-0 wild-type plants (Fig. 4c, d). The *nrt2.1xnrt2.5* and *nrt2.1xnrt2.6* double mutants accumulated NO_3^- to the same low levels as the *nrt2.1* single mutant plants in both the roots and shoots. Surprisingly, the inoculation with STM196 led to a stronger diminution in NO_3^- accumulation in all plant parts of the three mutants, while the opposite effect was observed on the wild-type plants. Overall, the NO_3^- accumulation pattern was consistent with *NRT2.5* and *NRT2.6* not being involved in NO_3^- distribution within the plant.

STM196 induces upregulation of *NRT2.5* and *NRT2.6* expression independently to mutations in each other or in *NRT2.1*

Consistent with previous reports (Orsel *et al.*, 2002; Nazoa *et al.*, 2003), in non-inoculated Col-0 wild-type plants, *NRT2.1* was preferentially expressed in the roots (Fig. 5). In contrast, *NRT2.5* and *NRT2.6* expression levels were higher in the shoots than in the roots, and *NRT2.5* transcripts were barely detectable in the roots. This expression profile pattern is consistent with the results of our previous transcript analysis of the *NRT2* gene family (Mantelin *et al.*, 2006a). The expression levels of the *NRT2.1* gene were the same in the roots and shoots of *nrt2.5* and *nrt2.6* single and double mutants as in those of the Col-0

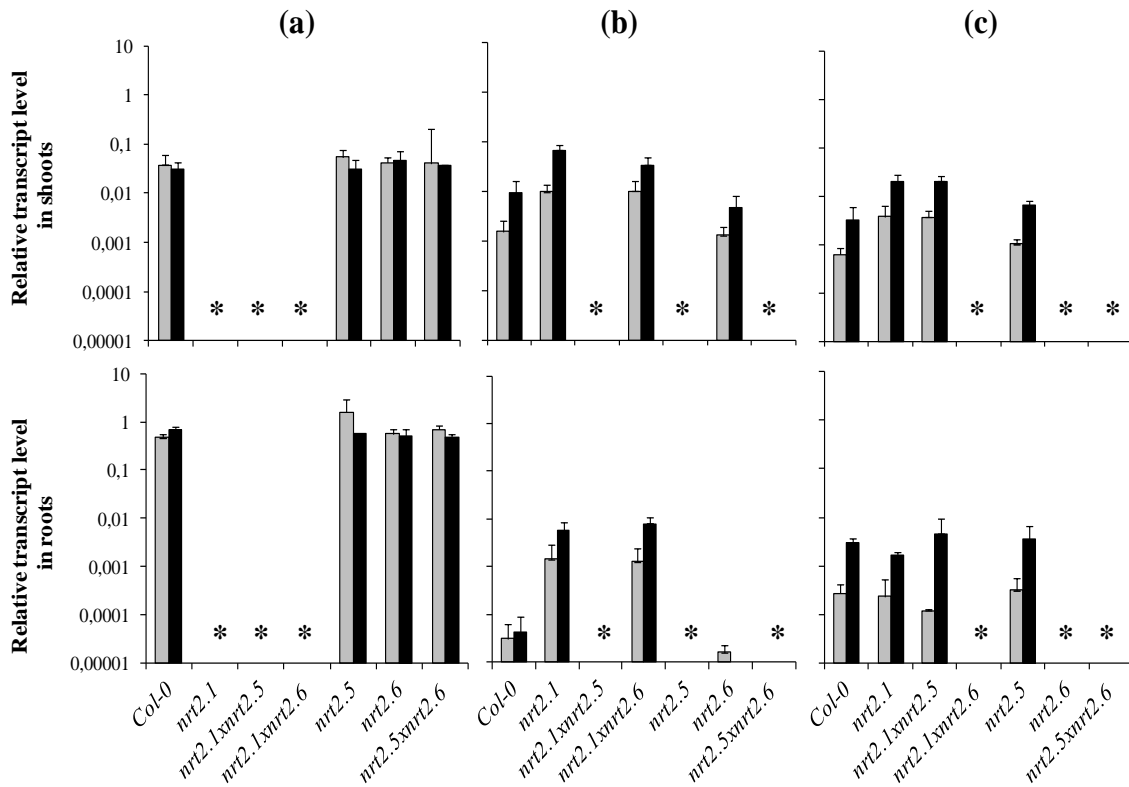


Fig. 5. The expression of *NRT2.5* and *NRT2.6* was induced by *STM196* in all the mutant lines analysed, while *NRT2.1* transcript accumulation remained unchanged.

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type or mutant plantlets were grown and transferred as described in Figure 1. Eight days after transfer, relative transcript levels of *NRT2.1* (a), *NRT2.5* (b) and *NRT2.6* (c) in the shoots (upper panels) and roots (bottom panels) were measured using quantitative RT-PCR analysis on the non-inoculated (grey) and *STM196*-inoculated (black) wild-type Col-0 and various mutants used in our study, as indicated on the X-axis. The transcript levels were normalised against *Actin2* (AT3G18780) and *Ubiquitine* genes (AT4G05320). Each bar represents the mean of at least three biological repetitions. Error bars indicate SE.

wild-type plants (Fig. 5a). In contrast, the *nrt2.1* mutation triggered an increased accumulation of *NRT2.5* and *NRT2.6* transcripts in roots and shoots (Fig. 5b, c), indicating that *NRT2.1* controls the expression of *NRT2.5* and *NRT2.6*. The *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations did not affect the accumulation of *NRT2.6* and *NRT2.5* transcripts, respectively, in either the roots or the shoots.

As previously reported (Mantelin *et al.*, 2006a), the inoculation with STM196 did not affect the *NRT2.1* expression level, but a marked accumulation of *NRT2.5* and *NRT2.6* transcripts was observed, particularly in the shoots where the two genes are expressed at the highest level (Fig. 5b, c). In both the shoots and roots of all mutant lines tested, STM196 induced *NRT2.5* and *NRT2.6* expression to the same extent as in the wild-type plants. Together, these results indicate that the expression responses of *NRT2.5* and *NRT2.6* to STM196 were unrelated.

Nitrate-reductase mutation does not trigger a change in *NRT2.5* and *NRT2.6* expression levels

STM196 affects the expression of both *NRT2.5* and *NRT2.6*, and we also observed the accumulation of NO_3^- in the roots (Fig. 1d). In addition, *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations abolished the STM196-induced NO_3^- accumulation in roots. Thus, it could be possible that the root accumulation of NO_3^- upon inoculation with STM196 reflects *NRT2.5* and *NRT2.6* activity. To assess this possibility we cultivated the nitrate reductase deficient G5 mutant, which lacks NR2 activity (Wilkinson & Crawford, 1991), in vertical Petri dishes on regular medium inoculated or not with STM196. As expected for plants supplied with NO_3^- as the sole N source, G5 exhibited a reduced growth rate compared with wild-type plants (Fig. 6a, b).

As predicted, the loss of nitrate reductase activity resulted in a strong increase of NO_3^- accumulation in the shoots (Fig. 6c, d). Unexpectedly, the G5 roots accumulated less NO_3^- than the wild-type plants. However, the global NO_3^- pool remained strongly increased by the *nr2* mutation at the whole plant level. No change in the *NRT2.5* and *NRT2.6* transcript levels in either organ in both non-inoculated and STM196-inoculated plants was observed (Fig. S3), suggesting that the expression levels of both genes are independent of the NO_3^- pool size. However, to have more conclusive evidence on *NRT2.5* and *NRT2.6* expression patterns would require knowing where the gene products are located, at the

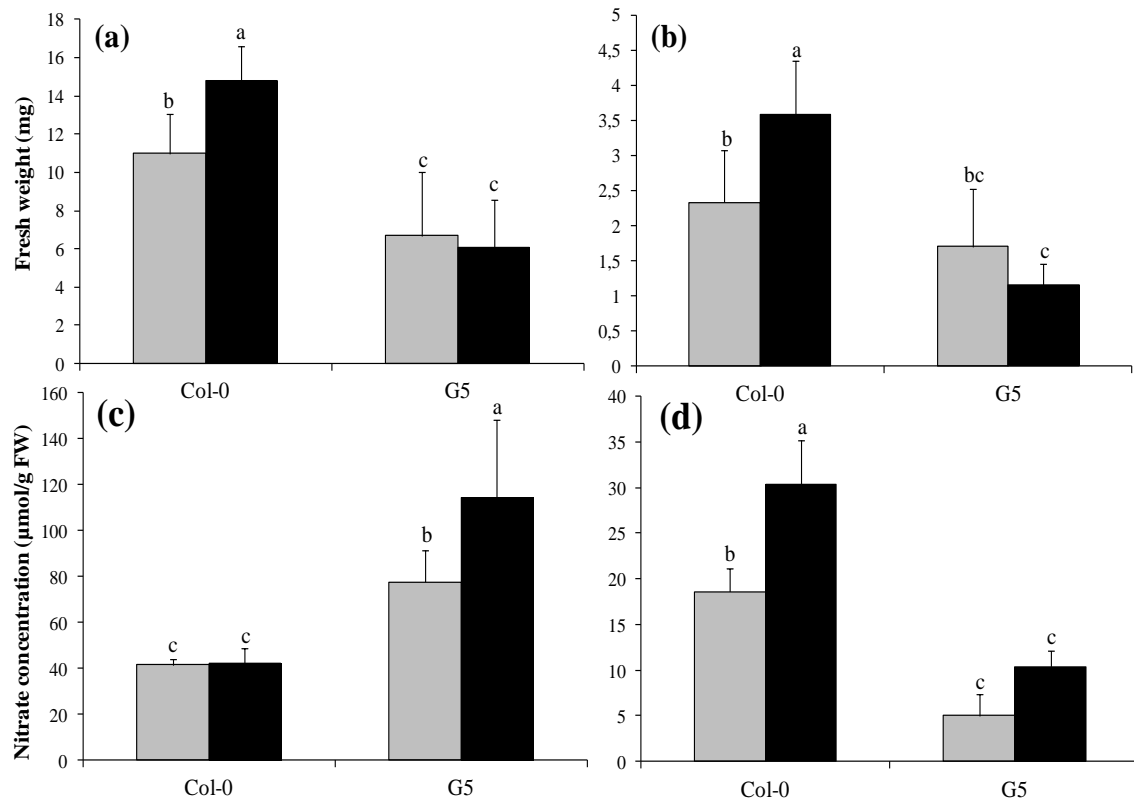


Fig. 6. The nitrate reductase NR2 is important for plant growth and growth promotion through STM196.

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type or mutant plantlets were grown and transferred as described in Figure 1. Eight days after transfer, the shoots (a) and roots (b) of Col-0 and G5 mutant (*nr2*) plants inoculated (black) or not (grey) were harvested separately and weighed. The NO_3^- content was measured in the shoots (c) and roots (d). Error bars indicate SE (n = 20-25). Different letters represent significant difference of the means using Fisher's LSD test (p = 0.0001).

subcellular and tissue levels. Notably, none of the genes of the *NRT2* family displayed a significant change in expression compared with wild-type plants (Fig. S3).

Overall, the deficiency in nitrate reductase activity reduced growth in non-inoculated plants and impeded STM196-induced growth. However, the NO_3^- accumulation induced through *nr2* mutations was not associated with plant growth, which would be consistent with the hypothesis that the growth promotion via *NRT2.5* and *NRT2.6* is independent from the NO_3^- pools.

Discussion

PGPR-induced plant growth is typically considered to involve plant hormone pathways (Lugtenberg & Kamilova, 2009), particularly auxin signalling either due to increased IAA production in bacterial cells, leading to an exogenous IAA provision to the plant roots (Loper & Schroth, 1986; Spaepen *et al.*, 2007), or due to a modification of the endogenous IAA distribution within the roots (Zhang *et al.*, 2007; Contesto *et al.*, 2010). However, we cannot exclude the possibility that PGPR also induces changes in the development and growth rate through other molecular targets that are not associated with the auxin-signalling pathway. In a previous study concerning the antagonistic effect of high nitrate supply and STM196 inoculation on lateral root development, we showed that two genes belonging to the *NRT2* family of nitrate transporters, *NRT2.5* and *NRT2.6*, are dramatically upregulated in inoculated plants (Mantelin *et al.*, 2006a). This observation raises two possibilities. Either *NRT2.5* and *NRT2.6* are involved in the growth promotion response or, alternatively, the accumulation of *NRT2.5* and *NRT2.6* transcripts could be a consequence of growth promotion. To investigate this possibility, we used *nr2.5* and *nr2.6* single mutants and generated an *nr2.5* x *nr2.6* double mutant line. The results clearly demonstrate that both the *NRT2.5* and *NRT2.6* genes are required for plant growth promotion response to STM196. Indeed, inoculation triggered no increase in the plant biomass in any of the three mutant lines, whereas STM196 actually stimulated the biomass production of both the roots and shoots in the Col-0 wild-type ecotype by 40% and 30%, respectively (Fig. 1). These two genes are the first components of a mechanism through which PGPR could interfere with plant N nutrition and growth promotion identified thus far.

The knockout *nr2.5* and *nr2.6* mutant plants grew at rates similar to wild-type plants when grown axenically. *NRT2.5* and *NRT2.6* proteins, therefore, must be involved

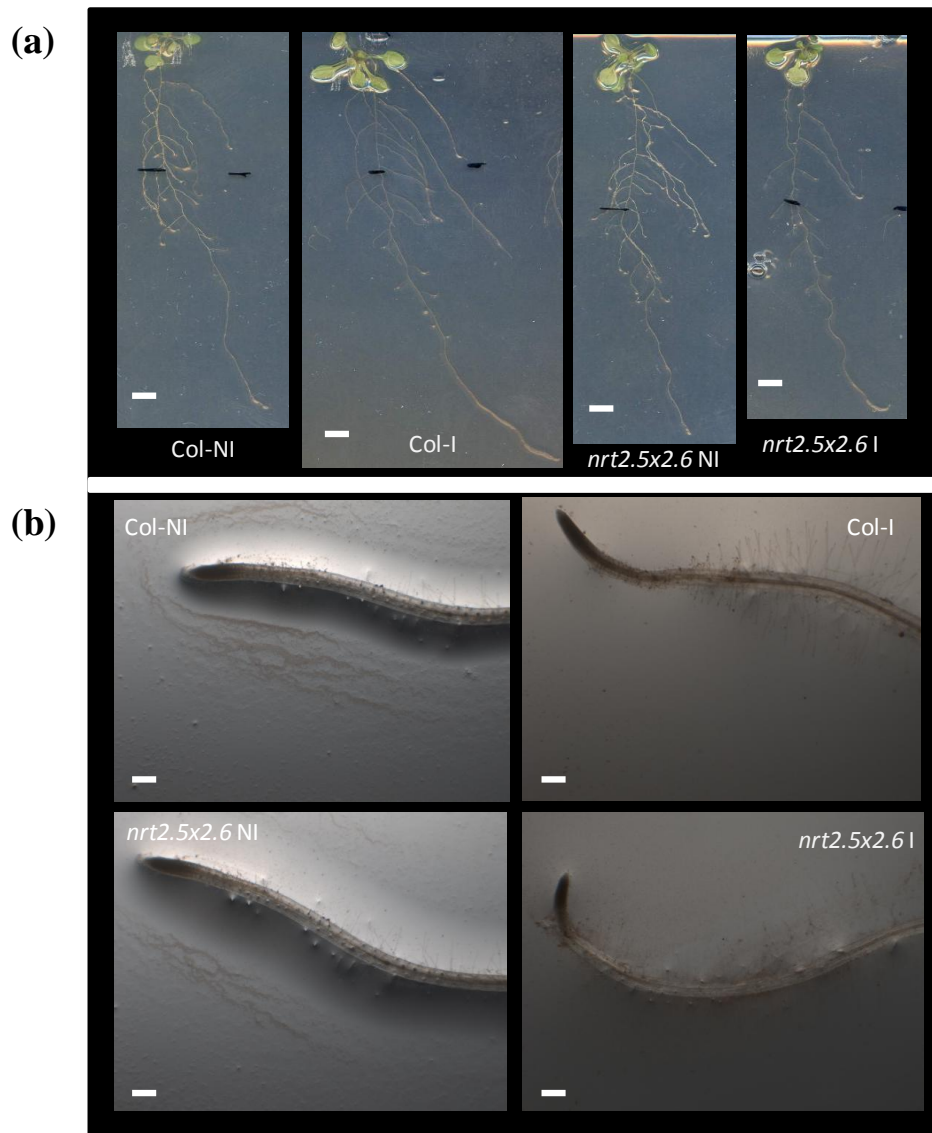


Fig. S1. DAB staining of *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild-type or *nrt2.5nrt2.6* mutant plantlets inoculated (I) or not (NI) with *Phyllobacterium brassicacearum* STM196.

The seeds were germinated and grown on a mineral medium containing 2 mM NO_3^- as the unique N source in vertically oriented Petri dishes for 7 days. Five to 6 homogeneous plantlets were subsequently transferred into new media inoculated or not with 10^{-8} cfu.ml $^{-1}$ STM196. Eight days after the transfer, 40 ml of 5 mM DAB (3,3'-Diaminobenzidine, D8001 SIGMA) solution were poured on the Petri dishes. The plantlets were incubated in this DAB solution for 12 h.

