

Faculté des bioingénieurs

**Effets de *Rhizophagus irregularis* et
de *Bacillus velezensis*, seuls ou
combinés, sur le développement du
blé infecté ou non par *Zymoseptoria
tritici* en conditions semi-
hydroponiques.**

Auteure : Pauline Van Gansberghe

Promoteurs :

Pr. Stéphane Declerck (UCL/SST/ELI/ELIM)

Dr. Maryline Calonne-Salmon (UCL/SST/ELI/ELIM)

Lecteurs :

Pr. Xavier Draye (UCL/SST/ELI/ELIA)

Mr. Marc Ongena

Année académique 2020-2021

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de Bioingénieur :
Sciences Agronomiques

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mes promoteurs, Pr. Stéphane Declerck et Dr. Maryline Calonne, pour leur accueil au sein du laboratoire de Mycologie de l'UCLouvain.

Merci au Pr. Stéphane Declerck pour les précieux conseils tout au long de la réalisation de ce mémoire, merci au Dr. Maryline Calonne de m'avoir encadrée dans toute la réalisation de ce mémoire et surtout pour les nombreuses relectures.

Je tiens également à remercier mes lecteurs, Pr. Xavier Draye et Mr. Marc Ongena pour avoir accepté de faire partie du jury de mon mémoire.

Je remercie Dr Bryan Vincent pour sa collaboration, soutien, guidance, patience et bonne humeur. Je suis très reconnaissante.

Je suis très reconnaissante à tout le personnel du laboratoire de mycologie de l'UCLouvain. Je remercie Virginie Moreau, qui m'a accueilli avec bonne humeur et m'a guidé dans les premières étapes de ce travail. Je remercie François Ferrais, pour ses conseils et sa collaboration lors de l'arrachage des plants de blé et l'analyse de la surface foliaire à l'aide du logiciel ImageJ. Je remercie Philippe Charue pour son aide technique. Je remercie Alice et Bérangère pour leur relecture et leurs soutien morale tout au long de mon mémoire.

Je tiens à remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu, et spécialement ma maman pour toutes ses relectures.

Je veux également remercier Carolina Filori et ma grand-mère pour la dernière relecture.

Finalement, merci à Damon pour sa patience, son soutien et son calme tout au long de mon mémoire. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi.

Table de matière

REMERCIEMENTS	I
TABLE DE MATIERE	II
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES EQUATIONS	XI
1. INTRODUCTION	1
2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
2.1 . LE FROMENT	3
2.1.1 CLASSIFICATION ET GENEALOGIE	3
2.1.2 DÉVELOPPEMENT DU BLÉ	5
2.1.3 IMPORTANCE ÉCONOMIQUE DU BLÉ	5
2.2 . ZYMOSEPTORIA TRITICI (TÉLÉMORPHE : MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA)	7
2.2.1 TAXONOMIE ET BIOLOGIE	7
2.2.2 CYCLE DE DÉVELOPPEMENT	8
2.2.3 SYMPTÔMES	11
2.2.4 MÉTHODE DE LUTTE	12
2.3 . LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS À ARBUSCULES (CMA)	13
2.3.1 CYCLE DE DÉVELOPPEMENT ET ÉTABLISSEMENT DE LA SYMBIOSE	14
2.3.2 BÉNÉFICES DE LA SYMBIOSE	17
2.3.3 TRANSPORT DU P DES CMA À LA PLANTE	21
2.4 . LES BACTÉRIES PGPR (PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA)	24
2.4.1 TAXONOMIE ET BIOLOGIE DES PGPR	24
2.4.2 CRÉATION DU BIOFILM	24
2.4.3 BÉNÉFICES DES PGPR POUR LES PLANTES	25
2.4.4 INTERACTION PGPR - CMA	27
3. OBJECTIFS	30
4. MATÉRIELS ET MÉTHODES	31
4.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE	31
4.1.1 BLÉ VARIÉTÉ FAUST	31
4.1.2 CHAMPIGNON MYCORHIZIEN À ARBUSCULES – CMA	32
4.1.3 PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA – PGPR	33
4.1.4 ZYMOSEPTORIA TRITICI	34

4.2	DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL : DESCRIPTION DU SYSTÈME SEMI-HYDROPONIQUE À CIRCULATION CONTINUE	35
4.3	MISE EN PLACE DU PRE-TEST	37
4.3.1	DÉSINFECTION ET PRÉ-GERMINATION DES GRAINES DE BLÉ	39
4.3.2	MYCORHIZATION DES PLANTULES DE BLÉ	39
4.3.3	TRANSFERT DES PLANTULES DE BLÉ DANS LE SYSTÈME SEMI-HYDROPONIQUE À CIRCULATION EN CONTINU	40
4.3.4	PHASE D'ACCLIMATATION DES PLANTES	41
4.3.5	DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ET DISPOSITION EN SERRE	41
4.3.6	MISE EN ROUTE DU SYSTÈME À CIRCULATION EN CONTINU	41
4.3.7	ÉCHANTILLONNAGE	42
4.4.	MISE EN PLACE DE L'EXPERIENCE FINALE	43
4.4.1	TRANSFERT DES PLANTULES DE BLÉ DANS LE SYSTÈME SEMI-HYDROPONIQUE À CIRCULATION EN CONTINU	43
4.4.2	DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ET DISPOSITION EN SERRE	44
4.4.3	ÉCHANTILLONNAGE	45
4.4.4	INOCULATION DE <i>ZYMNOSEPTORIA TRITICI</i>	45
4.4.5	OBSERVATIONS DES SYMPTÔMES	46
4.4.6	ÉCHANTILLONNAGE	47
4.5	MESURES EFFECTUÉES	48
4.5.1	DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE	48
4.5.2	CROISSANCE INTRA-RACINAIRE DU CMA	50
4.5.3	DÉVELOPPEMENT DE LA BACTÉRIE PGPR	53
4.5.4	ANALYSES MINÉRALES	54
4.6	ANALYSES STATISTIQUES	57
5.	RESULTATS	60
5.1.	RESULTATS DU PRE-TEST : PRELEVEMENT DU PI PAR LES PLANTES MYCORHIZEES ET NON-MYCORHIZEES DANS LA SOLUTION DE HOAGLAND LOW-P	60
5.2.	RESULTATS DE L'EXPERIENCE FINALE : PRELEVEMENT DU PI PAR LES PLANTES MYCORHIZEES ET NON-MYCORHIZEES, BACTERISEES ET NON-BACTERISEES DANS LA SOLUTION DE HOAGLAND LOW-P EN ABSENCE DE PATHOGENE	61
5.2.1	DÉNOMBREMENTS BACTÉRIENS	61
5.2.2	ANALYSE MINÉRALE	62
5.3.	RESULTATS DE L'EXPERIENCE FINALE : PRELEVEMENT DU PI PAR LES PLANTES MYCORHIZEES ET NON-MYCORHIZEES, BACTERISEES ET NON-BACTERISEES DANS LA SOLUTION DE HOAGLAND LOW-P, APRES INOCULATION DU PATHOGENE	63
5.3.1	DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE	63
5.3.2	POURCENTAGES DE COLONISATION DES RACINES DE BLÉ PAR LE CMA <i>RHIZOPHAGUS IRREGULARIS</i> MUCL 41833.	65
5.3.3	DÉNOMBREMENTS BACTÉRIENS SUR LES RACINES ET DANS LA SOLUTION NUTRITIVE	66
5.3.4	ANALYSE MINÉRALE	68
6.	DISCUSSION	71
6.1.	PRE-TEST	71
6.1.1	ANALYSE MINÉRALE	71
6.2.	EXPÉRIENCE FINALE	72

6.2.1	DIMINUTION DES POURCENTAGES DE DÉVELOPPEMENT DU CMA DANS LES RACINES AU COURS DU TEMPS	72
6.2.2	EFFET DE <i>RHIZOPHAGUS IRREGULARIS</i> SUR LE DÉVELOPPEMENT DU BLÉ, LE PRÉLÈVEMENT ET L'ACCUMULATION DE P	73
6.2.3	DÉVELOPPEMENT DE LA POPULATION BACTÉRIENNE ET DE <i>BACILLUS VELENZENSIS</i>	75
6.2.4	EFFET DE <i>BACILLUS VELENZENSIS</i> SUR LE DÉVELOPPEMENT DU BLÉ, LE PRÉLÈVEMENT ET L'ACCUMULATION DE P	75
6.2.5.	INTERACTION DE <i>BACILLUS VELENZENSIS</i> ET <i>RHIZOPHAGUS IRREGULARIS</i>	76
6.3.	LIMITES DES EXPERIENCES ET PERSPECTIVES	77
7.	CONCLUSION	79
8.	BIBLIOGRAPHIE	80
9.		95
	ANNEXES	- 1 -
	ANNEXES 1 : COMPLEMENTS AUX MATERIELS ET METHODE	- 1 -
	ANNEXES 2 : COMPLÉMENTS AUX RÉSULTATS	- 2 -

Liste des figures

Figure 1. Schéma de l'évolution et de la ploïdie du genre <i>Triticum</i> (Chantret et al., 2005).	4
Figure 2. Organisation du génome du blé tendre hexaploïde (<i>Triticum aestivum</i> spp <i>aestivum</i>). Ce génome comprend 21 chromosomes intégrant les trois génomes homéologues (A, B, D) des espèces ayant successivement formé la série d'allopolyploïdes du genre <i>Triticum</i>	4
Figure 3. Biologie de <i>Zymosoptoria tritici</i> . A : Structure d'un pycnide de <i>Z. tritici</i> (Kema et al., 1996). B : pycnidiospores de <i>Z. tritici</i> (Kema et al., 1996) C : Pseudothèce de <i>Z. tritici</i> (Eyal, 1999). D : Détail d'un asque contenant les ascospores (Halama 1996).	8
Figure 4. Cycle biologique de la septoriose causée par l'agent pathogène <i>Z. tritici</i> (Ponomarenko et al, 2011)	9
Figure 5. Différentes étapes du processus infectieux et symptômes de <i>Z. tritici</i> . A : Pénétration stomatique (Palmer & Skinner, 2002). B : Colonisation du mésophile (Palmer & Skinner, 2002). C : Ebauche d'une pycnide formée dans la cavité sous-stomatique (Palmer & Skinner, 2002). D : Cirrhes de <i>Z. tritici</i> (Vrancken et al., 2008). E : Tache produite par <i>Z. tritici</i> sur une feuille de blé et présentant des pycnides (Vrancken et al., 2008). Adaptée de (Jemmali, 2015).	10
Figure 6. Les différentes structures de reproduction de l'agent pathogène <i>Z. tritici</i> . A gauche, la reproduction sexuée caractérisée par un pseudothèce (A), un asque et des ascospores (B). A droite, la reproduction asexuée caractérisée par une pycnide (C) contenant des pycnidiospores (D) (Morais, 2015).....	12
Figure 7. Les différents types d'associations mycorhiziennes d'après (Selosse & Le tacon, 1998)	14
Figure 8. Cycle de vie d'un champignon mycorhizien à arbuscules. ERM : Réseau mycorhizien extra-racinaire. IRM : Réseau mycélien intra-racinaire d'après Bucking et al., 2012	15
Figure 9. Schéma des différentes étapes de colonisation des CMA (adapté d'après Bonfante & Genre 2010) repris de (NDONDA, 2018)	17
Figure 10. Processus de formation de biofilm par <i>B. subtilis</i> (Vlamakis et al. 2013)	25
Figure 11. Représentation schématique de la rétribution réciproque du carbone (C) et du phosphore (P) entre le champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) <i>R. irregularis</i> et la bactérie solubilisatrice de phosphate (PSB) <i>R. aquatilis</i> . ST transporteur de sucre, fruT transporteur de fructose, gluT transporteur de glucose, PT transporteur de phosphate, PSS système sécrétoire des protéines, Pase phosphatase, Pi P inorganique, Po P organique (Zhang et al., 2018).	29
Figure 12. Espèce FAUSTUS (Heens et al., 2016).....	31
Figure 13. Image de spores de <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 ainsi que ces hyphes. Copyright : Laboratoire de mycologie de l'UCLouvain.	32
Figure 14. Photographie d'une boîte de Petri sur laquelle ont poussé des colonies de bactéries. Les colonies de <i>B. velezensis</i> exprimant la GFP sont fluorescentes	33