(a) Images of Petri dishes taken with a flatbed scanner (EPSON Perfection V200 photo). The scale bars represent 5 mm.

(b) Close-up image of primary root tip taken with a digital camera (DFC420c, Leica) mounted to a macroscope (Z16APO, Leica). The scale bars represent 280 μm .

in a regulatory pathway elicited through STM196 stimulation and not a general mechanism that controls growth. Interestingly, the growth defect in the double mutant was not additive (Fig. 1), indicating that both proteins could act in the same pathway. The gene expression analysis showed that neither the *nrt2.5* nor the *nrt2.6* mutations affect *NRT2.6* and *NRT2.5* transcript levels, respectively. This result suggests a lack of functional redundancy between these two genes, which would be consistent with different roles for the two gene products within a common pathway.

The best-described PGPR plant phenotype is lateral root proliferation (Kapulnik *et al.*, 1985; Lifshitz *et al.*, 1987; Bashan *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010). In fact, depending on the plant species and the PGPR strain studied, inoculation results in an increase in either the lateral root number or the lateral root length. In a detailed analysis of root architecture response to PGPR using VOC-emitting rhizobacteria *Bacillus spp.* isolated from lemon plant rhizospheres, the lateral root length was positively correlated with total biomass production in young *Arabidopsis* seedlings, while the other root parameters measured (primary root length, lateral root number and lateral root density) did not show a correlation with biomass production (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010). Similarly, STM196 primarily affects lateral root growth in the root system architecture of *Arabidopsis* seedlings (Contesto *et al.*, 2010). In this study, we observed the stimulation of the lateral root growth rate upon inoculation with STM196 in Col-0 wild-type plants. By comparison, both single mutants and the double mutant showed fewer long lateral roots and a diminished decrease in the shorter lateral roots (Fig. 3). Hence, *NRT2.5* and *NRT2.6* play a role in STM196-induced lateral root growth. Overall, the *NRT2.5*- and *NRT2.6*-mediated biomass production and lateral root growth responses to STM196 appear to be associated. A close relationship between the root architecture response and plant growth promotion is a general feature of the phenotypic changes induced by STM196 in *Arabidopsis*, as this effect has also been observed under various NO_3^- nutrition regimes (Mantelin *et al.*, 2006a) and in auxin mutants (Contesto *et al.*, 2010).

A priori, a relationship between root growth and whole plant biomass production could rely on improved mineral nutrition, particularly N. However, we previously showed that the increases in the lateral root growth rate and plant biomass production in STM196-inoculated *Arabidopsis* are accompanied by concomitant increases in plant N content (Mantelin *et al.*, 2006a). Hence, the regulation of N uptake due to increased root surface area cannot account for the stimulation of the biomass production rate. Thus, it is

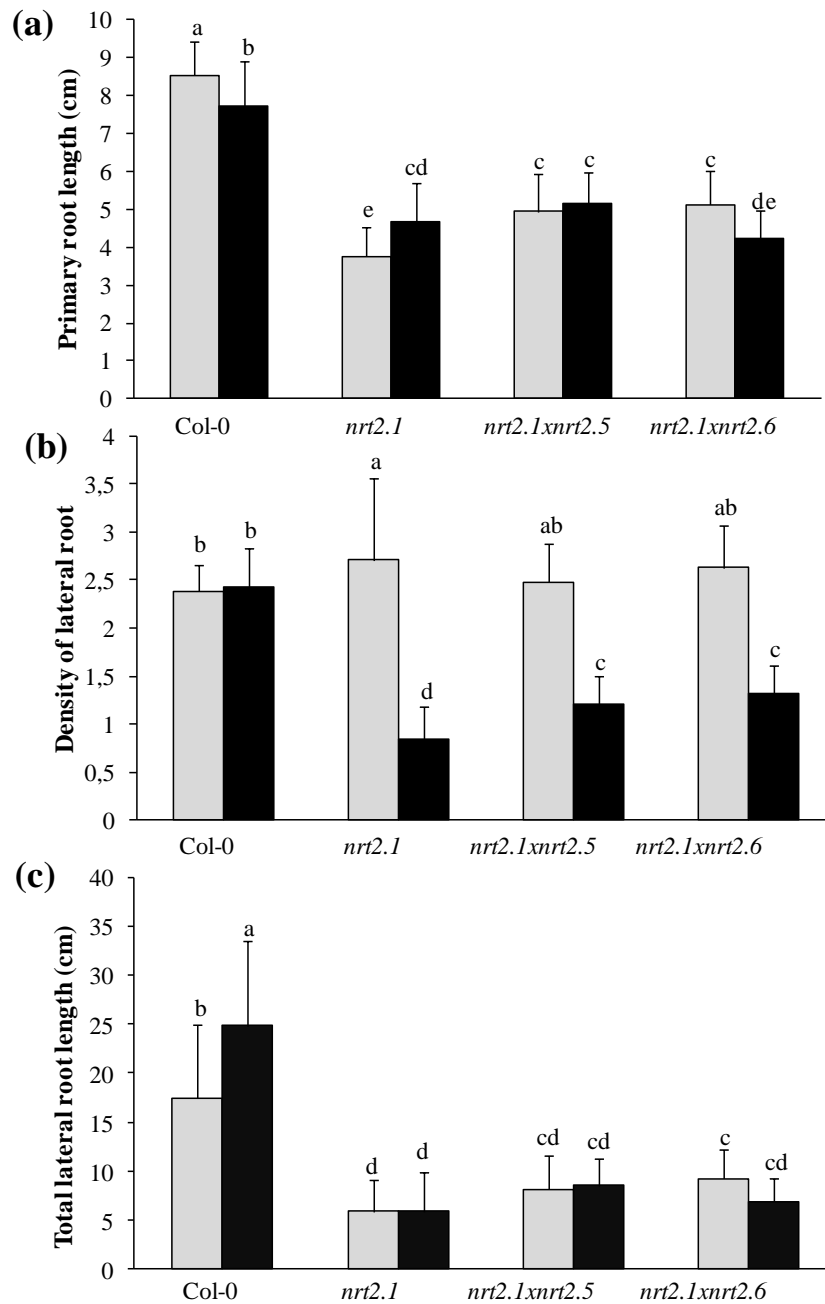


Fig. S2. The effect of the *nrt2.1* mutation on root architecture under control and treated conditions is epistatic to the *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations.

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type or mutant plantlets were grown and transferred as described in Figure 1. Eight days after transfer, the primary root length (a), density of lateral root (b), and total lateral root length (c) from non-inoculated (grey) and STM196-inoculated (black) plants were measured. Error bars indicate SE (n = 20-25). Different letters represent significant difference of the means using Fisher's LSD test at $P = 0.0001$.

reasonable to assume that NRT2.5- and NRT2.6-dependent growth promotion is unlikely to be the consequence of increased NO_3^- uptake. To directly characterise the relationship between the *NRT2.5*- and *NRT2.6*-dependent effect of STM196 and the provision of N, we investigated the impact of a strong decrease of NO_3^- uptake using an *nrt2.1* mutant. The *nrt2.1* mutation exhibited a strong negative impact on both biomass formation and root growth (Figs. 4, S1). This result is consistent with the fact that the larger part of high-affinity NO_3^- uptake depends upon the activity of NRT2.1 (Li *et al.*, 2007). Incidentally, this result also demonstrates that STM196 cells do not supply the plants with significant amounts of reduced N, including NH_4^+ . The rhizobacterial cells are likely to function as a C sink that ultimately drains organic compounds from roots to the rhizosphere (Lynch & Whipps, 1990; Kai & Piechulla, 2009). Under N deficiency, plants favour root growth over shoot growth (Scheible *et al.*, 1997). Therefore, a higher proportion of photosynthates are translocated to the roots. The C-sink effect might thus be much stronger in plants under N shortage, which could explain the significant decrease in the shoot growth observed in inoculated *nrt2.1* single and double mutant plants (Fig. 4). Contrary to the *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations, the *nrt2.1* mutation exhibited a strong negative effect on all three parameters of the root system architecture measured (primary root length, number of lateral roots and lateral root length) (Fig. S2). This effect distinguishes the role of NRT2.5 and NRT2.6 on plant development from the consequences of perturbed NO_3^- uptake. The epistatic effect of the *nrt2.1* mutation and the *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations indicates that NRT2.5 and NRT2.6 would act downstream of NRT2.1. Thus, the NRT2.1 transporter plays a major role in N provision, and the *nrt2.1* mutation dramatically impacts plant development and biomass formation regardless of whether the plants are inoculated. In contrast, the *NRT2.1* gene has been shown to be involved in the resistance of *Arabidopsis* against the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 by antagonizing the priming of plant defense (Camañes *et al.*, 2012). Thus, NRT2.1 does not seem to be part of a common core of molecular responses to biotic interactions, but rather to specifically interact with plant defense mechanisms. Contrary to NRT2.1, NRT2.5 and NRT2.6 are specifically involved in plant responses to STM196, which are potentially limited due to N shortage in the *nrt2.1* background. Overall, the NRT2.5- and NRT2.6-dependent effect of STM196 is unlikely to be mechanistically linked to NO_3^- uptake, although the capacity of STM196 to promote plant growth depends upon a sufficient level of N provision because of the strong dependence of plant growth on N nutrition.

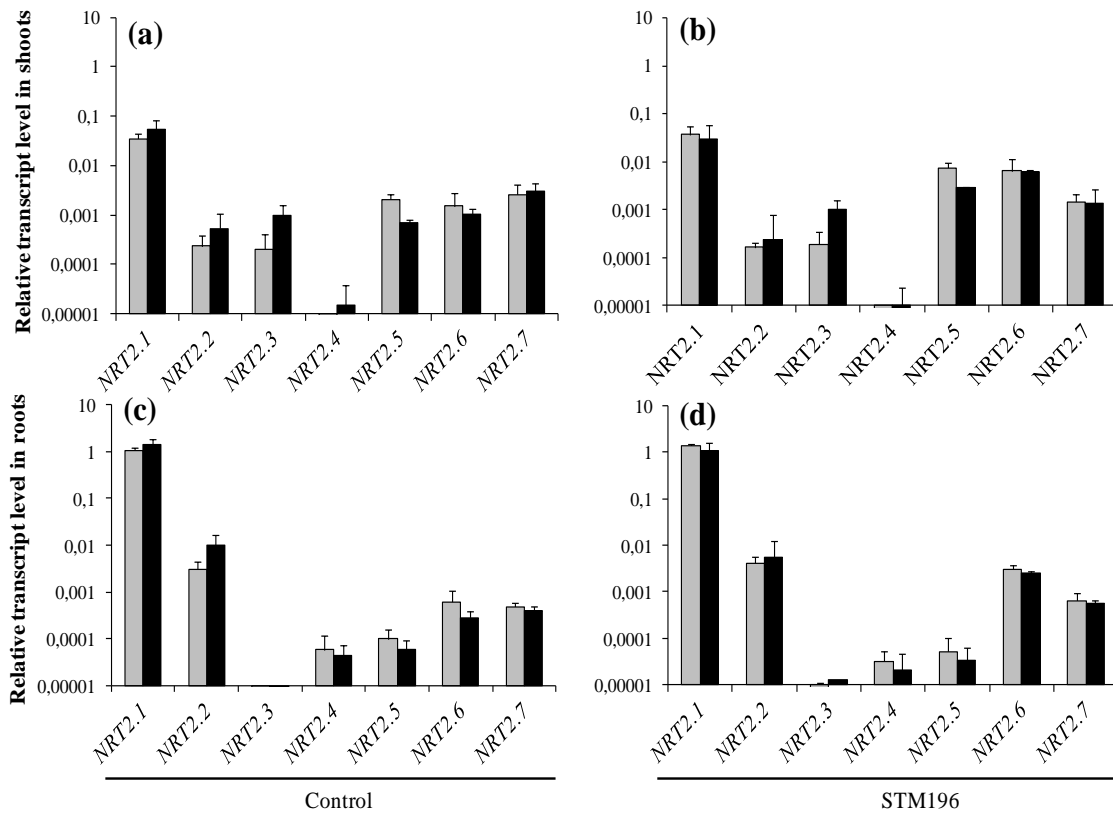


Fig. S3. The *nr2* mutation did not significantly affect the accumulation of *NRT2* family transcripts.

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type or mutant plantlets were grown and transferred as described in Figure 1. Eight days after transfer, the shoots (a) and roots (c) of uninoculated plants or the shoots (b) and roots (d) of STM196-inoculated plants were harvested separately, and total RNA was extracted. The grey bars represent relative transcript levels of *NRT2.1*, *NRT2.2*, *NRT2.3*, *NRT2.4*, *NRT2.5*, *NRT2.6* and *NRT2.7* in the shoots and roots of Col-0 plantlets, while the black bars represent those of the G5 mutant. The transcript levels were normalised against *Actin2* (AT3G18780) and *Ubiquitine* genes (AT4G05320). Each bar represents the mean of at least three biological repetitions. Error bars indicate SE.

The development of plants is not only quantitatively dependent upon sufficient N provision but also both qualitatively and quantitatively dependent upon the plant N status, i.e., the forms and distribution of N compounds within the plant body. For instance, NO_3^- and amino acids have been demonstrated as important signals in regulatory processes that control NO_3^- transporters, N metabolism and root development (Imsande & Touraine, 1994; Zhang & Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Nazoa *et al.*, 2003; Tranbarger *et al.*, 2003; Forde & Walch-Liu, 2009). Plants supplied with high levels of NO_3^- favour the growth of shoots and restrict the allocation of biomass to roots, resulting in shorter lateral roots (Scheible *et al.*, 1997). Previously, we showed that STM196 simultaneously stimulates lateral root development and increases the total N nutritional status without any decrease in leaf NO_3^- content (Mantelin *et al.*, 2006a). In the wild-type plant, and as previously reported, the NO_3^- concentration in the leaves was not negatively correlated with root growth upon inoculation with STM196 (compare Fig. 1c and Fig. 1b). This result was also observed with *nrt2.5* and *nrt2.6* single and double mutant plants, confirming that STM196 promotes plant growth independently from N status sensing and that NRT2.5 and NRT2.6 are involved in plant growth promotion by STM196 independently from N status sensing.

The plant *NRT2* gene family that codes for nitrate-nitrite porters (NNP) has 7 members (Forde, 2000). Until recently, only NRT2.1, the major component of NO_3^- uptake in *Arabidopsis*, has been well characterised (Filleur *et al.*, 2001; Nazoa *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). Among the six other members of this gene family, *NRT2.7* is specifically expressed in the reproductive organs, with a peak of transcript accumulation in dry seeds (Chopin *et al.*, 2007). Functional analysis showed that the *NRT2.7* mutation had no impact during vegetative development, but the seed NO_3^- content was affected. GFP-tagged NRT2.7 proteins were localised in the tonoplasts. More recently, another NRT2 transporter, called NRT2.4, has been characterised *in planta* (Kiba *et al.*, 2012). In this study, the NRT2.4 protein was localised in lateral root epidermis cells and in the phloem in the shoots. Similar to NRT2.1 and contrary to NRT2.7, NRT2.4 is localised to the plasma membrane. Recently, it has been reported that *Arabidopsis* leaf protoplasts transformed with YFP-labeled *NRT2* genes exhibit strong fluorescence localised in the plasma membrane, except for NRT2.7 (Kotur *et al.*, 2012), which strongly suggests that NRT2.5 and NRT2.6, like NRT2.1 and NRT2.4, are plasma membrane transporters; however, no indication of their tissue localisation in planta is available yet.

To actively transport NO_3^- , NRT2.1 forms a two-component complex with NAR2.1 (Okamoto *et al.*, 2006; Orsel *et al.*, 2006). This latter protein is likely involved in NRT2.1 stability (Wirth *et al.*, 2007). In addition, the active nitrate transporter in the plasma membrane is a tetramer comprising two subunits each of NRT2.1 and NAR2.1 (Yong *et al.*, 2010). An exhaustive study of nitrate transport capacity of *Arabidopsis* NRT2 family members revealed that all the NRT2s mediated significant $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake into *Xenopus* oocytes co-injected with an *NRT2* and *NAR2.1* cRNAs, while only a low (or no) $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake was observed when the oocytes were injected with cRNA of *NRT2s* alone (Kotur *et al.*, 2012). In this latter study, the bimolecular fluorescence complementation in *Arabidopsis* protoplasts demonstrated that NRT2.5 and NRT2.6, similarly to all the NRT2s except NRT2.7, interact with NAR2.1 at the plasma membrane (similarly to what has been discovered previously with NRT2.1). Thus, in the absence of further information on the role of NRT2.5 and NRT2.6 *in planta*, it is likely that both proteins can transport NO_3^- across plasma membrane in the high affinity range. However, neither the *nrt2.5* nor the *nrt2.6* mutation significantly affected NO_3^- accumulation and distribution between the roots and shoots (Fig. 1c, d), indicating that the NRT2.5 and NRT2.6 proteins do not play an important role in the NO_3^- transport between these organs, at least not at the young vegetative stage we investigated.