Figure 15. Souche de <i>Z. tritici</i> MUCL45408 utilisée a été fournie par la mycothèque de Louvain-la-Neuve repiquée le 19/02/2021.	34
Figure 16. Système de culture circulatoire et semi-hydroponique (Garcés-Ruiz et al., 2017).	36
Figure 17. Schéma récapitulatif de la mise en place du Prétest.	38
Figure 18. Désinfection des graines à l'eau de Javel.	39
Figure 19. Production de masse de <i>R. irregularis</i> MUCL 41833 sur de plants de blé	39
Figure 20. Dispositif expérimentale et disposition des pots en serre lors du Prétest.	41
Figure 21. Dispositif pour effectuer le « Flushing ». D'après Garcés-Ruiz et al. (2017).	42
Figure 22. Prise d'échantillons.....	42
Figure 23. Plants de blé dans un bain de solution bactérienne de <i>Bacillus velezensis</i> GA1. ...	44
Figure 24. Dispositif expérimentale et disposition des pots en serre.	45
Figure 25. Comptage de spores de MUCL45408 dans une cellule de THOMAS (Grossissement = X40).	46
Figure 26. Application de la solution fongique par spray et plantules couvertes de sacs à autoclave.....	46
Figure 27. Plantes dans leur pot de culture juste avant d'être récoltées.	48
Figure 28. Exemple d'une photographie de feuilles de froment qui sera entré dans le logiciel ImageJ IJ 1.46r 2012 pour obtenir une mesure de surface foliaire. La règle à gauche permet la calibration du logiciel.....	49
Figure 29. Interface du logiciel ImageJ IJ 1.46r 2012. Exemple d'analyse des surfaces foliaires des plantes analysées à l'aide du logiciel ImageJ.	49
Figure 30. Pesée des parties racinaire pour détermine le poids frais (A) et séchage des parties aériennes et racinaire dans une étuve à 70°C pendant 5 jours (B).	50
Figure 31. Protocole de coloration des racines selon le manuel crée par le laboratoire de mycologie.....	51
Figure 32. Représentation de l'évaluation du taux de colonisation racinaire par les CMA selon la méthode de Mc Gonigle et al. (1990) d'après le manuel écrit par le laboratoire de mycologie.....	52
Figure 33. Cinq dilutions de solution nutritive.	54
Figure 34. Digestion des échantillons avec 6 ml de HNO ₃ sur plaque chauffante à 60°C recouvert d'un verre de montre.	56
Figure 35. Les résidus ont été dissous avec 4 ml d'eau « régale » (3ml HCL 38% pour 1ml HNO ₃ 65%).	56

Figure 36. Les solutions ont été filtrées à l'aide de papier filtre Whatman (grade 41) de porosité de 20 micromètres.	57
Figure 37. Pourcentage de déplétion de Pi (%) dans la solution nutritive circulant dans les pots de culture des plantes inoculées (M) ou non (NM) par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833, après 0, 6 et 24 heures. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 4 répétitions par traitement. L'absence d'astérisque (*) démontre de l'absence de différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux traitements selon une ANOVA 1, suivie d'un test de Student.....	60
Figure 38. Pourcentage de déplétion de Pi (%) dans la solution nutritive circulant dans les pots de culture des plantes inoculées (M) ou non (NM) par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (B) ou non (NB) par la bactérie <i>Bacillus velezensis</i> GA1, après 0, 6 et 12 heures lors de la 1 ^{ère} circulation. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 6 répétitions par traitement. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test test HSD-Tukey.	62
Figure 39. Pourcentage de déplétion de Pi (%) dans la solution nutritive circulant dans les pots de culture des plantes inoculées (M) ou non (NM) par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (B) ou non (NB) par <i>Bacillus velezensis</i> GA1, après 0, 12,, 24 et 36 heures. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 6 répétitions par traitement. Les points suivis d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2 suivie d'un test test HSD-Tukey.	68
Figure 40. Concentration en phosphore dans les parties racinaires des plantes inoculées avec <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec <i>Bacillus velezensis</i> GA1 et plantes non inoculées avec <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec <i>Bacillus velezensis</i> GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de <i>Zymnoseptoria Tritici</i> , estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).	- 3 -
Figure 41. Concentration en phosphore dans les parties aériennes des plantes inoculées avec <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec <i>Bacillus velezensis</i> GA1 et plantes non inoculées avec <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec <i>Bacillus velezensis</i> GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de <i>Zymnoseptoria Tritici</i> , estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).	- 4 -
Figure 42. Quantité en phosphore dans les parties racinaires des plantes inoculées avec <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec <i>Bacillus velezensis</i> GA1 et plantes non inoculées avec <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec <i>Bacillus velezensis</i> GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de <i>Zymnoseptoria Tritici</i> , estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).	- 4 -

Figure 43. Quantité en phosphore dans les parties aériennes des plantes inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de *Zymnoseptoria Tritici*, estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).- 5 -

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification du blé (Jemmali, 2015)	3
Tableau 2. Classification taxonomique du champignon mycorhizien à arbuscules.....	32
Tableau 3. Composition de la solution stock (solution mère) d' Hoagland concentrée 100 fois et réduite de 90% en phosphore exprimée en gramme par litre de solution.....	35
Tableau 4. Evaluation du taux de colonisation racinaire total, arbusculaire et vésiculaire des plants de maïs par <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833.	40
Tableau 5. Pourcentage de colonisation racinaire total, arbusculaire et vésiculaire des racines de blés colonisées par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 après 30 jours de colonisation avec l'inoculum.	43
Tableau 6. Tableau représentant le comptage des structures de CMA grâce à la méthode mise au point par McGonigle et al. (1990).....	53
Tableau 7. Tableau des transformations des variables afin de satisfaire l'hypothèse de normalité. Le facteur λ se réfère à la transformation BoxCox; log représente une transformation logarithmique ; sqrt représente une transformation racine carrée.	58
Tableau 8. Dénombrements bactériens (en UFC/100 μ L) des bactéries fluorescentes telles que <i>Bacillus velezensis</i> GA1 sur les racines de plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833.....	61
Tableau 9. Hauteur (cm), nombre de thalles/plants, nombre de feuilles chlorophylliennes/plant et surface foliaire (cm ²) / plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB) par la bactérie <i>Bacillus velezensis</i> GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).....	63
Tableau 10. Pourcentage en eau relative (%) dans la partie aérienne et dans le système racinaire des plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB) par la bactérie <i>Bacillus velezensis</i> GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).	64
Tableau 11. Poids sec de la partie aérienne et racinaire (g) des plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB) par la bactérie <i>Bacillus velezensis</i> GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).....	65
Tableau 12. Pourcentage de colonisation total, arbusculaires et vésiculaires (%) des racines de blé par le CMA <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB), par la bactérie <i>Bacillus velezensis</i> GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).....	66
Tableau 13. Dénombrements bactériens (en UFC/100 μ L) de la flore totale et des bactéries fluorescentes telles que <i>Bacillus velezensis</i> GA1 dans la solution nutritive et sur les racines de	

plantes inoculées (M) ou non (NM) avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1.67

Tableau 14. Concentration (mg/kg) et quantité (mg/plante) en P dans les parties aériennes et racinaires des plantes inoculées (M) ou non (NM) avec le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (B) ou non (NB) avec la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).69

Tableau 15. Concentration (mg/kg) et quantité (mg) de phosphore dans les parties aériennes et racinaires des plantes inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de *Zymnoseptoria Tritici*, estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). 70

Tableau 17. Root exudate wheat est un milieu basé sur la composition des exudats de blé crée dans le cadre du Projet Microsoilsystem.....- 1 -

Tableau 18. Pourcentage de déplétion dans la solution nutritive des plantes de blé lors du pré-test après 6 et 24 heures de circulation.- 2 -

Tableau 19. Pourcentage de déplétion (en % de la concentration initiale de Pi dans la solution de Hoagland low-P) dans la solution nutritive des plantes de blé inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (M-B) ou non (M-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non mycorhizées et inoculer (NM-B) ou non (NM-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, après 6 et 12 heures de circulation de la solution de Hoagland low-P dans les pots de culture- 2 -

Tableau 20. Pourcentage de déplétion (en % de la concentration initiale de Pi dans la solution de Hoagland low-P) dans la solution nutritive des plantes de blé inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (M-B) ou non (M-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non mycorhizées et inoculer (NM-B) ou non (NM-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, après 12, 24 et 36 heures de circulation de la solution de Hoagland low-P dans les pots de culture.....- 3 -

Liste des équations

Équation 1. Calculs des taux de colonisation (TC), taux d'arbuscules (TA) et taux de vésicules (TV).....	53
Équation 2. Quantité de phosphore standardisée	55
Équation 3. Pourcentage de déplétion.....	55
Équation 4. Transformation BoxCox, où y représente les valeurs transformées et x la valeur initiale.	58

1. Introduction

À l'heure actuelle, l'agriculture est confrontée à un défi majeur; nourrir une population sans cesse croissante dont le nombre d'individus devrait atteindre 9,2 milliards en 2050 (Gouel & Guimbard, 2017). Nourrir cette population impliquera des augmentations significatives de la production de plusieurs commodités de base dont les céréales qui devraient voir leur production croître d'un milliard de tonnes d'ici 2050.

Le blé est l'une des principales céréales cultivées et constitue une ressource alimentaire de base pour l'Homme car il entre dans la composition de nombreux produits alimentaires (OECD et FAO, 2020). Cependant, cette culture fait face à une maladie fort répandue sur le continent européen, la septoriose (Fones & Gurr, 2015). Ainsi en Wallonie, cette maladie est particulièrement problématique entraînant des pertes pouvant aller jusqu'à 30-40 % (CRA-W, 2021).

Pour faire face à cette croissance démographique et les besoins en blé, la production agricole devra augmenter et s'adapter continuellement aux contraintes imposées par le changement climatique et les maladies des cultures. La gestion optimale de l'eau, l'amélioration génétique des cultures, l'extension des terres cultivées ainsi que leur utilisation intensive, l'utilisation de fertilisants et de produits phytopharmaceutiques issus de la chimie de synthèse, occuperont une place sans cesse grandissante dans nos pratiques culturales. Cependant, l'utilisation des pesticides synthétiques peut avoir des conséquences majeures pour l'Homme et son environnement. C'est dans ce contexte, que plusieurs pays revoient leurs politiques quant à l'utilisation des pesticides issus de la chimie de synthèse (Mejri, 2018). Ainsi, des méthodes de lutte alternative contre les maladies et ravageurs sont développées, notamment par l'utilisation de micro-organismes bénéfiques tels que les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) et les Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

Les CMA sont des symbiotes racinaires de la plupart des espèces végétales (Smith & Read, 2008). Ces micro-organismes améliorent la nutrition hydrique et minérale des plantes en échange de ressources carbonées fournies par les plantes (Smith & Read, 2008). Cette association offre également à la plante une meilleure protection/tolérance contre les stress abiotiques et biotiques (Smith & Read, 2008). Les PGPR quant à elles sont des bactéries favorisant la croissance des plantes et augmentant leur résistance aux stress biotiques par effets directs (stimulation) ou indirects (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

De nombreux articles ont été publiés sur le rôle des PGPR et des CMA dans la protection des plantes et leur nutrition, notamment phosphatées. Cependant, peu d'informations sont disponibles à l'heure actuelle sur la combinaison de ces deux organismes.

C'est dans ce contexte de développement de moyens de lutte alternatifs comme le biocontrôle que s'inscrit ce mémoire. Il vise à étudier le rôle d'un CMA (*Rhizophagus irregularis* MUCL 41833) combiné ou non à une PGPR (*Bacillus velezensis* GA1), sur la

dynamique de prélèvement du phosphore (P) par le blé durant les premiers stades de développement de la plante et suite à une attaque de *Zymoseptoria tritici*, responsable de la septoriose chez le blé. Cette étude a été menée en système semi-hydroponique afin de pouvoir suivre la dynamique de prélèvement de phosphore par les plantes associées ou non aux micro-organismes.

2. Synthèse bibliographique

2.1. Le froment

2.1.1 Classification et généalogie

Le froment ou blé est une plante céréalière monocotylédone dont la position systématique se trouve dans le Tableau 1 (Jemmali, 2015).

Tableau 1. Classification du blé (Jemmali, 2015)

Classification du blé	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-Règne	<i>Tracheobionta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Famille	<i>Poaceae</i>
Tribu	<i>Triticeae</i>
Genre	<i>Triticum</i>

Il a été domestiqué il y a dix mille ans dans la région du croissant fertile du proche orient. À partir de son centre d'origine, le blé s'est propagé dans le monde entier et a atteint l'ouest de l'Europe environ 5 000 ans avant JC (Mejri, 2018). Au Néolithique, les conditions climatiques étaient trop extrêmes et l'homme chasseur nomade a été obligé d'adapter son style de vie pour devenir agriculteur sédentaire (Mejri, 2018). La domestication fut un événement clé pour la transition du mode de vie chasseurs-cueilleurs à l'apparition d'agriculteurs (Yale scientifique, 2018). En effet, le passage de formes dotées de mécanismes naturels de dispersion des graines à des formes dotées de rachis non fragiles a conduit à la domestication du blé 'einkorn' diploïde et du blé 'emmer' tétraploïde dans le sud-est de la Turquie (Figure 1) (Tuberosa et al., 2013).