Considering that NRT2.5 and NRT2.6 do not play an important role in NO_3^- distribution within the plant, it is unlikely that their role in STM196-induced growth promotion would occur through a modification of N nutrition. The role of NRT2.5 and NRT2.6 in PGPR response as NO_3^- transporters, however, cannot be ruled out. Indeed, these two proteins could be involved in the distribution of NO_3^- into specific cells, where the concentration of NO_3^- would interfere with mechanisms involved in the PGPR-induced growth promotion response. Alternatively, as shown for other NO_3^- transporters, NRT2.5 and NRT2.6 could act not only as NO_3^- transporters but also as receptors (Gojon *et al.*, 2011). In this latter case, NRT2.5 and NRT2.6 would sense some systemic signal elicited through PGPR interaction. Interestingly, the gene expression analysis using the Genevestigator database (<http://www.genevestigator.com/>) revealed that both *NRT2.5* and *NRT2.6* are overexpressed in plants challenged with pathogens or treated with the flg22 oligopeptide. A correlation between *NRT2.6* expression and ROS production has been found in *Arabidopsis* leaves inoculated with the pathogenic bacterium *E. amylovora* (Dechorgnat *et al.*, 2012). By contrast, *nrt2.5* and *nrt2.6* mutations induced no difference

in ROS accumulation of roots upon inoculation with STM196 (Fig. S1). Thus, *NRT2.5* and *NRT2.6* genes are likely involved in general microorganism recognition pathways independently from ROS production.

The fact that the expression of *NRT2.5* and *NRT2.6* is upregulated in the leaves of plants challenged with rhizospheric bacteria indicates that these genes must respond to some systemic signal circulating between the roots and shoots of inoculated plants. This signal and the *NRT2.5*- and *NRT2.6*-dependent mechanism responsible for plant growth promotion under PGPR inoculation remain unknown. One possibility would involve the hormone auxin, since STM196 affects auxin distribution within primary and lateral roots (Contesto *et al.*, 2010). It would be interesting to address this question by investigating whether *nrt2.5* and/or *nrt2.6* mutation affects IAA distribution in inoculated and non-inoculated plants, e.g. using an auxin-responsive reporter gene. Whatever the links between *NRT2.5/NRT2.6* activities and auxin distribution pattern, these two genes are interesting targets to optimise beneficial rhizobacteria-plant interactions in the context of reduced fertiliser inputs.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Ann Krapp and Dr. Françoise Vedèle (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, Versailles, France) for kindly providing the *nrt2.5* and *nrt2.6* *Arabidopsis* mutant lines and Dr. Alain Gojon (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes [UMR5004 CNRS, INRA, SupAgro, Université Montpellier 2], Institut de Biologie Intégrative des Plantes, Montpellier, France) for the *nrt2.1-3* line. The authors would also like to thank Samia Henini for technical assistance. This work was partially supported through an Averroes mobility grant to Maya Kechid.

References

- Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A. 2002.** Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils* **35**: 231-237.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. 2004.** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 521-577.

- Bertrand H, Nalin R, Bally R, Cleyet-Marel J-C. 2001.** Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and Fertility of Soils* **33**: 152-156.
- Camañes G, Pastor V, Cerezo M, García-Andrade J, Vicedo B, García-Agustín P, Flors V. 2012.** A deletion in *NRT2.1* attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiology* **158**(2): 1054-1066.
- Chopin F, Orsel M, Dorbe M-F, Chardon F, Truong H-N, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2007.** The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *The Plant Cell* **19**(5): 1590-1602.
- Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G, Varoquaux F, Bellini C, Kowalczyk M, Touraine B. 2010.** The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* **232**: 1455-1470.
- Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F. 2012.** Characterization of the *Nrt2.6* gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS ONE* **7**(8): e42491.
- Desbrosses G, Varoquaux F, Touraine B 2012.** *Arabidopsis* as a Model System to Decipher the Diversity and Complexity of Plant Responses to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: Maheshwari DK ed. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 227-250.
- Filleur S, Dorbe MF, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F. 2001.** An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.* **489**: 220-224.
- Forde BG. 2000.** Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**: 219-235.
- Forde BG, Walch-Liu PIA. 2009.** Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant, Cell & Environment* **32**(6): 682-693.
- Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E. 2011.** Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**(7): 2299-2308.
- Gutiérrez-Luna F, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, de la Cruz H, Macías-Rodríguez L. 2010.** Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* **51**(1): 75-83.
- Henricksen A, Semer-Olsen AR. 1970.** Automatic methods for determining nitrate and nitrite in water and soil extracts. *Analyst* **95**: 514-518.

- Imsande J, Touraine B. 1994.** N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* **105**: 3-7.
- Kai M, Piechulla B. 2009.** Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles - An effect of CO₂? *FEBS Letters* **583**(21): 3473-3477.
- Kapulnik Y, Okon Y, Henis Y. 1985.** Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Canadian Journal of Microbiology* **31**: 881-887.
- Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, Krapp A. 2012.** The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* **24**(1): 245-258.
- Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN, Glass ADM. 2012.** Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytologist* **194**(3): 724-731.
- Li W, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass ADM. 2007.** Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology* **143**(1): 425-433.
- Lifshitz R, Kloepper JW, Kozlowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM, Zaleska I. 1987.** Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology* **33**(5): 390-395.
- Loper JE, Schroth MN. 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* **76**: 386-389.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009.** Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**(1): 541-556.
- Lynch JM, Whipps JM. 1990.** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* **129**(1): 1-10.
- Mantelin S, Desbrosses G, Larcher M, Tranbarger TJ, Cleyet-Marel J-C, Touraine B. 2006a.** Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta* **223**(3): 591-603.
- Mantelin S, Fisher-Le Saux M, Zakhia F, Béna G, Bonneau S, Jeder H, de Lajudie P, Cleyet-Marel J-C. 2006b.** Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 827-839.

- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass ADM, Touraine B. 2003.** Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology* **52**: 689-703.
- Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass ADM. 2006.** High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiology* **140**(3): 1036-1046.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ. 2006.** Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiology* **142**(3): 1304-1317.
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2002.** Analysis of the *NRT2* nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* **129**: 886-896.
- Scheible W-R, Lauerer M, Schulze E-D, Caboche M, Stitt M. 1997.** Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal* **11**(4): 671-691.
- Shi C-L, Park H-B, Lee J, Ryu S, Ryu C-M. 2010.** Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90-166 is through both auxin-dependent and -independent signaling pathways. *Molecules and Cells* **29**(3): 251-258.
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N. 1983.** Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* **35**: 225-233.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* **31**(4): 425-448.
- Tranbarger TJ, Al-Ghazi Y, Muller B, Teysseidier de la Serve B, Dumas P, Touraine B. 2003.** Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **26**: 459-469.
- Vessey JK. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571-586.
- Wilkinson JQ, Crawford NM. 1991.** Identification of the *Arabidopsis* Chl3 Gene as the Nitrate Reductase Structural Gene *Nia2*. *Plant Cell* **3**(5): 461-471.
- Wirth J, Chopin F, Santoni V, Viennois G, Tillard P, Krapp A, Lejay L, Daniel-Vedele F, Gojon A. 2007.** Regulation of Root Nitrate Uptake at the *NRT2.1* Protein Level in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **282**(32): 23541-23552.

- Yong Z, Kotur Z, Glass ADM. 2010.** Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. *The Plant Journal* **63**(5): 739-748.
- Zhang H, Forde BG. 1998.** An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**(5349): 407-409.
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG. 1999.** Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of National Academy of Science USA* **96**: 6529-6534.
- Zhang H, Kim M-S, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu C-M, Allen R, Melo IS, Paré PW. 2007.** Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* **226**(4): 839-851.

Chapitre 4 :

Etude des régulations entre les gènes de transporteur de nitrate *NRT2.1*, *NRT2.5*, *NRT2.6* et la nitrate réductase *NR2* en présence et en absence de *STM196*

4.1. Introduction

L'azote est parmi les constituants majeurs de la biomasse de la plante. Celle-ci est autotrophe non seulement pour le carbone mais aussi pour l'azote : elle a la capacité de former tous ses composés organiques azotés à partir d'une source de carbone minérale, le CO₂, et d'une source d'azote minérale puisée dans la solution du sol. La principale source d'azote pour les plantes est le nitrate. L'ion NO₃⁻ est transporté de l'extérieur à l'intérieur de la plante par des transporteurs qui assurent la traversée de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme ou du cortex racinaire. Au niveau des racines, NO₃⁻ peut soit être stocké dans les vacuoles, soit être assimilé dans le cytoplasme des cellules racinaires, ou encore être transporté dans la sève brute circulant dans le xylème des racines vers les feuilles. Chez *Arabidopsis*, la plus grande partie des ions NO₃⁻ absorbés suivent cette troisième voie, son assimilation en acides aminés étant majoritairement assurée par les feuilles. La circulation du nitrate dans la plante, entre compartiments cellulaires ou entre tissus et organes, requiert le franchissement de membranes biologiques, et implique donc des transporteurs spécifiques. Jusqu'à aujourd'hui, deux familles de gènes, *NRT1* et *NRT2*, ont été identifiées comme pouvant coder des transporteurs de NO₃⁻ (Dechorgnat *et al.*, 2011). Le principal responsable de l'absorption de NO₃⁻ est NRT2.1, transporteur à forte affinité pour son substrat, NRT1.1 et NRT1.2 agissant plutôt comme des transporteurs à faible affinité et jouant un rôle quantitativement plus modeste dans l'influx de NO₃⁻ dans la racine.

Nous avons montré que les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* sont requis pour la stimulation de la croissance de la plante par STM196 (cf. Chapitre 3). Les mutations pertes-de-fonction dans ces gènes n'affectent pas l'accumulation de NO₃⁻ dans les racines et les feuilles de plantes non inoculées, suggérant que les produits de ces gènes ne jouent pas ou peu de rôle dans l'absorption de cet ion ni dans son transport des racines vers les feuilles. Le seul effet significatif des mutations *nrt2.5* et *nrt2.6* est l'absence d'accumulation supplémentaire de NO₃⁻ dans les racines des plantes inoculées comparées à celles qui sont cultivées en condition axénique. L'appartenance des deux gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* à la famille NRT2 suggère qu'ils codent des transporteurs, mais leur fonction et leur implication dans le transport de nitrate ne sont pas claires. Leurs séquences nucléotidiques présentent une similarité de 60,85% et 66,95% respectivement avec *NRT2.1* ; les protéines

prédites ont une similarité de 67,1% et 76,4% respectivement (Orsel *et al.*, 2002). S'ils sont impliqués dans le transport de NO_3^- , il est fort possible qu'ils affectent sa voie d'assimilation. Cette voie débute par la réduction de NO_3^- en NO_2^- , étape catalysée par l'enzyme nitrate réductase (NR). Chez *Arabidopsis*, il existe deux isoformes, NR1 et NR2. L'activité nitrate réductase est présente dans les feuilles et dans les racines, mais elle est beaucoup plus forte dans les premières (Hänsch *et al.*, 2001; Cheeseman & Tankou, 2004; Krapp *et al.*, 2011). D'autres travaux révèlent que la NR n'est pas seulement impliquée dans la réduction des ions NO_3^- en NO_2^- mais qu'elle est aussi responsable de la libération de monoxyde d'azote (NO), molécule signal (Guo *et al.*, 2003). Ceci est illustré par la plus grande sensibilité de doubles mutants *nr1-nr2* aux infections bactériennes et à la diminution de l'infection par l'ajout de NO (Vitor *et al.*, 2013).

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est de rechercher si le métabolisme azoté est impliqué dans les effets de STM196 sur la croissance et sur l'architecture racinaire. Les deux étapes limitantes du métabolisme azoté des plantes cultivées sur un milieu où la seule source d'azote est NO_3^- sont son absorption, qui dépend surtout de NRT2.1, et sa réduction par la NR. Comme, d'autre part, nous avons montré que la stimulation de croissance par STM196 dépend de NRT2.5 et NRT2.6, nous avons étudié la relation entre les gènes de la famille *NRT2* de transporteurs de nitrate et les deux gènes de nitrate réductase (*NR1* et *NR2*), ainsi que l'unique gène de nitrite réductase (*NIR*). Le transport et l'assimilation de nitrate sont nécessairement liés, la disponibilité de NO_3^- pour le métabolisme dépendant de son transport et les produits de son assimilation régulant son transport (Naoza *et al.*, 2003). A priori, l'inoculation avec STM196 peut entraîner des changements dans le transport et/ou la réduction de NO_3^- et modifier leurs régulations. Pour aborder cette question, nous avons utilisé des mutants de NR chez lesquels l'assimilation est réduite et l'accumulation de NO_3^- augmentée et des mutants *nrt2.1* chez lesquels l'absorption de NO_3^- est fortement diminuée. Nous avons choisi d'étudier le simple mutant G5 portant une mutation perte de fonction dans le gène *NR2* codant pour l'isoforme majoritaire de NR, car celui-ci a une ANR très fortement diminuée, mais peut se développer sur une solution où NO_3^- est la seule source d'azote (Wilkinson & Crawford, 1991, 1993). Les mutants de transporteurs de NO_3^- utilisés sont les doubles mutants déjà utilisés dans le chapitre 3, avec des pertes de fonctions dans leurs gènes *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6*.

Chez le mutant G5, le gène *NR2* est muté par délétion et l'activité nitrate réductase est réduite à environ 10% celle des plantes sauvages (Wilkinson & Crawford, 1991, 1993), indiquant que l'isoforme NR2 assure la majeure partie de la réduction de NO_3^- . Ce mutant a été décrit comme ayant une croissance identique à celle de l'écotype sauvage lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu ne contenant que NO_3^- comme source d'azote (Wilkinson & Crawford, 1991). Ceci illustre le fait que l'ANR est 10 à 15 fois supérieure à la valeur requise pour assurer la croissance de la plante (Cheeseman & Tankou, 2004). Nous n'avons pas utilisé de double mutants *nr1-nr2* dans notre étude car ceux-ci ne se développent pas dans nos conditions de culture où la seule source d'azote est le nitrate (résultats non montrés). Nous attendons chez le mutant G5 une augmentation de la concentration de NO_3^- dans les tissus de la plante, donc une modification du statut nutritionnel azoté sans perturbation de croissance.

Chapitre 5 :

Effet de STM196 sur la stimulation de l'elongation des poils racinaires ainsi que sur le niveau des transcrits de ZAT10, NAC42 et WRKY46 en présence des mutations *nrt2.1*, *nrt2.5*, *nrt2.6* et *nr2*.

5.1. Introduction

Les plantes se caractérisent par une très grande plasticité phénotypique : elles peuvent modifier profondément leur physiologie et/ou leur morphogénèse pour s'adapter aux variations de leur environnement abiotique (Nicotra *et al.*, 2010). La croissance est une résultante complexe de facteurs développementaux endogènes, plus ou moins modulés par des voies de signalisation induites en réponse à des facteurs environnementaux, et de facteurs nutritionnels. Ainsi, on observe généralement une plus forte croissance des parties aériennes lorsqu'on augmente le niveau de fertilisation azotée, mais cette augmentation de biomasse aérienne s'accompagne d'une diminution de la biomasse racinaire (Scheible *et al.*, 1997b). Les facteurs abiotiques ne sont pas les seuls facteurs de l'environnement affectant la physiologie et le développement de la plante (et, par voie de conséquence, sa croissance) ; des agents biotiques peuvent entraîner des réponses physiologiques ou développementales. En particulier, le développement et la croissance de la plante sont affectés de manière positive par les PGPR, bactéries qui colonisent sa rhizosphère.

Comme de nombreuses PGPR décrites dans la littérature, *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induit des changements dans l'architecture racinaire qui tendent à accroître la surface racinaire par un développement accéléré des racines latérales (Mantelin *et al.*, 2006a; Contesto *et al.*, 2010). Cette augmentation de la surface d'échange racinaire est un facteur qui a souvent été avancé pour expliquer la stimulation de la croissance de la plante par les PGPR via une amélioration de sa nutrition (Mantelin & Touraine, 2004). Une autre réponse retrouvée chez des plantes inoculées avec différentes souches de PGPR est une augmentation du nombre et de la longueur des poils racinaires (Ribaudou *et al.*, 2006; Contesto *et al.*, 2008; Galland *et al.*, 2012). Sur la plante modèle *Arabidopsis*, il a été montré que les cellules épidermiques se différencient en poils racinaires ou en cellules non poils organisées en lignées cellulaires longitudinales issues respectivement de trichoblastes et d'atrachoblastes (Schiefelbein, 2000). Chez *Arabidopsis*, le contrôle génétique de cette différenciation est décrypté en détail (Schiefelbein *et al.*, 2009). Ce processus développemental repose à la fois sur un effet de position (un poil racinaire est en contact avec deux cellules corticales sous-jacentes tandis qu'une cellule non poil est adjacente à une cellule corticale unique) et sur une régulation spatiale (mécanisme d'inhibition de la différenciation en poil racinaire d'une cellule épidermique par une cellule poil en position latérale). Une augmentation de la densité et de la longueur

des poils racinaires en réponse à l'inoculation avec des PGPR a été rapportée chez diverses espèces végétales mises en présence de diverses souches de rhizobactéries (e.g. Bashan *et al.*, 1989; Ribaudó *et al.*, 2006). A notre connaissance, il n'existe pas de preuve expérimentale d'un effet des PGPR sur l'initiation des poils racinaires ; en effet, l'augmentation de leur densité peut aussi bien refléter une stimulation de l'initiation que, par exemple, une diminution de l'élongation des cellules épidermiques ou une différenciation plus rapide de ces cellules conduisant à une plus grande proximité de poils racinaires initiés en réalité avec la même fréquence. Des études approfondies sur cette question manquent. Dans le cas de la souche STM196, l'effet majeur sur les poils racinaires est l'augmentation de sa longueur d'un facteur 3 à 5 (Contesto *et al.*, 2008; Galland *et al.*, 2012).