Ces premières espèces domestiquées ont été les cultures de base des premiers agriculteurs pendant plusieurs milliers d'années avant d'être remplacées par des blés à battage libre (Tuberosa et al., 2013).

Aujourd'hui il existe cinq espèces cultivées qui sont regroupées en trois sections. : (1) *Monococcon* est composé d'espèces diploïdes, (2) *Dicoccoidea* est composé d'espèces tétraploïdes et (3) *Triticum* est composée d'espèces hexaploïdes. Cette dernière est issue d'un croisement et d'une amélioration végétale (Matsuoka, 2011) (Figure 1).

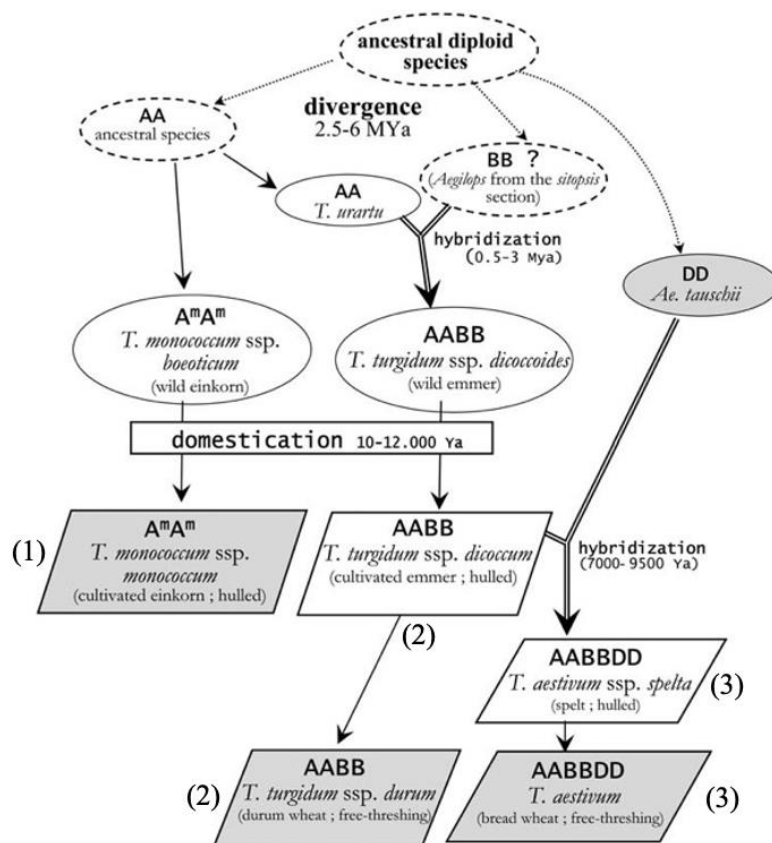


Figure 1. Schéma de l'évolution et de la ploïdie du genre *Triticum* (Chantret et al., 2005).

Les génotypes de cette espèce comme *T. aestivum* sont des amphidiploïdes, ce qui signifie que les cellules qui composent un individu de cette espèce contiennent plus d'un noyau distinct (Breiman & Graur, 1995) et contiennent trois paires de chromosomes homologues (Bonnot, 2016) (Figure 2).

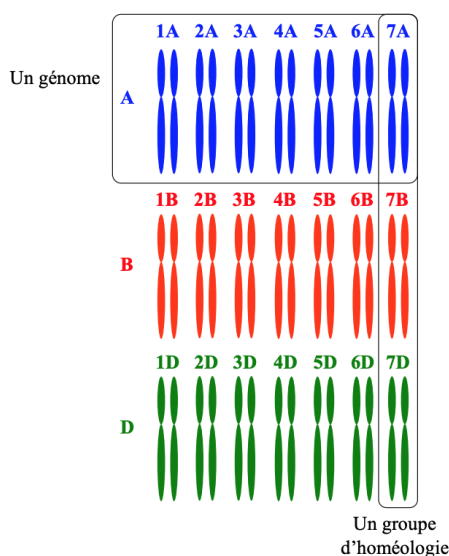


Figure 2. Organisation du génome du blé tendre hexaploïde (*Triticum aestivum* spp *aestivum*). Ce génome comprend 21 chromosomes intégrant les trois génomes homéologues (A, B, D) des espèces ayant successivement formé la série d'allopolypléides du genre *Triticum*.

2.1.2 Développement du blé

Le terme blé est générique. En effet, au cours du temps, le blé s'est différencié en deux catégories : le blé tendre, *Triticum aestivum* et le blé dur, *Triticum durum*. Ces deux types de blé constituent aujourd'hui la grosse majorité de la production mondiale (*Catégorisation du blé* / Yara Belgique, 2018).

Ces deux types de blé se différencient par leur besoin d'une période de froid prolongée appelée vernalisation qui permet d'effectuer leurs transitions florales :

- Le blé dur est un blé de printemps qui ne nécessite pas de période de vernalisation. Il est semé au printemps plutôt dans des pays à hiver très rude (Bednarek, 2012).
- Le blé tendre est un blé d'hiver qui a besoin d'une période de froid entre 0 et 7°C, pendant 4 à 8 semaines. Il est semé à l'automne et caractérise les régions méditerranéennes et tempérées (Bednarek, 2012). En Belgique, selon le Livre Blanc des Céréales le plus récent (2021), les semis effectués entre le 15 octobre et le début du mois de novembre constituent le meilleur compromis entre le potentiel de rendement et les risques culturels (Godin et al., 2020). Dans nos conditions agro-climatiques belges, le blé d'hiver peut être semé de la première semaine d'octobre jusqu'à la fin décembre, voire même jusqu'en février. Toujours selon le Livre Blanc des Céréales le plus récent (2021), les semis effectués entre le 15 octobre et le début du mois de novembre constituent le meilleur compromis entre le potentiel de rendement et les risques culturels. Les semis tardifs (après le 15 novembre) sont plus difficiles à réussir (Godin et al., 2020). La période de récolte dépend des conditions climatiques de la saison de culture. En Belgique, le blé atteint sa maturité généralement en août. Les conditions climatiques de l'année 2020 ont fortement accéléré le développement et la maturation des céréales d'hiver ce qui explique la récolte hâtive à partir du 19 juillet (Godin et al., 2020). Il se caractérise par une forte teneur en protéines et en gluten, et par un albumen de texture plus ou moins dure (Yara Belgique, 2018).

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons travaillé avec le blé tendre (ou froment d'hiver), qui sera dénommé 'blé' dans la suite du document.

2.1.3 Importance économique du blé

Le blé et le riz sont les céréales les plus consommées mondialement car elles rentrent dans la composition de nombreux produits alimentaires tels que le pain, les pâtes, les pâtisseries, les nouilles, la semoule, le boulgour et le couscous (OECD et FAO, 2020). D'ailleurs, le blé représente un cinquième des apports caloriques dans l'alimentation humaine et c'est la première source de protéines végétales (OECD et FAO, 2020).

De ce fait, le blé est considéré comme une céréale d'importance économique mondiale majeure (OECD et FAO, 2020). Avec une production mondiale de 752 millions de tonnes en

2020, le blé est la 2^{ème} céréale la plus produite dans le monde derrière le maïs (OECD et FAO, 2020). La culture de blé représente 48% de la production céréalière européenne (SOCOPRO ASBL, 2019). La production de blé constitue la plus grande surface de culture vivrière dans le monde avec 14% et représente le produit alimentaire le plus échangé dans le monde (OECD et FAO, 2020). Les principaux producteurs sont l'Union Européenne, la Chine et l'Inde (OECD et FAO, 2020). La production céréalière mondiale et particulièrement celle du blé a régulièrement augmenté depuis un demi-siècle, pour atteindre en 2011-2012 trois fois plus que son niveau en 1960 (Jemmali, 2015).

La production mondiale de blé devrait atteindre 839 Mt à l'horizon 2029, avec un rythme de croissance plus modéré que lors de la décennie précédente (OECD et FAO, 2020). En effet, Les changements climatiques ont été identifiés comme l'un des facteurs contribuant à la stagnation des rendements de blé (Porter & Semenov, 2005). Les rendements de demain pourraient être affectés par des stress abiotiques et biotiques de plus en plus récurrents tels que des épidémies de maladies d'origines fongiques, bactériennes ou virales entre autres (Jemmali, 2015).

Malgré une diminution des superficies de plus de 10% en 2017 par rapport à 2016, le blé est la principale céréale cultivée en Région wallonne. La production concerne essentiellement le froment d'hiver. En effet, le blé de printemps représente moins de 1% de sa production totale. Malgré une production importante de froment, elle ne couvre même pas la moitié de la demande belge (SOCOPRO ASBL, 2019).

Dû à l'importance économique du blé, il est primordial d'appliquer des mesures de contrôle efficaces afin de limiter au maximum les pertes de rendement dues aux agents pathogènes (Yzerbyt, 2018), comme la septoriose du blé. En effet, la septoriose du blé, causée par *Zymoseptoria tritici*, est l'une des maladies les plus préoccupantes à ce jour car lors de sévères épidémies, les pertes de rendement peuvent s'élever jusqu'à 50% (Fones & Gurr, 2015). La septoriose se développe dans les principaux territoires cultivant le blé au sein de l'Union européenne (Fones & Gurr, 2015). Elle est la maladie la plus problématique en Wallonie (*Septoriose – Livre Blanc Céréales*, s. d.).

L'utilisation de cultivars résistants, le respect de bonnes pratiques agricoles et l'application de fongicides permettent de limiter les pertes entre 5 et 10% (Fones & Gurr, 2015). En effet, chaque année, environ 70% des fongicides utilisés par l'Union Européenne sont destinés à la protection du blé contre la septoriose (Fones & Gurr, 2015). La France, l'Allemagne et le Royaume-Uni dépensent à eux seuls plus d'un milliard d'euros pour lutter contre cette maladie (Torriani et al., 2015).

2.2. *Zymoseptoria tritici* (Téléomorphe : *Mycosphaerella graminicola*)

Tout au long de son cycle de développement, le blé est sujet à plusieurs maladies fongiques (ex : septoriose, fusariose, rouille) qui peuvent attaquer les différents organes du plant : les feuilles, racines et les épis. Les champignons phytopathogènes peuvent être des champignons biotrophes qui se développent aux dépens des tissus vivants ou alors des champignons nécrotrophes qui tuent les cellules végétales avant de les coloniser.

La septoriose du blé fait partie des maladies les plus nuisibles sur la culture. Elle est causée par un champignon hémibiotrophe combinant deux phases (biotrophe et nécrotrophe) (Mejri, 2018).

2.2.1 Taxonomie et biologie

L'appellation générique « septoriose du blé » peut être causée par 3 espèces de champignons différentes. Les trois champignons sont des ascomycètes de la famille des *Mycosphaerellaceae*, plus précisément du genre *Septoria* (Yzerbyt, 2018) :

- La première est la moins conséquente des trois maladies. Elle est causée par *Leptosphaeria avenaria* f. sp. *triticea* (anamorphe : *Septoria avenae* f. sp. *triticea*). Ce champignon se retrouve quasi exclusivement dans le nord des États-Unis et au Canada ce qui explique que l'impact est négligeable sur la scène internationale (Yzerbyt, 2018).
- La deuxième maladie est la « *Septoria glume blotch* » (SGB), causée par *Phaeosphaeria nodorum* / *Septoria nodorum*, dénommé *Parastagonospora nodorum*, qui attaque les feuilles mais aussi les épis et les grains du blé (Mejri, 2018).
- La troisième maladie est causée par le champignon ascomycète *Mycosphaerella graminicola* / *Septoria tritici*, récemment dénommé *Zymoseptoria tritici*. Celui-ci attaque uniquement les feuilles et cause une maladie appelée « *Septoria tritici blotch* » (STB). Cette maladie sera étudiée dans le cadre de ce mémoire.

S. nodorum était le champignon le plus fréquemment rencontré sur le blé jusqu'en 1985 mais ne se rencontre aujourd'hui que très sporadiquement dans les champs wallons (Livre Blanc des céréales, 2021). Les changements dans les cultivars et les pratiques culturales ainsi que l'évolution de la diversité génétique de *Z. tritici* expliquent aujourd'hui la prédominance de ce champignon.

Il est important de noter qu'en fonction des conditions environnementales et du stade d'infection du pathogène, ce champignon peut se retrouver sous deux formes distinctes. D'une part, une forme asexuée appelée *Z. tritici* (anamorphe) et d'autre part une forme sexuée connue sous le nom de *M. graminicola* (téléomorphe). Ces deux formes jouent un rôle différents dans l'épidémiologie de la maladie (Yzerbyt, 2018). Mais afin de simplifier la lecture

de ce rapport, les deux formes et nominations différentes du pathogène seront appelées *Z. tritici*.