La membrane plasmique des poils racinaires est riche en transporteurs et canaux, tels que des aquaporines (Takano *et al.*, 2006; Brechenmacher *et al.*, 2009), des transporteurs de phosphate (Daram *et al.*, 1998; Schünmann *et al.*, 2004; Brechenmacher *et al.*, 2009), des transporteurs d'ammonium, de nitrate, de peptide, d'acide aminée et d'urée (Loqué *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2007), ainsi que des canaux potassiques (Ahn *et al.*, 2004; Lan *et al.*, 2010). Bien que ces canaux et transporteurs ne soient pas localisés exclusivement dans la membrane plasmique des poils racinaires, mais aussi dans celle des cellules épidermiques non poils et des cellules corticales, et que de nombreuses données montrent que l'absorption racinaire ne se restreint pas aux poils racinaires, l'extension de la surface d'échange permise par la forme fine et allongée des poils racinaires est un facteur important pour assurer l'alimentation hydrique et minérale de la plante. Ainsi, les poils racinaires ont un rôle particulièrement prépondérant vis-à-vis des nutriments très dilués ou peu solubles dans le sol comme le phosphate (Marschner, 1995). Une étude récente a montré que la participation des poils racinaires à l'absorption de phosphate est cruciale dans les conditions de faible disponibilité en phosphate soluble dans le sol (Leitner *et al.*, 2010). Ainsi, l'allongement des poils racinaires chez les plantes en interaction avec une PGPR pourrait être un facteur important pour l'amélioration de la nutrition hydrique et minérale de la plante, particulièrement dans des conditions de carence minérale ou de stress hydrique modéré. Dans nos conditions expérimentales (solution nutritive complète non limitante pour la croissance de la plante), l'absorption racinaire est probablement très peu dépendante de la longueur des poils racinaires. Cependant, ces conditions conviennent très bien à l'étude de l'effet de la PGPR sur l'allongement des poils racinaires de par le

contrôle rigoureux de la composition de la solution et de l'inoculation d'une part et l'accès aisé à la mesure de longueur d'un grand nombre de poils racinaires permettant des études statistiquement solides (Contesto *et al.*, 2008). Les études réalisées dans l'équipe avant ce travail de thèse indiquent que l'effet de STM196 sur l'allongement des poils racinaires est indépendant de la voie de l'auxine (Desbrosses *et al.*, 2009) et qu'il dépend de manière marginale de la voie de l'éthylène (Contesto *et al.*, 2008). En effet, l'augmentation de la longueur des poils racinaires induite par STM196 est retrouvée dans des mutants affectés dans le transport ou la transduction de l'auxine, de même que dans des mutants insensibles à l'éthylène. Ce résultat est surprenant puisque les deux facteurs majeurs identifiés pour la régulation de l'allongement des poils racinaires chez *Arabidopsis* cultivé en condition axénique sont l'auxine et l'éthylène (ce second surtout) (Pitts *et al.*, 1998). Ainsi, les travaux précédemment réalisés avec la souche STM196 montrent qu'il doit exister une voie encore inconnue de contrôle de l'élongation des poils racinaires, indépendante des hormones auxine et éthylène (Contesto *et al.*, 2008; Desbrosses *et al.*, 2009; Galland *et al.*, 2012). En réalité, la voie de l'éthylène semble impliquée dans l'effet de STM196 sur l'élongation des poils racinaires mais elle aurait un rôle mineur. De plus, cet effet est complexe, la voie de l'éthylène étant stimulée sans qu'il n'y ait d'augmentation de production d'éthylène (Galland *et al.*, 2012).

Ayant découvert de nouveaux acteurs dans la stimulation de croissance d'*Arabidopsis* par STM196, NRT2.5 et NRT2.6, nous nous sommes posé la question de leur implication dans l'élongation des poils racinaires. Dans la première partie des résultats de ce chapitre, nous présentons l'effet de STM196 sur l'élongation des poils racinaires chez les simples mutants *nrt2.5* et *nrt2.6* et le double mutant *nrt2.5nrt2.6*. Nous avons ajouté à cette étude les autres mutants, déficients dans le principal transporteur racinaire de NO_3^- , NRT2.1, ou dans la principale isoforme de nitrate réductase, NR2, utilisés dans les chapitres précédents, soient les simples mutants *nrt2.1* et *nr2* et les doubles mutants *nrt2.1nrt2.5* et *nrt2.1nrt2.6*.

Une approche de transcriptomique a permis d'identifier des facteurs de transcription surexprimés chez les plantes inoculées avec STM196 (G. Desbrosses & B. Touraine, données non publiées). L'étude de certains d'entre eux a confirmé leur induction en présence de PGPR (Galland, 2009). C'est en particulier le cas des facteurs de transcriptions ZAT10, NAC42 et WRKY46 dont les transcrits sont sur-accumulés en

présence de STM196. Les travaux de Marc Galland suggèrent que NAC42 et WRKY46 puissent être des régulateurs de l'expression des gènes *NRT2.5* et *NRT2.6*. Dans la seconde partie des résultats présentés dans ce chapitre, nous avons posé la question symétrique : les produits des gènes *NRT2.1*, *NRT2.5* et *NRT2.6* peuvent-ils réguler l'expression des facteurs de transcription ZAT10, NAC42 et WRKY46 ?

Chapitre 6 :

Matériel et méthodes

6.1. Matériel biologique

Tout au long de nos travaux, nous avons utilisé comme modèle biologique: *Arabidopsis thaliana* Col-0. L'ensemble des lignées mutantes que nous avons utilisés *nrt2.1* 3 (SALK 035429), *nrt2.5* (GK 213H10) et *nrt2.6* (SM 3.35179) ainsi que le simple mutant G5 (Wilkinson & Crawford, 1991) affecté dans l'activité nitrate réductase NR2 sont tous dans le fond génétique Col-0. Nous avons utilisé aussi des doubles mutants obtenus par croisement entre les simples mutants *nrt2.1Xnrt2.5*, *nrt2.1Xnrt2.6* et *nrt2.5Xnrt2.6* (Voir chapitre 3 Partie 1). Comme bactérie PGPR, le choix s'est porté sur *Phyllobacterium brassicacearum* (STM196) (Mantelin *et al.*, 2006b) dont l'effet PGPR a été montré sur les plantes de Colza et d'*Arabidopsis thaliana* (Larcher *et al.*, 2003; Mantelin *et al.*, 2006b).

6.2. Préparation des milieux de culture

Nous avons utilisé deux milieux de culture : un milieu de culture spécifique pour *A. thaliana* et le milieu E' pour STM196. La composition du milieu pour plante est la suivante : 0.5 mM de CaSO₄, 2 mM de KNO₃, 0.5 mM de MgCl₂, 1 mM de KH₂PO₄, 0.05 mM de Na₂FeEDTA, 0.03 µM de (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 1µM de CuSO₄, 1 µM de ZnSO₄, 15 µM de MnCl₂, 50 µM de H₃BO₃, 2.5 mM de Mes. Le pH est ajusté à 5.7 avec 10 mM de KOH. Pour obtenir des milieux solides, on rajoute avant autoclavage 1.2% (p/v) d'agar (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). La stérilisation se fait à une température de 120°C pendant 20 min.

Le milieu E' de culture de STM196, il est composé de : 286.5 µM K₂HPO₄, 81.1 µM MgSO₄, 171.1 µM, NaCl, 791.3 µM KNO₃, 34 µM CaCl₂, 0.03 µM FeCl₃, 1% (w/v) mannitol (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) et 0.3% (w/v) d'extrait de levure (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Le pH est ajusté à 6.8. Pour obtenir un milieu solide, on ajoute avant autoclavage 1.5% (p/v) d'agar. Le milieu est stérilisé en autoclave à 120°C pendant 20 min.

6.3. Condition de culture

6.3.1. *Phyllobacterium brassicacearum* STM196

Nous avons travaillé avec les souches qui ont été caractérisées au laboratoire et qui conservées à -80°C en stock glycérol. Avant leur utilisation, la souche est repiquée à partir du stock glycérol dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture E' solide. Cette boîte est incubée à une température de 25°C pendant 3 jours. A l'issue de cette culture en milieu solide, une colonie isolée de STM196 est inoculée à 20ml de milieu E' liquide pour réaliser une préculture. Cette dernière est incubée à 25°C pendant 18h sous agitation (120 rpm). La densité optique_{595nm} de cette préculture est mesuré, puis une absorbance_{595nm} de 1.6 est inoculée dans une seconde culture contenant 300 ml de milieu E' liquide. La culture bactérienne est incubée à la même température et en agitation continue (120 rpm). Après 24 heures, la solution bactérienne obtenue de STM196 est centrifugée à 7000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est jeté et le culot est récupéré, ensuite bien mélangé avec une solution de milieu d'*Arabidopsis thaliana* liquide. La densité optique_{595nm} de cette solution est mesurée pour déterminer la concentration totale de STM196 dans cet inoculum. A la fin, une absorbance_{595nm} de $0.07 \cdot \text{ml}^{-1}$ est inoculée avec le milieu de culture plante-agar en surfusion. Cette absorbance correspond à une concentration bactérienne de STM196 de 10^8 CFU. ml^{-1} .

6.3.2. *Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont stérilisées pendant 15 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.57% additionnée de Tween20 (0,5 ‰). Les graines sont ensuite rincées cinq fois dans une solution d'eau distillée stérile et semées dans des boîtes de pétri carrées (120 x 120 cm) contenant le milieu de culture de plante. Les boîtes sont scellées à l'aide de ruban adhésif poreux microporeTM, (3M, S^t Paul, Mn, USA) et sont ensuite mises en chambre froide (4°C) et à l'obscurité totale pendant 2 jours. Après cette période de traitement au froid, les boîtes sont transférées dans la chambre de culture in vitro réglée à une température de 20- 22°C et à une photopériode de 16h de lumière/ 8h d'obscurité. Après 7 jours de germination, les plantules sont transférées dans de nouvelles boîtes de Pétri carrées contenant le même milieu minéral de culture plante solide inoculé

avec ou sans STM196 (10^8 CFU.ml⁻¹). Chaque boîte qui contient 5 plantules, est disposée à nouveau dans la chambre de culture dans une position proche de la verticale pendant une période de 7 jours. Après cette période, les plantes sont analysées et récoltées.

6.4. Analyse Physiologique

6.4.1. Mesure de l'accumulation du nitrate

La mesure de l'accumulation de nitrate se fait sur des plantules récoltées 8 jours après leur inoculation ou non par STM196 (transfert). Les feuilles et racines de chaque plantule sont séparées, placés dans des tubes eppendorf de 1.5 ml. Le poids frais de chaque échantillon est déterminé par soustraction au poids total, du poids du tube vide qui a été déterminé au préalable. Par la suite, les échantillons sont dissous dans 700 μ l d'HCl 0.1 M pendant 48 heures à 4°C (au delà de 48 heures les tubes doivent être conservés au congélateur jusqu'au moment de leur utilisation). Une fraction aliquote de 500 μ l de chaque échantillon est utilisée pour mesurer la concentration de nitrate, en utilisant la chaîne analytique à flux continu dans laquelle, le nitrate est réduit en nitrite sur une colonne de cadmium. (Autoanalyzer II Technicon, Tarrytown, NY, USA). En présence de sulfanilamide et de N-naphtyl éthylène diamine dichlorure, le nitrite formé est transformé en un composé de couleur rose (Henriksen & Selmer-Olsen, 1970). L'absorbance de celui-ci est mesuré à 540 nm. La valeur de l'absorbance va être convertie en quantité de nitrite présent dans l'échantillon biologique à l'aide d'une courbe étalon. En supposant que la réduction des nitrates en nitrites sur la colonne à cadmium a une efficacité de 100%, nous déduisons par ce dosage la concentration en nitrate présente dans l'échantillon biologique.

6.4.2. Architecture racinaire

L'analyse de l'architecture racinaire est déterminée 7 jours après le transfert des plantules avec ou sans STM196. Les boîtes carrées contenant les plantes d'*A. thaliana* sont scannées (Epson Perfection, V200, Epson, France) à une résolution de 400 dpi et les images en plusieurs niveau de gris sont sauvegardées au format TIFF. Ces images de systèmes racinaires sont analysés avec le logiciel ImageJ (Wayne Rasband, Etats-Unis : <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) associé au module NeuronJ (Erik Meijering,

Suisse : <http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/>). Ce logiciel, nous permet d'analyser la longueur des racines primaire (LRP) ainsi que la longueur des racines latérales (LRL), d'autres paramètres peuvent être aussi déterminés comme le nombre des racines latérales (NRL), la somme des longueurs des racines latérales (SRL).

6.4.3. Poils racinaire

La longueur des poils racinaire de différentes plantes est mesurée 7 jours après leur transfert avec ou sans la bactérie. On se focalise sur la longueur des poils racinaires de la racine principale qui sont compris entre la fin de la zone de différenciation et l'émergence de la première racine latérale. Les observations sont réalisées sur les plantules *in situ* (présentes dans la boîte de Petri) à l'aide d'un microscope (Z16APO, Leica, Bensheim, Allemagne). Pour la mesure proprement dite, une image de la zone d'intérêt de la racine principale est prise à l'aide d'une caméra numérique couplée au Microscope (DFC420c, Leica, Bensheim, Allemagne). La longueur des poils racinaires est déterminée à partir de cette image en utilisant un logiciel d'analyse (LAS, Leica, Bensheim, Allemagne). Nous avons mesuré entre 20 et 30 poils racinaires situés dans la zone apicale de la racine primaire pour chaque plante.

6.4.4. Mesure de l'activité nitrate réductase

Les feuilles des plantes de différents génotypes sont récoltées 8 jours après leur transfert. Entre 0.5 et 0.6 g de la partie aérienne est prélevé, pesé et placé dans des tubes Eppendorf de 2 ml contenant une bille en acier. Les échantillons sont alors congelés dans l'azote liquide puis quelques minutes après broyés dans un broyeur oscillant (Retsch MM200, Retsch Hann, Germany) pendant 30 sec à 30 oscillations par secondes. Les tubes sont ensuite stockés dans de la glace et on ajoute 200 µl du tampon d'extraction (Préparé le jour même, 80mM K₂HPO₄, 20mM KH₂PO₄, 1mM M EDTA et 0,132% de Cystéine, pH=7,5). Les tubes sont ensuite centrifugés (4°C 12000 rpm, 10 min). La suite du protocole nécessite d'introduire de la BSA qui nous empêcherait de déterminer la quantité de protéines dans notre extrait biologique. Pour pallier à cet inconvénient, une fraction aliquote de 10 µl des différents surnageants est mise de côté pour le dosage de protéines totales. On ajoute alors pour chaque tube, un volume de 200 µl du tampon d'extraction contenant en plus de la BSA (2% p/v). Les tubes sont alors centrifugés (4°C et à 12000

rpm pendant 10 min) une nouvelle fois. Les surnageants sont décantés dans de nouveaux tubes eppendorf de 1.5 ml et gardés sur de la glace.

La réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase, à 700µl de tampon de réaction (20mM K₂HPO₄, 5mM KH₂PO₄ et 0,05mM EDTA, pH 7,5) préchauffé (30°C), on ajoute 100µl de KNO₃ 100mM, 100 µl 0,1% (p/v, préparé le jour même) NADH. Chaque réaction est lancée toutes les 15 sec en ajoutant 200 µl d'extrait végétal. Les réactions sont incubées pendant 30 min à 30°C. Les réactions sont stoppées en ajoutant 100µl d'Acétate de zinc (1 M). Les tubes sont ensuite centrifugés à 12000 rpm pendant 3 min.

Pour doser les nitrites produits, on prélève 700 µl de surnageant que l'on transfère dans une cuve de spectrophotomètre avec 1ml de sulfanilamide 1% (p/v) et 1ml de N Naphtyl Ethylène Diamine Dichlorure 0.02 % (p/vde HCL 1.5M). Après 15 min l'absorbance est mesurée à 540 nm. La quantité de nitrite dans l'échantillon biologique est déterminée à l'aide d'une gamme étalon.

Pour l'expression des activités spécifiques, on détermine la quantité de protéine par un dosage de Bradford (Bradford, 1976). La fraction aliquote conservée à l'issue de la première centrifugation après le broyage et diluée 25 fois. Le dosage se fait en prenant 100ml de cette dilution qui est mélangé à 900ml de réactif de Bradford (Sigma, S^t Louis, Mo, USA). L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 595nm. Les quantités de protéines sont déterminées en utilisant une gamme étalon.

L'activité nitrate réductase est exprimée selon la formule suivante :

$$\text{ANR} = (\text{Do}_{\text{nitrite}}) \cdot (1/\epsilon_{\text{nitrite}}) \cdot (v_d) \cdot (v_r/v_c) \cdot (v_e/v_a) \cdot (1/[\text{Do}_{\text{Prot}} \cdot (1/\epsilon_{\text{Prot}})]) \cdot (1/t) \quad [\mu\text{mol NO}_2/(\text{h} \cdot \text{mg Prot})]$$

$$\text{Soit ANR} = (\text{Do}) \cdot (1/\epsilon_{\text{nitrite}}) \cdot (v_d) \cdot (v_r/v_c) \cdot (v_e/v_a) \cdot (1/m) \cdot (1/t) \quad [\mu\text{mol NO}_2/(\text{h} \cdot \text{g MF})]$$

ϵ =coefficient d'extinction moléculaire (calculer à partir de la courbe d'étalonnage).

Do=Densité optique.

t=durée de l'incubation(h).

m=masse de l'échantillon (g).

v_d=volume du dosage colorimétrique (ml).

v_e= volume d'extraction (ml).

v_a=volume de l'aliquote d'extrait dosé (ml).

v_c= volume de l'aliquote dosé en colorimétrie (ml).

v_r=volume réactionnel (ml).

6.4.5. Dosage d'éthylène

Les graines d'*Arabidopsis* stérilisées en surface sont semées sur un milieu de culture de plante solide comme indiqué précédemment. Trois jours après germination, on stérilise des petites fioles (2ml, VAG M549/550, Chromacol, Welwyn Garden, Grande-Bretagne) dans lesquelles on coule 500µl de milieu stérile de culture de plante solide. Les plantules de 2 jours sont repiquées sur ce milieu. Les fioles sont fermées par du ruban adhésif micropore (3M) et placées en chambre de culture. Sept jours après repiquage, les fioles sont fermées hermétiquement avec leurs bouchons. Les fioles sont replacées pendant 5 autres jours en chambre de culture pour permettre une accumulation significative d'éthylène.

L'éthylène est dosé par chromatographie en phase gazeuse couplé à un détecteur par ionisation de flamme (6850 series GC system, Agilent, New York USA). Les pics obtenus au temps de rétention caractéristique de l'éthylène sont de petite taille et sont généralement en dessous du seuil d'intégration. Leur aire est calculée manuellement. La quantité d'éthylène obtenue est normalisée par le poids des plantes et est exprimée relativement par rapport à l'accumulation observée chez la plante sauvage.

6.5. Analyse génomique

6.5.1. Extraction d'ADN

Des bourgeons floraux ou des feuilles sont coupés et mis dans des tubes eppendorf de 1.5 ml contenant 600 µl de tampon d'extraction (Urée 42% (p/v), NaCl 312,5 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 20mM, N-Lauryl Sarcosine 1% (p/v), pH 8). Les plantes sont ensuite broyées et les tubes sont agités doucement pendant 5 à 10 min à température ambiante. On ajoute ensuite 500µl de Chloroforme (Sigma-Aldrich, S^t Louis, Mo, USA) et les tubes sont à nouveau mélangés doucement et centrifugés à 12000 rpm pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est récupéré dans des nouveaux tubes Eppendorf de 1.5 ml. Les acides nucléiques sont précipités en ajoutant 1/10 volume de sodium d'acétate (3M, pH 5) et 500 µl d'isopropanol. Les tubes sont centrifugés à 12000 rpm pendant 3 min. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est resuspendu dans 500 µl d'éthanol froid à

70%. Les tubes sont à nouveau centrifugés à 11000 rpm et à 4°C pendant 10 min. Les surnageants sont éliminés et les culots sont brièvement séchés à 37 °C pendant 15 min. Les culots d'ADN sont resuspendus dans 30 µl de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7.4). Les ADN extraits sont conservés à -20°C.

6.5.2. PCR

Le géotypage des différentes lignées est réalisé par PCR (thermocycleur PTC200, MJ research, Hercules, Ca, USA). Typiquement, 1µl d'ADN est incubé dans le milieu de PCR (volume final 10µl, composé de 2 µl tampon réactionnel, 1 µl dNTP 2.5 mM, 0,95µl H₂O, 0,5µl d'amorces (10µM) et 0.05 µl GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, Wi USA). Les PCR sont réalisées avec le programme suivant : dénaturation initiale 95°C pendant 5 min suivi de 39 cycles de 95°C pendant 30 sec, 60°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min, ensuite 72°C pendant 10 min. Toutes les paires d'amorces utilisées au cours de ce travail sont mentionnées dans le tableau 6.1.

Tableau 6.1. Liste des paires d'amorces utilisées pour la PCR semi quantitative.

Référence d'amorce	Séquence des nucleotides
<i>NRT2.1</i> F1	5'-GTTCTCCATGAGCTTCGTGAG-3'
<i>NRT2.1</i> R1	5'-GCAAGCGACTATCATCACTCC-3'
<i>NRT2.5</i> F1	5'-GCAACAACCTTCCGACTATTC-3'
<i>NRT2.5</i> R1	5'-CAATCAAGCAACTCAATACCAAAA-3'
<i>NRT2.6</i> R1	5'-TCATCTCAAGCCGTCCGAACAAAC-3'
<i>NRT2.6</i> F1	5'-GAATATCAGCCAACATCGCCTTGC-3'
<i>NRT2.6</i> R5	5'-CTCTCTCTCTTAACTTCTCCC-3'
<i>NRT2.6</i> F2	5'-CTTCGTGTAGTCCTAAGCTCT-3'
<i>NRT2.6</i> R2	5'-TGTTCTTGAGGCCATCACAAG-3'
<i>NRT2.6</i> F3	5'-AGCCGTGCAGCTACATCTGAAGCG-3'
<i>NRT2.6</i> R3	5'-GTATTCTCGTTCTCACTCTCGGCC-3'
<i>NRT2.6</i> F4	5'-AGCTGTAAGCATAAGTGAGAAGGC-3'
<i>NRT2.6</i> R4	5'-GGTCGAGATTGTCGCGAATGACG-3'
<i>NRT2.6</i> R6	5'-AGTCTCATTGACCTTTGGTTGATG-3'
Lbb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
GABI-KAT	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'
Dspm1	5'-CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG-3'

6.5.3. Extraction d'ARN totaux

Les plantes inoculées ou non sont récoltées âgées de 15 jours au milieu de leur photopériode. Racines et feuilles sont séparées, stockées dans des tubes eppendorf de 2 ml et congelées dans l'azote liquide. Si l'extraction des ARN totaux est extra temporaire, les échantillons sont conservés à -80°C. Pour l'extraction proprement dite, environ 100 mg de tissus congelé est broyé au froid (-40°C) dans un broyeur oscillant (Retsch MM200, Retsch, Hann, Germany). Les ARN totaux sont extraits avec le kit d'extraction SV Total Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) selon le protocole décrit par le fournisseur. La pureté d'ARN est vérifiée sur gel d'agarose 0.8% avec 5 µl d'ARN, 2 µl de tampon de charge et 3 µl d'H₂O. La quantité d'ARN extraite est mesurée par spectrophotométrie UV (Nanodrop N D1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA).

6.5.4. Synthèse de cDNA

Au cours de ce travail, nous avons réalisé les retrotranscriptions en cDNA à partir de 1,5µg d'ARN total. Préalablement à cette étape, les ARN totaux ont été décontaminés de la présence d'ADN génomique par un traitement à la DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) en suivant les recommandations du fournisseur.

La retrotranscription se fait en utilisant la reverse transcriptase SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) et en suivant le protocole développé par le fournisseur.

L'absence de contamination par l'ADN génomique est vérifiée par PCR en utilisant les amorces suivantes dessinées pour amplifier dans le gène de l'Actine 2 (At3g18780) une région codante interrompue par un intron (Sens 5'-ACTTTCATCAGCCGTTTTGA-3' et antisens 5'-ACGATTGGTTGAATATCATCAG-3'). En cas de contamination par des traces d'ADN génomique, une taille de haut poids moléculaire va être amplifiée et sera visible après séparation sur un gel d'électrophorèse.

6.5.5. PCR quantitative en temps réel

Nous avons mesuré la quantité relative des différents gènes d'intérêt par PCR quantitative. Typiquement, une réaction de PCR quantitative est composée de 0.1 µl de

cDNA, 4.9 µl d'eau bi-distillée, 5 µl de la solution du couple d'amorce à 1 µM et 10 µl du mélange réactionnel commercial (Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent technologies, Santa Clara, Ca, USA). Les réactions PCR sont conduites dans un thermocycleur dédié à la PCR en temps réel (MX3005P QPCR System, Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, USA). Le programme PCR qui a été suivi est le suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivi par 40 cycles de 95°C pendant 1 min, 60°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s. Après 40 cycles, la température de dénaturation des produits amplifiés est déterminée par la mesure continue de fluorescence lors du déroulement du programme suivant : 95°C pendant 1 min, refroidissement à 55°C pendant 30 s et finalement réchauffées à 95°C pendant 30 s. Toutes les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 6.2. Le niveau des transcrits de chacun des gènes étudiés est normalisé par le niveau des transcrits des deux gènes constitutives : l'*actine2* (At3g18780) et l'*ubiquitine* (At4g05320) suivant la formule suivante : $2^{-\Delta Ct}$ ou le $\Delta Ct = [(Ct_x - Ct_{Actin}) + (Ct_x - Ct_{Ubiqu})] / 2$.

Tableau 6.2. Liste des paires d'amorces utilisées en PCR quantitative

Code AGI	Nom du gène	Référence de l'amorce	Séquence des nucléotides
AT1G08090	<i>NRT2.1</i>	<i>NRT2.1</i> F2 <i>NRT2.1</i> R2	5'-AAAGACAAATTCGGAAAGATTCTG-3' 5'-AAGTACTCGGCGATAACATTATCA-3'
AT1G08100	<i>NRT2.2</i>	<i>NRT2.2</i> F <i>NRT2.2</i> R	5'-CCAAAGACAAATTCGGAAAGATTC-3' 5'-AAGTACTCGGCGATAACATTGTCT-3'
AT5G60780	<i>NRT2.3</i>	<i>NRT2.3</i> F <i>NRT2.3</i> R	5'-TAAAGACAAATTCCTCCAAGTTTTTC-3' 5'-AAATATCCGGAGATAACGTTGTTG-3'
AT5G60770	<i>NRT2.4</i>	<i>NRT2.4</i> F <i>NRT2.4</i> R	5'-TTACTAAAGACAAGTTCTCAAAGG-3' 5'-AAGTACTCAGCGATGACGTTATCG-3'
AT1G12940	<i>NRT2.5</i>	<i>NRT2.5</i> F2 <i>NRT2.5</i> R2	5'-CTTGTTTCGTCAGGATCTTCCT-3' 5'-GTTATCCATCCCCTATAGTTTTTG-3'
AT3G45060	<i>NRT2.6</i>	<i>NRT2.6</i> R2 <i>NRT2.6</i> F2	5'-TGTTCTTGAGGCCATCACAAG-3' 5'-CTTCGTGTAGTCCTAAGCTCT-3'
AT5G14570	<i>NRT2.7</i>	<i>NRT2.7</i> F <i>NRT2.7</i> R	5'-GTAACAGAAAAACTCGAACCCAG-3' 5'-GATCTCGACGAAACTGGAACG-3'
AT3G18780	<i>ACTIN2</i>	<i>ACTIN2</i> F <i>ACTIN2</i> R	5'-TCCCTCAGCACATTCAGCAGAT-3' 5'-AACGATTCCCTGGACCTGCCTCATC-3'
AT4G05320	<i>Ubiquitine</i>	<i>Ubiquitine</i> F <i>Ubiquitine</i> R	5'-CACACTCCACTTGGTCTTGCGT-3' 5'-TGGTCTTTCCGGTGAGAGTCTTCA-3'

Conclusion générale

Le travail réalisé au cours de cette thèse entre dans le cadre de l'étude des réponses des plantes aux interactions avec des bactéries bénéfiques, et plus précisément des bactéries stimulatrices de la croissance des plantes ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). La bactérie choisie dans notre travail est *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. Cette bactérie a été isolée à partir de la rhizosphère de plantes de colza cultivé en champ. Elle stimule la croissance de cette plante, en terreau comme en culture *in vitro*. Notre équipe de recherche a choisi d'utiliser la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, plante pour laquelle on dispose du plus grand nombre d'outils génétiques et génomiques, de même que des connaissances de physiologie les plus précises. STM196 offre l'avantage d'avoir été isolée à partir d'une plante de la même famille que cette plante modèle. Nous avons donc retenu le couple *Arabidopsis*-STM196 comme modèle d'étude pour identifier les bases moléculaires et physiologiques des réponses de la plante à une PGPR. L'inoculation avec STM196 présente les mêmes effets bénéfiques chez *Arabidopsis* que ceux initialement observés chez le colza, que ce soit sur sol ou sur milieu gélosé en boîte de Pétri. Les travaux précédemment réalisés dans notre équipe ont permis d'identifier deux gènes candidats dans la réponse de la plante à la bactérie sur la base de leur forte surexpression. Ces deux gènes, *NRT2.5* et *NRT2.6*, appartiennent à la famille *NRT2*, qui comprend 7 membres dont le gène *NRT2.1* codant le transporteur de nitrate responsable de la majorité de l'absorption racinaire de cet ion. Les produits de *NRT2.5* et *NRT2.6* transportent NO_3^- en système hétérologue (ovocyte de Xénope), mais leur fonction *in planta*, n'est pas connue. Le principal objectif de ce travail de thèse était de rechercher si ces gènes sont impliqués dans une réponse de la plante à STM196 (leur induction ne démontre pas qu'ils jouent un rôle dans cette réponse). Ces gènes codant des transporteurs potentiels de NO_3^- , nous avons ensuite recherché si la voie dépendant de *NRT2.5* et *NRT2.6* interfère avec le transport et/ou le métabolisme de NO_3^- et la signalisation par le statut azoté.

Dans un premier temps (Chapitre 2), nous avons réalisé des expérimentations visant à optimiser les conditions de croissance de la plante et de la bactérie (conditions d'inoculation, concentration externe de NO_3^- , relation entre l'effet de STM196, d'une part, et l'absorption et l'accumulation de NO_3^- , d'autre part). Afin de préciser la concentration idéale de NO_3^- pour réaliser notre étude sur le rôle de *NRT2.5* et *NRT2.6* dans la réponse d'*Arabidopsis* à STM196, nous avons utilisé des milieux minéraux gélosés en culture *in vitro*, en boîtes de Pétri verticales, contenant trois concentrations de NO_3^- différentes, 40

μM , 2 mM et 20 mM, sans autre source d'azote. La concentration la plus faible est très limitante pour la croissance de la plante, la concentration de 2 mM permet une croissance optimale dans nos conditions et la concentration la plus élevée est supra optimale (Mantelin *et al.*, 2006a). Nos résultats confirment ceux de Mantelin *et al.* (2006a) : l'effet stimulateur de croissance de STM196 est plus marqué à concentration de NO_3^- élevée qu'à la concentration limitante. Comme déjà décrit plusieurs fois dans l'équipe (e.g. Mantelin *et al.*, 2006a ; Contesto *et al.*, 2008 ; Contesto *et al.*, 2010), la stimulation de croissance s'accompagne d'une stimulation de la croissance en longueur des racines latérales. Nos expériences, incluant une concentration de NO_3^- très limitante pour la croissance et une concentration largement supra-optimale, plus basse et plus élevée que la concentration la plus faible et la plus forte, respectivement, utilisées par Mantelin *et al.* (2006a), apportent un renseignement supplémentaire en étendant et généralisant la conclusion de ces auteurs. L'inoculation avec STM196 induit des variations de la quantité de NO_3^- accumulée dans les racines comme dans les feuilles, mais ces modifications n'apparaissent pas reliées avec l'intensité de la stimulation de croissance de ces organes. Ainsi, l'impact de la bactérie sur l'accumulation de NO_3^- -donc sur l'absorption et l'assimilation de NO_3^- , l'accumulation correspondant à l'écart entre ces deux flux- est plus probablement une conséquence de l'effet de la bactérie sur la croissance (et l'ajustement des métabolismes N et C et/ou les modifications des régulations nutritionnelles du développement) ; à l'inverse, l'effet stimulateur de croissance ne semble pas être une conséquence d'un effet de la bactérie sur l'absorption de NO_3^- ou sur son métabolisme. Les expériences réalisées avec le mutant perte de fonction *nrt2.1* vont dans le sens de cette conclusion : une baisse drastique de l'absorption de NO_3^- inhibe presque totalement l'augmentation de production de biomasse par la plante en réponse à l'inoculation. Dans ce premier volet de nos travaux, nous avons également mesuré l'impact de STM196 sur une culture d'*Arabidopsis* en terreau, donc dans des conditions plus proches des conditions naturelles, sous trois régimes de fertilisation azotée différents. Ces expériences ont montré que l'effet bénéfique de la bactérie est plus fort en présence d'une bonne fertilisation azotée que sur terreau non fertilisé. Ces résultats confirment le profil de réponse analysé plus en détail en conditions *in vitro*, validant l'utilisation de ces conditions de culture pour la recherche de bases moléculaires impliquées dans la stimulation de croissance par la PGPR. En termes agronomiques, deux objectifs sont visés pour l'amélioration de la nutrition nitrique : des plantes qui pourraient se développer mieux dans des conditions de faibles ressources azotées et, à l'opposé, des plantes qui pourraient se développer encore plus dans des

conditions de fortes ressources azotées. Ces dernières, en levant les inhibitions de croissance généralement exercées sous forte alimentation azotée, absorbent plus de nitrate, l'utilisant pour une plus grande production de biomasse. Cette meilleure valorisation de l'azote à concentration de NO_3^- externe élevée à un double avantage : rendement plus élevé et diminution de la pollution de NO_3^- . La PGPR STM196 pourrait être une bonne candidate pour augmenter le potentiel de valorisation du nitrate dans les sols riches, en particulier pour les crucifères comme le colza qui ont des besoins en azote élevés.