2.2.2 Cycle de développement

Comme pour tous les autres ascomycètes, le cycle de *Z. tritici* peut être divisé en deux stades caractérisés par la production des spores de formes différentes : Les ascospores et les conidies (Figure 3) (Yzerbyt, 2018). Ces deux types de spore participent différemment à la survie et la prolifération du pathogène (Yzerbyt, 2018).

Lors du stade sexué, le champignon est sous sa forme dite « télémorphes ». Il produit des ascospores se trouvant dans des asques contenus dans des fructifications appelées pseudothèces. A maturité, chaque pseudothèce possède en moyenne 26 asques avec un nombre de 8 ascospores par asque (Figure 3C et 3D) (Yzerbyt, 2018).

Z. tritici est un champignon hétérothallique. Il possède un système de reproduction bipolaire qui dépend de mécanismes moléculaires qui régulent la compatibilité. La formation des ascospores nécessite la rencontre de deux souches de mating type opposées. Une souche de type MAT1-1 et une souche de type MAT1-2 (Yzerbyt, 2018). La reproduction sexuée et la diversité génétique élevée de ce champignon seraient à l'origine de l'apparition rapide de résistance à certains fongicides (Yzerbyt, 2018).

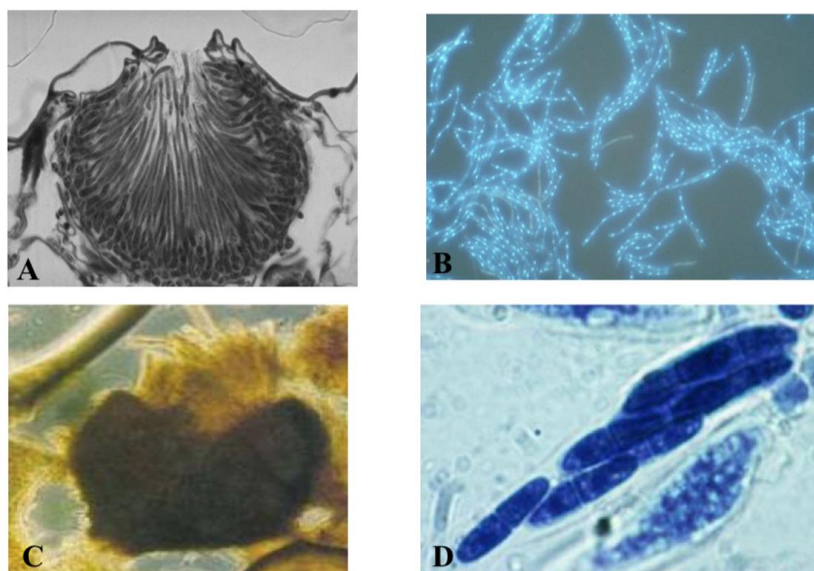


Figure 3. Biologie de *Zymosoptoria tritici*. A : Structure d'un pycnide de *Z. tritici* (Kema et al., 1996). B : pycnidiospores de *Z. tritici* (Kema et al., 1996) C : Pseudothèce de *Z. tritici* (Eyal, 1999). D : Détail d'un asque contenant les ascospores (Halama 1996).

Lors du stade asexué, *Z. tritici* se trouve sous sa forme dite « anamorphe » et produit des conidies ou pycnidiospores dans des fructifications asexuées appelées pycnides (Figure 3A et 3B). Leur production se fait via un système de cycles infectieux (Figure 4) successifs allant jusqu'à 6 cycles par saison dans certains cas. Une seule feuille pourrait porter 400 pycnides

et environ 300 pycnidiospores viables peuvent être produites dans une seule pycnide (Fones & Gurr, 2015).

Grâce à ses deux stades différents, *Z. tritici* adopte une double stratégie pour se développer. Tant que les conditions sont favorables, son mode de reproduction asexuée lui permet de produire un grand nombre de conidies. Cependant, cela permet uniquement une infection locale. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, ce champignon a la capacité de se reproduire de manière sexuée. Celle-ci lui permettra, d'une part, de survivre sur des débris de culture jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables ou d'autre part être transporté sur de plus longues distances en espérant trouver de meilleures conditions de développement. Il est indispensable de noter que la reproduction sexuée permet aussi au pathogène de se diversifier génétiquement et donc de mettre en place des mécanismes de résistance.

Ci-après, la figure 4 représente le cycle de la septoriose.

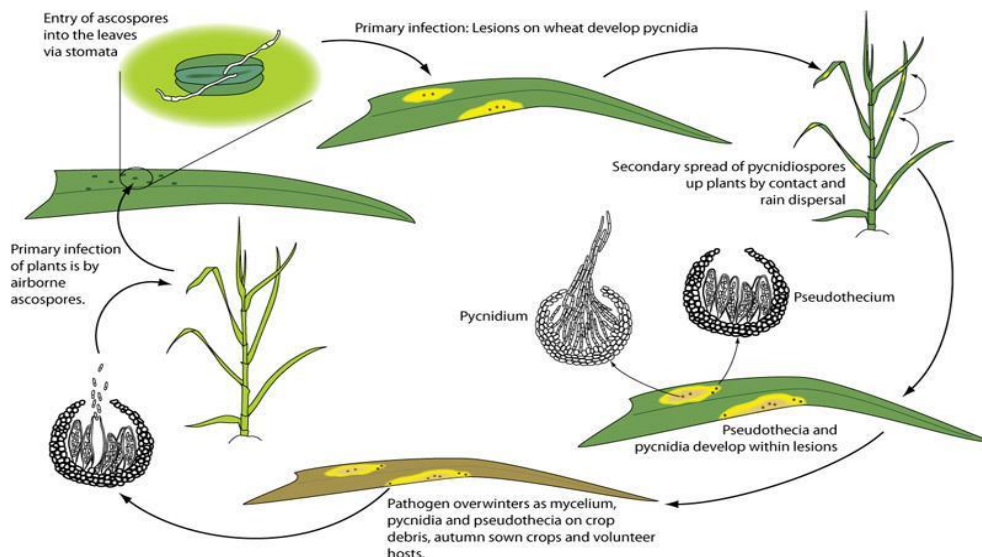


Figure 4. Cycle biologique de la septoriose causée par l'agent pathogène *Z. tritici* (Ponomarenko et al, 2011)