Dans le deuxième volet de notre étude, nous avons entamé l'objectif principal de notre sujet sur l'implication des gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* dans la réponse de la plante à la bactérie par une approche de génétique inverse. Dans ce but, nous avons utilisé des lignées simples mutants *nrt2.1*, *nrt2.5* et *nrt2.6*. Nous avons d'abord confirmé les mutations *knock out* de chacun de ces mutants. Afin de pouvoir identifier de possibles régulations entre les produits de ces trois gènes, nous avons ensuite réalisé des croisements entre les différents simples mutants pour générer les doubles mutants *nrt2.1xnrt2.6*, *nrt2.5xnrt2.6* et enfin *nrt2.1xnrt2.5* (Chapitre 3, Partie 1).

Dans la Partie 2 du Chapitre 3, nous démontrons que les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* sont impliqués dans la stimulation de la croissance d'*Arabidopsis* par STM196 : les simples mutations *nrt2.5* et *nrt2.6* abolissent complètement la stimulation de croissance induite par STM196, dans les racines comme dans les parties aériennes. Les phénotypes de réponse à STM196 étant identiques chez les deux mutants, l'utilisation du double mutant ne nous a malheureusement pas permis de déterminer de manière définitive si *NRT2.5* et *NRT2.6* agissent dans deux voies indépendantes ou s'ils sont dans la même voie de régulation, et dans ce dernier cas quelle serait la relation d'épistasie entre eux. Ces deux protéines ne jouant pas un rôle important dans la distribution de NO_3^- dans la plante, il est peu probable que leur effet stimulateur de croissance passe par des modifications dans la nutrition azotée. Cependant, on ne peut pas exclure totalement que le rôle de *NRT2.5* et *NRT2.6* dans la réponse à la PGPR implique une fonction de transport de NO_3^- entre cellules ou entre tissus d'un même organe (plus probablement la feuille, la modification d'architecture racinaire étant contrôlé par un mécanisme systémique et non local). Sur la base d'études récentes sur les transporteurs de nitrate *NRT1.1* et *NRT2.1*, une autre possibilité serait que *NRT2.5* et *NRT2.6* servent non seulement de transporteurs de NO_3^- , mais aussi de récepteurs. Dans ce dernier cas, ils pourraient être à l'origine de la perception d'un signal systémique lui-même élicité par l'interaction avec la PGPR. La base de

données Genevestigator (<http://www.genevestigator.com/>) révèle que les deux gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* sont surexprimés chez les plantes en contact avec des agents pathogènes ou traitées avec l'oligopeptide flg22. Ainsi, *NRT2.5* et *NRT2.6* sont probablement impliqués dans des voies générales de reconnaissance de microorganismes. Le fait qu'ils soient surexprimés dans les feuilles des plantes inoculées avec des rhizobactéries (leur surexpression a été retrouvée dans les feuilles d'*Arabidopsis* inoculées avec d'autres rhizobactéries que STM196 ; Desbrosses et Touraine, communication personnelle) indique qu'ils doivent répondre à des signaux systémiques circulant entre les racines et les feuilles des plantes inoculées. Ce signal, le rôle exact de *NRT2.5* et *NRT2.6* et les mécanismes régulateurs mis en œuvre en aval pour aboutir à la stimulation de la croissance de la plante et à la réponse d'architecture racinaire restent à découvrir. Cependant, dans le cadre d'une utilisation des PGPR pour l'agriculture, ces deux gènes apparaissent déjà comme des cibles intéressantes pour optimiser les interactions plantes-rhizobactéries bénéfiques.

Dans un troisième volet (Chapitre 4), nous avons recherché des éléments pour confirmer ou infirmer l'indépendance de la voie de régulation dépendante de *NRT2.5* et *NRT2.6* vis-à-vis du métabolisme de NO_3^- et des régulations de la croissance par le statut nutritionnel azoté. Pour cela, nous avons utilisé le mutant G5 affecté dans l'activité nitrate réductase NR2, isoforme de nitrate réductase largement majoritaire chez *Arabidopsis*. Chez les plantes non inoculées, le mutant G5 présente un développement racinaire inhibé à mettre en relation avec la forte concentration de NO_3^- dans ses feuilles conformément au rôle de senseur du statut azoté qu'aurait le pool foliaire de NO_3^- (Scheible *et al.*, 1997b). Globalement, les effets de l'inhibition de l'ANR sont (i) une baisse de croissance de la plante par manque d'azote, et par voie de conséquence une réponse à STM196 très affectée par simple limitation nutritionnelle comme nous l'avons observé chez *nrt2.1*, (ii) une inhibition du développement racinaire liée à une augmentation du pool foliaire de NO_3^- chez les plantes non inoculées ; ce second effet n'est pas retrouvé chez les plantes inoculées, confirmant l'hypothèse de Mantelin *et al.* (2006a) selon laquelle la bactérie lève l'inhibition du développement racinaire par le statut azoté. Concernant la relation inverse, i.e. l'effet de *NRT2.5* et *NRT2.6* sur l'ANR, les mutants *nrt2.5* et *nrt2.6* ont une ANR légèrement diminuée, mais en raison du manque de connaissance de la fonction de ces deux gènes nous ne pouvons pas conclure sur leur relation avec l'ANR. L'hypothèse de l'indépendance entre les effets de STM196 et le métabolisme azoté est renforcée par

l'absence d'effets de l'inoculation avec cette bactérie sur l'ANR du sauvage Col-0 comme des différents mutants utilisés.

Dans un dernier volet (Chapitre 5), nous avons étudié l'implication de NRT2.1, NRT2.5, NRT2.6 et NR2 dans une autre réponse à l'inoculation avec STM196, l'allongement des poils racinaires. Le principal résultat –inattendu– de notre étude est que le gène *NRT2.1* est impliqué dans la régulation de la production de l'éthylène par la plante, expliquant que STM196 induise un allongement des poils racinaires plus fort chez *nrt2.1* que chez le sauvage Col-0. Par contre, les gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* ne sont impliqués dans le contrôle de l'élongation des poils racinaires ni en absence ni en présence de STM196. Ainsi, les deux principaux phénotypes de réponse racinaire à l'inoculation avec STM196, i.e. la stimulation de croissance des racines latérales et l'allongement des poils racinaires, apparaissent contrôlés par des voies indépendantes. NRT2.5 et NRT2.6 jouent un rôle clé dans l'établissement du premier, mais pas du second.

En découvrant de nouveaux acteurs de la réponse de la plante à une bactérie PGPR, notre travail ouvre de nombreuses perspectives.

D'abord, dans l'optique de la compréhension du mécanisme mis en œuvre, il faudrait caractériser le(s) rôle(s) de NRT2.5 et NRT2.6 *in planta* en conditions non inoculées. Les investigations menées jusqu'à maintenant par des laboratoires travaillant sur les transporteurs de la famille NRT2 n'ont pas permis de proposer un rôle à ces protéines, ce qui rend évidemment difficile la recherche de leur rôle dans la réponse à la PGPR. Des travaux de génétique inverse, avec des mutants mais aussi peut-être des surexprimeurs, dans des conditions environnementales variées, à différents stades de développement et analysant des paramètres aux différents niveaux d'intégration, cellulaire, tissulaire, de l'organe et de la plante entière, sont donc encore requis. Ensuite, il sera plus aisé d'imaginer des expériences pour analyser le rôle de NRT2.5 et NRT2.6 dans la réponse à STM196.

Une question concernant le rôle de NRT2.5 et NRT2.6 dans la réponse à STM196 est sa relation avec la voie de l'auxine. En effet, celle-ci est requise également dans la réponse de stimulation de croissance et dans la modification de l'architecture racinaire (Contesto *et al.*, 2010) mais non dans l'allongement des poils racinaires (Contesto *et al.*, 2008; Desbrosses *et al.*, 2009), tout comme NRT2.5 et NRT2.6. Ceci suggère que NRT2.5 et NRT2.6 interagissent avec la voie de l'auxine. Induisent-ils une modification du

transport de l'auxine, ou affectent-ils sa voie de transduction ? Au contraire, sont-ils des cibles de l'auxine ? Ces questions peuvent être abordées au moyen de croisements des mutants *nrt2.5* et *nrt2.6* avec des plantes transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur de réponse à l'auxine comme DR5. Des dosages d'auxine, quoique délicats du fait du nombre de formes conjuguées –et inactives– de l'IAA, de la très faible concentration de l'IAA libre et des précautions nécessaires pour empêcher sa dégradation, sont possibles en collaboration avec des laboratoires spécialisés.

Ces travaux comme ceux réalisés précédemment dans l'équipe où s'est déroulée la thèse montrent que l'utilisation d'*Arabidopsis* permet d'établir des cribles efficaces pour caractériser les effets stimulateurs de croissance de PGPR. Une perspective intéressante est d'utiliser cette plante et le système de culture et d'analyse phénotypique mis au point par cette équipe pour tester l'effet d'autres PGPR. En particulier, l'effet de rhizobactéries sur l'expression des gènes *NRT2.5* et *NRT2.6* pourrait être analysé en RT-PCR quantitative ; simultanément, ces bactéries pourraient être inoculées aux mutants *nrt2.5* et *nrt2.6* afin de déterminer l'implication de *NRT2.5* et *NRT2.6* dans la stimulation de la croissance de la plante induite par d'autres PGPR. Si l'implication de *NRT2.5* et *NRT2.6* dans la stimulation de croissance par les PGPR revêt un caractère générique, alors nous disposerons réellement d'un outil puissant pour rechercher des bactéries stimulatrices de croissance des plantes.

Références bibliographiques

- Abbass Z, Okon Y. 1993.** Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 1075–1083.
- Abeles F. 1973.** Ethylene in plant biology. *Academic, New York*: 302.
- Ahn SJ, Shin R, Schachtman DP. 2004.** Expression of *KT/KUP* genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant physiology* **134**: 1135–1145.
- Ahringer J. 2006.** Reverse genetics. *Worm Book*.
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker M-T, Bedu M, Meyer C, Truong H-N. 2005.** Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant cell environment* **28**: 500–512.
- Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S. 2009.** Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 542–547.
- Almagro A, Lin SH, Tsay YF. 2008.** Characterization of the *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development. *The Plant Cell Online* **20**: 3289–3299.
- Alonso JM, Stepanova AN, Lisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. 2003.** Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R. 1998.** Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* **204**: 57–67.
- Antoun H, Prévost D. 2005.** Chapter 1 ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *BioControl*: 1–38.
- Arkipova TN, Prinsen E, Veselov SU, Martinenko EV, Melentiev AI, Kudoyarova GR. 2007.** Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil* **292**: 305–315.
- Arkipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR. 2005.** Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* **272**: 201–209.
- Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque A, Islam MZ, Shahidullah SM, Meon S. 2009.** Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology* **8**.
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC. 1992.** Comparative kinetics and reciprocal

- inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant physiology* **99**: 1124–1133.
- Atzorn R, Crozier A, Wheeler CT, Sandberg G. 1988.** Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* **175**: 532–538.
- Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, del Valle M., Pérez A, Zepeda A, Zenteno E. 2001.** Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 167–172.
- Bais HP, Loyola-Vargas VM, Flores HE, Vivanco JM. 2001.** Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **37**: 730–741.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233–266.
- Bakker PAHM, Pieterse CMJ, van Loon LC. 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239–243.
- Barbieri P, Galli E. 1993.** Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Research in Microbiology* **144**: 69–75.
- Barneix AJ, James DM, Watson EF, Hewitt EJ. 1984.** Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley (*Hordeum vulgare* L. cv Sonja). *Planta* **162**: 469–476.
- Barriuso J, Ramos Solano B, Lucas JA, Lobo AP, García-Villaraco A, Gutiérrez Mañero FJ. 2008.** Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant-Bacteria Interactions*: 1–17.
- Bashan Y, de-Bashan LE. 2010.** How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy* **108**: 77–136.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. 2004.** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 521–577.
- Bashan Y, Singh M, Levanony H. 1989.** Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Canadian Journal of Botany* **67**: 2429–2434.
- Bayliss, Bent E, Culham DE, MacLellan S, Clarke AJ, Brown GL, Wood JM. 1997.** Bacterial genetic loci implicated in the *Pseudomonas putida* GR12-2R3--canola mutualism: identification of an exudate-inducible sugar transporter. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 809–818.
- Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov**

- VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Preisfeld A, Dietz KJ, Stepanok VV. 2001.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 642–652.
- Benizri E, Baudoin E, Guckert A. 2001.** Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* **11**: 557–574.
- Bent E, Chanway CP. 2002.** Potential for misidentification of a spore-forming *paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. *Applied and environmental microbiology*. **68**: 4650–4652.
- Berthomieu P, Conéjéro G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada K, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, Essah PA, Tester M, Véry AA, Sentenac H, Casse F. 2003.** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na(+) recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal* **22**: 2004–2014.
- Bertin C, Yang X, Weston LA. 2003.** The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* **256**: 67–83.
- Bertrand H, Nalin R, Bally R, Cleyet-Marel J-C. 2001.** Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and Fertility of Soils* **33**: 152–156.
- Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, Cleyet-Marel JC. 2000.** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian journal of microbiology* **46**: 229–236.
- Blaha D, Prigent-Combaret C, Mirza MS, Moëgne-Loccoz Y. 2006.** Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *Fems Microbiology Ecology* **56**: 455–470.
- Bloom AJ. 2010.** Energetics of nitrogen acquisition. In: Foyer CH, Zhang H, eds. Annual Plant Reviews Volume 42. Wiley-Blackwell, 63–81.
- Borie F, Zunino H, Martinez L. 1989.** Macromolecule-P associations and inositol phosphates in some Chilean volcanic soils of temperate regions. *Communications in soil science and plant analysis* **20**: 1881–1894.
- Bottini R, Luna V. 1993.** Bud dormancy in deciduous fruit trees. *Current Topics in Plant Physiology* **1**: 147 – 159.
- Bottner P, Pansu M, Sallih Z. 1999.** Modelling the effect of active roots on soil organic matter turnover. *Plant and Soil* **216**: 15–25.
- Bottomley P., Myrold D. 2007.** Biological N inputs. Academic Press, Oxford. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. E. Paul, 365–387.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Brady NC, Weil RR. 1999.** *The nature and properties of soils*. Prentice Hall Upper Saddle River New Jersey.
- Brechenmacher L, Lee J, Sachdev S, Song Z, Nguyen THN, Joshi T, Oehrle N, Libault M, Mooney B, Xu D, Cooper B, Stacey G. 2009.** Establishment of a protein reference map for Soybean root hair cells. *Plant Physiology* **149**: 670–682.
- Brimecombe MJ, De Leij FAAM, Lynch JM. 2001.** Nematode community structure as a sensitive indicator of microbial perturbations induced by a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biology and Fertility of Soils* **34**: 270–275.
- Brugière N, Suzuki A, Hirel B. 2001.** Ammonium assimilation. Nitrogen assimilation by plant: physiological, biochemical and molecular aspects. USA: J-F Morot-Gaudry, 71–94.
- Buchenauer H. 1998.** Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* **105**: 329–348.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. 1998.** A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and environmental microbiology* **64**: 3663–3668.
- Burr TJ, Schroth MN, Suslow T. 1978.** Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* **68**: 1377.
- Çakmakçı R, Kantar F, Sahin F. 2001.** Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**: 527–531.
- Cartieaux F, Thibaud M-C, Zimmerli L, Lessard P, Sarrobert C, David P, Gerbaud A, Robaglia C, Somerville S, Nussaume L. 2003.** Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **36**: 177–188.
- Castro Marín I, Loeff I, Bartetzko L, Searle I, Coupland G, Stitt M, Osuna D. 2011.** Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta* **233**: 539–552.
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP. 1993.** Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian Journal of Microbiology* **39**: 941–947.
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP. 1996.** Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Plant and Soil* **184**: 311–321.
- Chae HS, Faure F, Kieber JJ. 2003.** The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin

treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *The Plant cell* **15**: 545–559.

Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Bâ A, Gillis M, Lajudie P de, Dreyfus B. 2000. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5437–5447.

Chakraborty U, Chakraborty B, Basnet M. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of basic microbiology* **46**: 186–195.

Charest MH, Beauchamp CJ, Antoun H. 2005. Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS microbiology ecology* **52**: 219–227.

Cheeseman JM, Tankou SK. 2004. Nitrate reductase and growth of *Arabidopsis thaliana* in solution culture. *Plant and Soil* **266**: 143–152.

Chet I, Inbar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **48**: 37–43.

Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Mulders IHM, Dekkers LC, Lugtenberg BJJ. 2000. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* pcl1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1340–1345.

Chinnadurai C, Balachandar D, Sundaram SP. 2009. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing methylobacteria from phyllosphere of rice and their role in ethylene regulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 1403–1411.

Chiu C-C, Lin C-S, Hsia A-P, Su R-C, Lin H-L, Tsay Y-F. 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant & cell physiology* **45**: 1139–1148.

Chopin F, Orsel M, Dorbe M-F, Chardon F, Truong H-N, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2007a. The *Arabidopsis* AtNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* **19**: 1590–1602.

Chopin F, Wirth J, Dorbe M-F, Lejay L, Krapp A, Gojon A, Daniel-Vedele F. 2007b. The *Arabidopsis* nitrate transporter AtNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 630–635.

Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil biology & biochemistry* **37**: 1970–1974.

Contesto C. 2007. Recherche des voies de régulation impliquées dans les réponses cellulaires et moléculaires d'*Arabidopsis thaliana* à une rhizobactérie bénéfique (*Phyllobacterium brassicacearum*). Thèse, Université Montpellier 2, Montpellier, France.

- Contesto C, Desbrosses G, Lefoulon C, Béna G, Borel F, Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B. 2008.** Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Science* **175**: 178–189.
- Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G, Varoquaux F, Bellini C, Kowalczyk M, Touraine B. 2010.** The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* **232**: 1455–1470.
- Cooke TJ, Poli DB, Sztein AE, Cohen JD. 2002.** Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Molecular Biology* **49**: 319–338.
- Crawford NM. 1995.** Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* **7**: 859–868.
- Crawford NM, Kahn M, Leustrek T, Long S. 2000.** Nitrogen and sulphur. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. The American Society of Plant Physiology, Waldorf, 786–849.
- Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, O’gara F. 1997.** Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonas* strain fl13 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1357–1361.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003.** A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**: 462–469.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2007.** Plant genetics and development. *Handbook of plant science*. Keith Roberts, 331–340.
- Daniel-Vedele F, Caboche M. 1996.** Molecular analysis of nitrate assimilation in higher plants. *Comptes rendus de l’Académie des sciences Paris. Série 3, Sciences de la vie* **319**: 961–968.
- Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M. 1998.** Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **206**: 225–233.
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F. 2011.** From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1349–1359.
- Desbrosses G, Contesto C, Varoquaux F, Galland M, Touraine B. 2009.** PGPR-*Arabidopsis* interactions is a useful system to study signaling pathways involved in plant developmental control. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 321–323.
- Desbrosses G, Varoquaux F, Touraine B. 2012.** *Arabidopsis* as a model system to decipher the diversity and complexity of plant responses to Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. In: Maheshwari DK, ed. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Springer Berlin Heidelberg, 227–249.

- Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG. 2007.** WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 1789–1801.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Vande Broek A, Vanderleyden J. 1999.** phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilens* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant soil* **212**: 155–164.
- Downes BP, Crowell DN. 1998.** Cytokinin regulates the expression of a soybean β -expansin gene by a post-transcriptional mechanism. *Plant Molecular Biology* **37**: 437–444.
- Downes BP, Steinbaker CR, Crowell DN. 2001.** Expression and processing of a hormonally regulated β -expansin from soybean. *Plant Physiology* **126**: 244–252.
- Epstein E. 1953.** Mechanism of ion absorption by roots. *Nature* **171**: 83–84.
- Epstein E. 1966.** Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature* **212**: 1324–1327.
- Epstein E, Hagen CE. 1952.** A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology* **27**: 457–474.
- Estrada-De Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. 2001.** *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2790–2798.
- Eulgem T, Somssich IE. 2007.** Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology* **10**: 366–371.
- Von Faber FC. 1912.** Das erbliche zusammenleben von bakterien und tropischen pflanzen. *Jahrb Wiss Bot*: 285–375.
- Fages J, Arsac JF. 1991.** Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil* **137**: 87–90.
- Fan S-C, Lin C-S, Hsu P-K, Lin S-H, Tsay Y-F. 2009.** The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *The Plant cell* **21**: 2750–2761.
- Farineau J, Morot-Gaudry J-F. 2006.** Chapitre 15: Métabolismes azoté et soufre ‘primaires’ photosynthétiques. La photosynthèse: Processus physiques, moléculaires et physiologiques. Editions Guae, 420.
- Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, McCormack K, Shah S, Dixon DG, Glick BR. 2007.** Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environmental Pollution* **147**: 540–545.
- Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang Y. 2006.** Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases. In: Siddiqui ZA, ed. PGPR:

- Biocontrol and Biofertilization. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 67–109.
- Filleur S, Dorbe M-F, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F. 2001.** An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *NRT2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters* **489**: 220–224.
- Flores-Félix J-D, Carro L, Velázquez E, Valverde Á, Cerda-Castillo E, García-Fraile P, Rivas R. 2013.** *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **63**: 821–826.
- Forde BG. 2002.** Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual review of plant biology* **53**: 203–224.
- Forde B, Lorenzo H. 2001.** The nutritional control of root development. *Plant and Soil* **232**: 51–68.
- Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. 2003.** *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* **157**: 493–502.
- De Freitas JR, Germida JJ. 1990.** Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Canadian Journal of Microbiology* **36**: 265–272.
- Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales R, Tapia-Hernández A, Jiménez-Salgado T, Wang ET, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J. 2001.** Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1305–1314.
- Fulchieri M, Lucangeli C, Bottini R. 1993.** Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant and Cell Physiology* **34**: 1305–1309.
- Galland M. 2009.** Identification par des approches phénotypiques, transcriptomiques et bioinformatiques de gènes clés d'*Arabidopsis thaliana* impliqués dans l'interaction avec la bactérie bénéfique *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. Thèse, Université Montpellier 2, Montpellier, France.
- Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B, Touraine B, Desbrosses G. 2012.** The ethylene pathway contributes to root hair elongation induced by the beneficial bacteria *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. *Plant Science* **190**: 74–81.
- Gamalero E, Glick BR. 2011.** Mechanisms used by Plant Growth-Promoting Bacteria. D.K. Maheshwari (ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. Springer Berlin Heidelberg, 17–47.
- Garbeva P, Van Veen J, Van Elsas J. 2003.** Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial ecology* **45**: 302–316.
- Garcia de salamone IE. 2000.** Direct beneficial effects of cytokinin-producing

rhizobacteria on plant growth.

- Ghosh S, Penterman JN, Little RD, Chavez R, Glick BR. 2003.** Three newly isolated plant growth-promoting *Bacillus* facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 277–281.
- Gillissen B, Bürkle L, André B, Kühn C, Rentsch D, Brandl B, Frommer WB. 2000.** A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **12**: 291–300.
- Giovanelli J, Mudd SH, Datko A. 1980.** Sulfur amino acids in plants. Mifflin BJ (ed). Amino acids and derivatives, the biochemistry of plants: a comprehensive treatise. 453–505.
- Glass ADM, Siddiqi MY. 1995.** Nitrogen absorption by plant roots. Nitrogen Nutrition in Higher Plants. New Delhi, India: HS Srivastava, RP Singh, 21–56.
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I. 1999.** Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 5973–5977.
- Glick BR. 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109–117.
- Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ. 1994.** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 911–915.
- Glick BR, Karaturovic DM, Newell PC. 1995.** A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 533–536.
- Glick BR, Penrose DM, Li J. 1998.** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* **190**: 63–68.
- Goldstein AH. 1994.** Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous mineral phosphates by gramnegative bacteria. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*: 197–203.
- Gray EJ, Smith DL. 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 395–412.
- Grichko VP, Glick BR. 2001.** Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 11–17.
- Guo Y, Gan S. 2006.** AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **46**: 601–612.

- Guo F-Q, Okamoto M, Crawford NM. 2003.** Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100–103.
- Guo FQ, Wang R, Chen M, Crawford NM. 2001.** The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant cell* **13**: 1761–1777.
- Guo F-Q, Wang R, Crawford NM. 2002.** The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *Journal of experimental botany*. **53**: 835–844.
- Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, R. Tadeo F, Talon M. 2001.** The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* **111**: 206–211.
- Gyaneshwar P, Parekh LJ, Archana G, Poole PS, Collins MD, Hutson RA, Kumar GN. 1999.** Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiology Letters* **171**: 223–229.
- Haas D, Défago G. 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 307–319.
- Haas D, Keel C. 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **41**: 117–153.
- Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D, Mehboob-ur-Rahman, Zafar Y, Malik KA. 2006.** Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for Sustainable Development* **26**: 8.
- Hänsch R, Fessel DG, Witt C, Hesberg C, Hoffmann G, Walch-Liu P, Engels C, Kruse J, Rennenberg H, Kaiser WM, Mendel RR. 2001.** Tobacco plants that lack expression of functional nitrate reductase in roots show changes in growth rates and metabolite accumulation. *Journal of experimental botany* **52**: 1251–1258.
- Hariprasad P, Niranjana SR. 2009.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil* **316**: 13–24.
- He X-J, Mu R-L, Cao W-H, Zhang Z-G, Zhang J-S, Chen S-Y. 2005.** *AtNAC2*, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **44**: 903–916.
- Henriksen A, Selmer-Olsen AR. 1970.** Automatic methods for determining nitrate and nitrite in water and soil extracts. *The Analyst* **95**: 514.
- Hernandez Y, Sogo J, Sarmiento M. 1997.** *Azospirillum* inoculation on *Zea mays*. *Cuban journal of agricultural sciences* **31**: 203–209.

- Hilali A, Prévost D, Broughton WJ, Antoun H. 2001.** Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 590–593.
- Hiltner L. 1904.** Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. *Arb DLG* **98**: 59–78.
- Ho C-H, Lin S-H, Hu H-C, Tsay Y-F. 2009.** CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* **138**: 1184–1194.
- Ho C-H, Tsay Y-F. 2010.** Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 604–610.
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF. 1999.** Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant cell* **11**: 1381–1392.
- Hussin ASM, Farouk A-E, Greiner R, Salleh HM, Ismail AF. 2007.** Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**: 1653–1660.
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux J-P. 2003.** Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **16**: 851–858.
- Idris ESE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R. 2007.** Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 619–626.
- Imsande J, Touraine B. 1994.** N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. *Plant Physiology* **105**: 3–7.
- Jacob F, Monod J. 1961.** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* **3**: 318–356.
- Jacobson CB, Pasternak JJ, Glick BR. 1994.** Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 1019–1025.
- Jacoud C, Faure D, Wadoux P, Bally R. 1998.** Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 43–51.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM. 2003.** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* **37**: 1–16.
- Jensen MK, Hagedorn PH, de Torres-Zabala M, Grant MR, Rung JH, Collinge DB, Lyngkjaer MF. 2008.** Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-

CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **56**: 867–880.

John P. 1991. How plant molecular biologists revealed a surprising relationship between two enzymes, which took an enzyme out of a membrane where it was not located, and put it into the soluble phase where it could be studied. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 192–194.

Joo G-J, Kang S-M, Hamayun M, Kim S-K, Na C-I, Shin D-H, Lee I-J. 2009. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *The Journal of Microbiology* **47**: 167–171.

Joo G-J, Kim Y-M, Kim J-T, Rhee I-K, Kim J-H, Lee I-J. 2005. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* **43**: 510–515.

Jorquera M, Martínez O, Maruyama F, Marschner P, de la Luz Mora M. 2008. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes and environments* **23**: 182–191.

Jurado V, Laiz L, Gonzalez JM, Hernandez-Marine M, Valens M, Saiz-Jimenez C. 2005. *Phyllobacterium catacumbae* sp. nov., a member of the order ‘Rhizobiales’ isolated from Roman catacombs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1487–1490.

Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, Masle J, Glass ADM. 2002. Functional Analysis of an *Arabidopsis* T-DNA ‘Knockout’ of the High-Affinity NH₄⁺ Transporter AtAMT1;1. *Plant Physiology* **130**: 1263–1275.

Kang S-M, Joo G-J, Hamayun M, Na C-I, Shin D-H, Kim HY, Hong J-K, Lee I-J. 2009. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters* **31**: 277–281.

Kapulnik Y, Okon Y, Henis Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Canadian Journal of Microbiology* **31**: 881–887.

Karadeniz A, Topcuoğlu F, İnan S. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**: 1061–1064.

Karnwal A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology* **91**: 61–63.

Kende H. 1989. Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant physiology* **91**: 1.

Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, Krapp A. 2012. The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. *The Plant Cell Online* **24**: 245–258.

- King RW, Evans LT. 2003.** Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prising open the lid of the 'Florigen' black box. *G. Annual Review of Plant Biology* **54**: 307–328.
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. 1980.** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**: 885–886.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* **7**: 39–44.
- Knösel DH. 1962.** Prüfung von bakterien auf fähigkeit zur sternbildung. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg*: 79–100.
- Knösel DH. 1984.** Genus IV. *Phyllobacterium* (ex Knosel 1962) nom. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins., 254–256.
- Koh S, Wiles AM, Sharp JS, Naider FR, Becker JM, Stacey G. 2002.** An oligopeptide transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **128**: 21–29.
- Kojima S, Bohner A, Gassert B, Yuan L, von Wirén N. 2007.** AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **52**: 30–40.
- Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN, Glass ADM. 2012.** Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *The New phytologist* **194**: 724–731.
- Krapp A, Berthomé R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaings L, Elftieh S, Major H, Renou J-P, Daniel-Vedele F. 2011.** *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant physiology* **157**: 1255–1282.
- Krouk G, Crawford NM, Coruzzi GM, Tsay Y-F. 2010a.** Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 265–272.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Gojon A. 2010b.** Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* **18**: 927–937.
- Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A. 2008.** Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil* **304**: 35–44.
- Lambert B, Joos H, Dierickx S, Vantomme R, Swings J, Kersters K, Van Montagu M. 1990.** Identification and plant interaction of a *Phyllobacterium* sp., a predominant Rhizobacterium of young sugar beet plants. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1093–1102.

- Lan W-Z, Wang W, Wang S-M, Li L-G, Buchanan BB, Lin H-X, Gao J-P, Luan S. 2010.** A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 7089–7094.
- Lappartient AG, Touraine B. 1996.** Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact Canola (the role of phloem-translocated glutathione). *Plant physiology* **111**: 147–157.
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass AD, Touraine B. 1999.** Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **18**: 89–95.
- Larcher M. 2002.** Stimulation de la croissance du Colza par *Phyllobacterium* sp. : mode d'action et impact de la compétition bactérienne. Thèse SupAgro, Montpellier, France.
- Larcher M, Muller B, Mantelin S, Rapior S, Cleyet-Marel JC. 2003.** Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New phytologist* **160**: 119–125.
- Leeman M, Van Pelt J, Den Ouden F, Heinsbroek M, Bakker P, Schippers B. 1995.** Induction of systemic resistance against *Fusarium wilt* of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **85**: 1021–1027.
- Leitner D, Klepsch S, Ptashnyk M, Marchant A, Kirk GJD, Schnepf A, Roose T. 2010.** A dynamic model of nutrient uptake by root hairs. *The New phytologist* **185**: 792–802.
- Lemanceau P, Bakker PA, De Kogel WJ, Alabouvette C, Schippers B. 1992.** Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of *Fusarium wilt* of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2978–2982.
- Leutwiler LS, Hough-Evans BR, Meyerowitz EM. 1984.** The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG* **194**: 15–23.
- Li G, Liu K, Baldwin SA, Wang D. 2003.** Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *The Journal of biological chemistry* **278**: 35732–35742.
- Li J, Ovakim DH, Charles TC, Glick BR. 2000.** An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Current microbiology* **41**: 101–105.
- Li W, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass ADM. 2007.** Dissection of the ATNRT2.1:ATNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology* **143**: 425–433.
- Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE. 2007.** Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J* **1**: 321–330.

- Lin S-H, Kuo H-F, Canivenc G, Lin C-S, Lepetit M, Hsu P-K, Tillard P, Lin H-L, Wang Y-Y, Tsai C-B, Gojon A, Tsay YF. 2008.** Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant cell* **20**: 2514–2528.
- Lin B-L, Sakoda A, Shibasaki R, Goto N, Suzuki M. 2000.** Modelling a global biogeochemical nitrogen cycle in terrestrial ecosystems. *Ecological Modelling* **135**: 89–110.
- Lin Z, Zhong S, Grierson D. 2009.** Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3311–3336.
- Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE. 2005.** The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 13693–13698.
- Liu J, An X, Cheng L, Chen F, Bao J, Yuan L, Zhang F, Mi G. 2010.** Auxin transport in maize roots in response to localized nitrate supply. *Annals of Botany*.
- Liu K-H, Huang C-Y, Tsay Y-F. 1999.** CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**: 865–874.
- Liu L-H, Ludewig U, Frommer WB, von Wirén N. 2003.** AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **15**: 790–800.
- Van Loon LC. 2000.** Systemic induced resistance. Mechanisms of resistance to plant diseases. Slusarenko AJ, Fraser RSS & van Loon LC ., 521–574.
- Van Loon L, Bakker P, Pieterse C. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology* **36**: 453–483.
- Van Loon L, Glick BR. 2004.** Increased plant fitness by rhizobacteria. Molecular ecotoxicology of plants. Sandermann H, 177–205.
- Loper JE, Gross H. 2007.** Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 265–278.
- Loper JE, Schroth M. 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* **76**: 386.
- López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farías-Rodríguez R, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E. 2007.** *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **20**: 207–217.
- Loqué D, Wirén N von. 2004.** Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1293–1305.
- Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K,**

- Takahashi H, von Wirén N. 2006.** Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **48**: 522–534.
- Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004.** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**: 1–25.
- Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV. 2002.** Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 373–383.
- Lugtenberg BJJ, Dekkers LC. 1999.** What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* **1**: 9–13.
- Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV. 2001.** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 461–490.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009.** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**: 541–556.
- Lynch J. 1995.** Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology* **109**: 7–13.
- Ma JF. 2005.** Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical reviews in plant sciences* **24**: 267–281.
- Ma W, Guinel FC, Glick BR. 2003.** *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. *Applied and environmental microbiology* **69**: 4396–4402.
- MacMillan J. 2001.** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of plant growth regulation* **20**: 387–442.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. 2007.** Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). *Planta* **226**: 867–876.
- Mantelin S, Desbrosses G, Larcher M, Tranbarger TJ, Cleyet-Marel J-C, Touraine B. 2006a.** Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta* **223**: 591–603.
- Mantelin S, Saux MF-L, Zakhia F, Béna G, Bonneau S, Jeder H, de Lajudie P, Cleyet-Marel J-C. 2006b.** Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 827–839.
- Mantelin S, Touraine B. 2004.** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany* **55**: 27–34.

- Marschner H. 1995.** *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML. 2010.** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal soil science and plant nutrition* **10** (3): 293–319.
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, Mengel K. 2000.** The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and fertility of soils* **30**: 433–439.
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, Bauer WD. 2003.** Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1444–1449.
- Maurhofer M. 1994.** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *GacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84**: 139.
- Maxam AM, Gilbert W. 1977.** A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 560–564.
- Mazurier S, Corberand T, Lemanceau P, Raaijmakers JM. 2009.** Phenazine antibiotics produced by *fluorescent pseudomonas* contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium wilt*. *ISME J* **3**: 977–991.
- McClintock B. 1989.** Genes, cells, and organisms: The discovery and characterization of transposable elements, the collected papers of Barbara McClintock. *Molecular Reproduction and Development* **1**: 146–146.
- McCullagh M, Utkhede R, Menzies JG, Punja ZK, Paulitz TC. 1996.** Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 747–755.
- McInroy JA, Kloepper JW. 1995.** Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* **173**: 337–342.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. 1998.** *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662–682.
- Meissner RC, Jin H, Cominelli E, Denekamp M, Fuertes A, Greco R, Kranz HD, Penfield S, Petroni K, Urzainqui A, et al. 1999.** Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in *R2R3 MYB* genes. *The Plant cell* **11**: 1827–1840.
- Mergaert J, Cnockaert MC, Swings J. 2002.** *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1821–1823.
- Meyer C, Stitt M. 2001.** Nitrate Reduction and signalling. In: Lea PDPJ, Morot-Gaudry

- J-F, eds. Plant Nitrogen. Springer Berlin Heidelberg, 37–59.
- Miao Y, Zentgraf U. 2007.** The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *The Plant cell* **19**: 819–830.
- Michiels KW, Croes CL, Vanderleyden J. 1991.** Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Journal of General Microbiology* **137**: 2241.
- Miller AJ, Cramer MD. 2004.** Root nitrogen acquisition and assimilation. In: Lambers H, Colmer TD, eds. Root Physiology: from Gene to Function. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1–36.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM. 2007.** Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2297–2306.
- Miller AJ, Smith SJ. 1996.** Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany* **47**: 843–854.
- Mirza MS, Mehnaz S, Normand P, Prigent-Combaret C, Moëgne-Loccoz Y, Bally R, Malik KA. 2006.** Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils* **43**: 163–170.
- Mitter N, Srivastava A, Ahamad S, Sarbhoy A, Agarwal D. 2002.** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* **153**: 187–193.
- Mittler R, Kim Y, Song L, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B, Zhu J-K. 2006.** Gain- and loss-of-function mutations in *zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS letters* **580**: 6537–6542.
- Mullen MD. 2005.** Phosphorus in soils: biological interactions. Encyclopedia of Soils in the Environment, D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks, 210–215.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**: 335–350.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U. 2009.** Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* **182**: 31–48.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG. 2006.** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436–439.
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass ADM, Touraine B. 2003.** Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology* **52**: 689–703.

- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC. 2008.** Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist* **179**: 595–614.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, Van Kleunen M. 2009.** Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in plant science* **15**: 684–692.
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM. 2003.** Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant & cell physiology* **44**: 304–317.
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA. 1994.** Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1591–1601.
- Oldroyd GED. 2007.** Nodules and hormones. *Science (Washington)* **315**: 52–53.
- Oldroyd GED, Downie JA. 2008.** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 519–546.
- Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Guimarães CT, Schaffert RE, Sá NMH. 2009.** Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1782–1787.
- Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2004.** Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* **219**: 714–721.
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2002.** Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology* **129**: 886–896.
- Orsel M, Miller AJ. 2010.** Transport Systems for NO_3^- and NH_4^+ . In: Foyer CH, Zhang H, eds. *Annual Plant Reviews Volume 42*. Wiley-Blackwell, 83–102.
- Ortiz-Lopez A, Chang H-C, Bush D. 2000.** Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 275–280.
- Page DR, Grossniklaus U. 2002.** The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature reviews. Genetics* **3**: 124–136.
- Patten CL, Glick BR. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*. **68**: 3795–3801.
- Pharis RP, King RW. 1985.** Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual review of plant physiology* **36**: 517–568.
- Pitts RJ, Cernac A, Estelle M. 1998.** Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **16**: 553–560.

- Plett D, Toubia J, Garnett T, Tester M, Kaiser BN, Baumann U. 2010.** Dichotomy in the *NRT* gene families of dicots and grass species. *PLoS ONE* **5**: e15289.
- Podile AR, Kishore GK. 2006.** Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS, ed. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands, 195–230.
- Probanza A, Lucas García JA, Ruiz Palomino M, Ramos B, Gutiérrez Mañero FJ. 2002.** *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology* **20**: 75–84.
- Pruitt RE, Meyerowitz EM. 1986.** Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of molecular biology* **187**: 169–183.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, de Kock MJD. 2006.** Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular plant-microbe interactions* **19**: 699–710.
- Raaijmakers JM, Leeman M, Van Oorschot MMP, Van der Sluis I, Schippers B, Bakker P. 1995.** Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **85**: 1075–1081.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëgne-Loccoz Y. 2009.** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* **321**: 341–361.
- Rahayu YS, Walch-Liu P, Neumann G, Römheld V, von Wirén N, Bangerth F. 2005.** Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃--induced stimulation of leaf growth. *Journal of experimental botany* **56**: 1143–1152.
- Ramey B, Koutsoudis M, Bodman S von, Fuqua C. 2004.** Biofilm formation in plant-microbe associations. *Plant Science Articles*.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, Hoste B, Vancanneyt M, Kersters K, De Ley J. 1993.** *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca*, L. kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 574–584.
- Reinoso H, Luna V, Dauría C, Pharis RP, Bottini R. 2002.** Dormancy in peach (*Prunus persica*) flower buds. VI. Effects of gibberellins and an acylcyclohexanedione (trinexapac-ethyl) on bud morphogenesis in field experiments with orchard trees and on cuttings. *Canadian Journal of Botany* **80**: 664–674.
- Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. 2002.** Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica. *Applied and environmental microbiology* **68**: 2261–2268.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A. 2006.** A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*.

Plant Physiology **140**: 909–921.

- Ribaudo CM, Krumholz EM, Cassán FD, Bottini R, Cantore ML, Curá JA. 2006.** *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* **25**: 175–185.
- Ribaudo C, Rondanini D, Cura J, Fraschina A. 2001.** Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biologia plantarum* **44**: 631–634.
- Richardson A, Hadobas P. 1997.** Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian journal of microbiology* **43**: 509–516.
- Rodríguez H, Fraga R. 1999.** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* **17**: 319–339.
- Rodríguez-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruíz-Saíñz JE. 2007.** Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters* **272**: 127–136.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2006.** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **19**: 827–837.
- Rossel JB, Wilson PB, Hussain D, Woo NS, Gordon MJ, Mewett OP, Howell KA, Whelan J, Kazan K, Pogson BJ. 2007.** Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **19**: 4091–4110.
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM. 2001.** AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁽⁺⁾ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14150–14155.
- Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, Reddy MS, Wei H-X, Paré PW, Kloepper JW. 2003.** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 4927–4932.
- Ryu RJ, Patten CL. 2008.** Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of bacteriology* **190**: 7200.
- Saharan B, Nehra V. 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences*.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)* **230**: 1350–1354.
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004.** *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology* **136**: 2734–2746.

- Saleh-Lakha S, Glick BR. 2006.** Plant growth promoting bacteria. In *Modern Soil Microbiology* (2nd ed) (Van Elsas, J.D et al. eds). CES Press, pp. 503–520.
- Salisbury FB. 1994.** The role of plant hormones. *Plant Environment interactions*: 39 – 81.
- Salsac L, Chaillou S, Morot-Gaudry J., Lesaint C, Jolivet E. 1987.** Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology. Biochemistry*: 805–812.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463–5467.
- Santoro MV, Zygadlo J, Giordano W, Banchio E. 2011.** Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 1177–1182.
- Scheible W, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M. 1997a.** Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in Tobacco. *The Plant Cell* **9**: 783–798.
- Scheible W-R, Lauerer M, Schulze E-D, Caboche M, Stitt M. 1997b.** Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal* **11**: 671–691.
- Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M. 2004.** Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of *Arabidopsis* in Response to Nitrogen. *Plant Physiology* **136**: 2483–2499.
- Schiefelbein JW. 2000.** Constructing a Plant Cell. The Genetic Control of Root Hair Development. *Plant Physiology* **124**: 1525–1531.
- Schiefelbein J, Kwak S-H, Wieckowski Y, Barron C, Bruex A. 2009.** The gene regulatory network for root epidermal cell-type pattern formation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1515–1521.
- Schlöter M, Hartmann A. 1998.** Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis, Philadelphia, Pa.* **v. 25(1/3) p. 159-179.**
- Schünmann PHD, Richardson AE, Smith FW, Delhaize E. 2004.** Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of experimental botany* **55**: 855–865.
- Seneviratne G, Weerasekara MLMAW, Seneviratne KACN, Zavahir JS, Kecskés ML, Kennedy IR. 2010.** Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. In: Maheshwari DK, ed. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 81–95.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz A, Vandamme P, Barka EA, Salles J, Van Elsas J,**

- Faure D, Reiter B, Glick B, Wang-Pruski G, Nowak J et al. 2005.** *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**: 1187–1192.
- Shedova E, Lipasova V, Velikodvorskaya G, Ovadis M, Chernin L, Khmel I. 2008.** Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of *Serratia plymuthica*. *Folia Microbiologica* **53**: 110–114.
- Siddiqi MY, Glass AD, Ruth TJ, Ruffy TW. 1990.** Studies of the uptake of nitrate in barley: I. kinetics of NO₃ influx. *Plant physiology* **93**: 1426–1432.
- Siddiqui IA, Shahid Shaukat S. 2003.** Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 1615–1623.
- Signora L, De Smet I, Foyer CH, Zhang H. 2001.** ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **28**: 655–662.
- Sivasankar S, Oaks A. 1996.** Nitrate assimilation in higher plants: The effect of metabolites and light. *Plant physiology and biochemistry*. Elsevier, 609–620.
- De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inzé D, Foyer CH, Zhang H. 2003.** An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **33**: 543–555.
- Smith S, De Smet I. 2012.** Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1441–1452.
- Solomonson LP, Barber MJ. 1990.** Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 225–253.
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M. 2004.** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* **30**: 205–240.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews* **31**: 425–448.
- Steiner HY, Song W, Zhang L, Naider F, Becker JM, Stacey G. 1994.** An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *The Plant Cell* **6**: 1289–1299.
- Stitt M. 1999.** Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 178–186.
- Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Arsenault WJ, Buchanan NA. 1999.** Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology* **48**: 360–369.

- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, Wirén N von, Fujiwara T. 2006.** The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *The Plant Cell Online* **18**: 1498–1509.
- Tanimoto E. 1987.** Gibberellin-dependent root elongation in *Lactuca sativa*: recovery from growth retardant-suppressed elongation with thickening by low concentration of Ga₃. *Plant and Cell Physiology* **28**: 963–973.
- Tanimoto M, Roberts K, Dolan L. 1995.** Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **8**: 943–948.
- Tao GC, Tian SJ, Cai MY, Xie GH. 2008.** Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*: 515–523.
- Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. 2000.** Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **13**: 637–648.
- Thibaud JB, Grignon C. 1981.** Mechanism of nitrate uptake in corn roots. *Plant Science Letters* **22**: 279–289.
- Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L, Du B. 2009.** Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 276–284.
- Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH. 1979.** Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 1016–1024.
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, Jones JDG. 1999.** Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *The Plant Cell Online* **11**: 1841–1852.
- Touraine B. 2004.** Nitrate uptake by roots - transporters and root development. In: Amâncio S, Stulen I, eds. *Plant Ecophysiology. Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*. Springer Netherlands, 1–34.
- Touraine B, Daniel-Vedele F, Forde BG. 2001.** Nitrate uptake and its regulation. In: Lea PDPJ, Morot-Gaudry J-F, eds. *Plant Nitrogen*. Springer Berlin Heidelberg, 1–36.
- Touraine B, Glass AD. 1997.** NO₃⁻ and ClO₃⁻ fluxes in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Does the *CHL1-5* gene encode a low-affinity NO₃⁻ transporter? *Plant physiology* **114**: 137–144.
- Tranbarger TJ, Al-Ghazi Y, Muller B, Teyssendier De La Serve B, Dumas P, Touraine B. 2003.** Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **26**: 459–469.
- Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. 2006.** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied*

Biochemistry and Microbiology **42**: 117–126.

Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**: 2290–2300.

Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM. 1993. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**: 705–713.

Turner BL, Papházy MJ, Haygarth PM, McKelvie ID. 2002. Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **357**: 449–469.

Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M, Montanari O, Murray J, Andriankaja A, Zhang J-Y, Benedito V, Hofer JMI, Chueng F, Town CD. 2007. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiology* **144**: 538–549.

Unkovich M, Baldock J. 2008. Measurement of asymbiotic N₂ fixation in Australian agriculture. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2915–2921.

Urbański DF, Malolepszy A, Stougaard J, Andersen SU. 2012. Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **69**: 731–741.

Uren N. 2007. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P, eds. *The Rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil interface*. CRC Press, 1–21.

Valverde A, Velázquez E, Fernández-Santos F, Vizcaíno N, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Igual JM, Willems A. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1985–1989.

Vansuyt G, Robin A, Briat JF, Curie C, Lemanceau P. 2007. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 441–447.

Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS, Thomashow L. 2006. Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 56–65.

Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang H-S, van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **17**: 895–908.

Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571–586.

Vitor SC, Duarte GT, Saviani EE, Vincentz MGA, Oliveira HC, Salgado I. 2013. Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal

- activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Planta* **238**: 475–486.
- Walch-Liu P, Ivanov II, Filleur S, Gan Y, Remans T, Forde BG. 2006.** Nitrogen Regulation of Root Branching. *Annals of Botany* **97**: 875–881.
- Wang Y, Brown H, Crowley D, Szaniszlo P. 1993.** Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant, Cell & Environment* **16**: 579–585.
- Wang R, Liu D, Crawford NM. 1998.** The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 15134–15139.
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM. 2003.** Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*. **132**: 556–567.
- Waraich EA, Ahmad R, Saifullah, Ashraf MY, Ehsanullah. 2011.** Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. *Australian Journal of Crop Science*.
- Watson JD, Crick FH. 1953.** Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737–738.
- Weller DM. 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 379–407.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T. 2001.** Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 10487.
- Whipps JM. 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany* **52**: 487.
- Wilkinson JQ, Crawford NM. 1991.** Identification of the *Arabidopsis* CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene NIA2. *The Plant Cell* **3**: 461–471.
- Wilkinson JQ, Crawford NM. 1993.** Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Molecular & General Genetics: MGG* **239**: 289–297.
- Williams PM, Mallorca MS. 1982.** Abscisic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of *Glycine max*. *Plant and Soil* **65**: 19–26.
- Wipat A, Harwood CR. 1999.** The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 1–9.
- Witte C-P. 2011.** Urea metabolism in plants. *Plant Science* **180**: 431–438.
- Wray JL. 1993.** Molecular biology, genetics and regulation of nitrite reduction in higher

- plants. *Physiologia Plantarum* **89**: 607–612.
- Zhang H, Forde BG. 1998.** An *Arabidopsis* *MADS Box* Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture. *Science* **279**: 407–409.
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG. 1999.** Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 6529–6534.
- Zhang H, Kim M-S, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu C-M, Allen R, Melo IS, Paré PW. 2007.** Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* **226**: 839–851.
- Zhang H, Murzello C, Sun Y, Kim M-S, Xie X, Jeter RM, Zak JC, Dowd SE, Paré PW. 2010.** Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **23**: 1097–1104.
- Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim M-S, Dowd SE, Paré PW. 2009.** A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **58**: 568–577.
- Zhang H, Xie X, Kim MS, Korniyev DA, Holaday S, Paré PW. 2008.** Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal* **56**: 264–273.
- Zimmermann A. 1902.** Über Bakterienknoten in den Blättern einiger Rubiaceen. *Jahrb Wiss Bot*: 1–11.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T. 2004.** Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**: 764–767.