Lorsque les conditions d'humidité et de température sont idéales, notamment une humidité relative élevée et une température entre 10 à 25°C, l'infection primaire peut avoir lieu (Yzerbyt, 2018). C'est donc vers la fin de l'automne que les périthèces vont libérer des ascospores dans l'air et déclencher l'épidémie (Meurs, 2018). Lorsque l'ascospore rencontre une feuille, celle-ci va germer et produire un tube germinatif qui se termine par un appressorium. Cette structure permet au pathogène de pénétrer dans les tissus de la feuille via les stomates (Figure 5A). Ensuite, les hyphes se développent et colonisent rapidement les espaces intercellulaires entourant les stomates (Figure 5B) (Yzerbyt, 2018). Suite à la mort programmée des cellules végétatives, a lieu l'apparition de pré-pycnides qui se développent dans les cavités sous-stomatiques via la croissance intensive des hyphes et leurs fusions (Figure 5C) (Yzerbyt, 2018). Cette nécrose des tissus végétatifs est la cause des symptômes

classiques de la septoriose soit des taches noires et brunes sur la surface foliaire, facilement visibles à l'œil nu (Figure 5E). La maladie va continuer à progresser jusqu'à ce que l'entièreté de la feuille soit infectée.

Une infection secondaire a lieu tout le long de la saison culturale. En effet, au début du printemps, les pycnides arrivent à maturité dans les cavités sous-stomatiques. Celles-ci vont produire des conidies connues sous le nom de pycnidiospores (Yzerbyt, 2018). Les conidies vont être relâchées dans une matrice extracellulaire appelée cirrhe, lorsque les conditions environnementales seront appropriées (Figure 5D). Le cirrhe est primordial pour la dispersion de la maladie et l'adhésion des pycnidiospores sur toute la surface de la feuille grâce à ses propriétés hygroscopiques soit son affinité avec l'eau (Yzerbyt, 2018) (Larousse). Les conidies se propagent verticalement et horizontalement grâce aux éclaboussures (Meurs, 2018). En effet, les gouttelettes de pluie permettent de propulser l'inoculum depuis les feuilles inférieures vers les feuilles supérieures (transfert vertical). Mais, il peut également avoir un contact entre les feuilles infectées et des feuilles d'un plant adjacent (transport horizontal) (Yzerbyt, 2018).

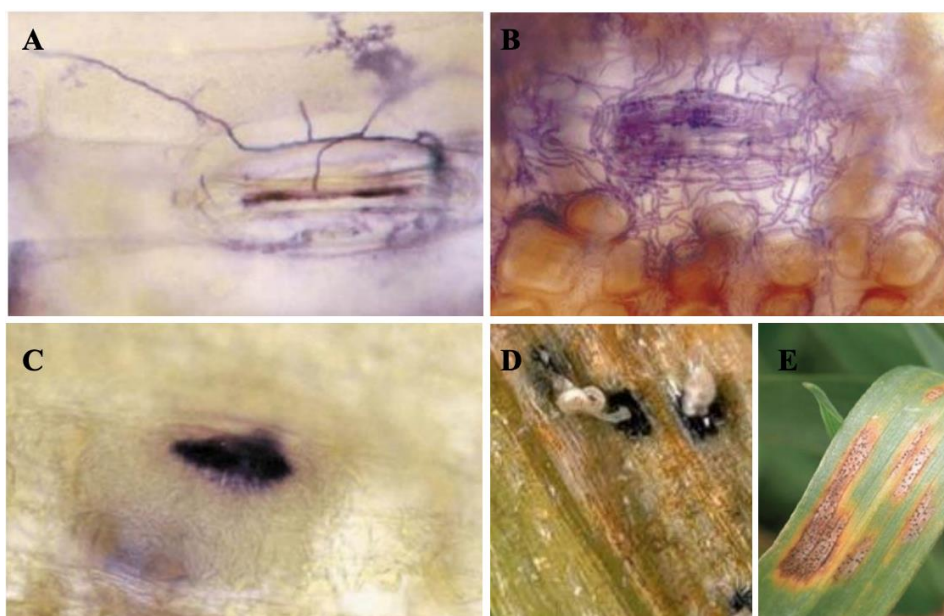


Figure 5. Différentes étapes du processus infectieux et symptômes de *Z. tritici*. A : Pénétration stomatique (Palmer & Skinner, 2002). B : Colonisation du mésophile (Palmer & Skinner, 2002). C : Ebauche d'une pycnide formée dans la cavité sous-stomatique (Palmer & Skinner, 2002). D : Cirrhes de *Z. tritici* (Vrancken et al., 2008). E : Tache produite par *Z. tritici* sur une feuille de blé et présentant des pycnides (Vrancken et al., 2008). Adaptée de (Jemmali, 2015).

Z. tritici est un champignon capable de passer l'hiver sur les débris de culture, sur les cultures semées en automne et sur les repousses sous forme de mycélium, de pycnides et sous forme de périthèces (CRA-W, s. d.).

2.2.3 Symptômes

Comme expliqué dans la partie taxonomie et biologie, contrairement à *S. nodorum* qui attaque les feuilles et les épis, les symptômes de la septoriose sont uniquement visibles sur les feuilles et plus rarement sur les tiges de la plante.

Après une contamination, les symptômes débutent par l'apparition de petites taches chlorotiques, oblongues (Yzerbyt, 2018). Les taches se formant sur le bord des limbes sont souvent irrégulières. Au milieu du limbe, les taches forment des motifs plus géométriques, étendues longitudinalement suite à la contrainte des nervures (Livre Blanc Céréales, 2021). Par la suite, l'aspect des symptômes de *Z. tritici* peut être assez diversifié et on peut différencier deux types de symptômes. Soit des taches blanches et allongées qui apparaissent généralement entre mai et juin sur les derniers étages foliaires des plantes et qui ne sont pas visibles chaque année. Soit des taches brunes, de forme ovales ou rectangulaires, éparses et souvent bordées d'un halo jaune (ARVALIS, 2013 ; Livre blanc des Céréales (2021) - Figure 5E). Ensuite, les symptômes évoluent et les taches se rejoignent pour former de grandes plages irrégulières entraînant la nécrose partielle ou totale de la feuille. A ce stade, les taches peuvent avoir un aspect gris clair et sont visibles sur les deux faces du limbe (Livre Blanc Céréales, 2021). Les nécroses sont accompagnées d'une formation de fructifications sexuées et/ou asexuées. Ces pseudothèces et/ou pycnides s'installent au niveau des chambres sous-stomatiques et paraissent comme de petits points noirs à la surface des feuilles (Yzerbyt, 2018). Il est possible d'observer les cirrhes avec une loupe de poche, à la rosée du matin (Livre Blanc Céréales, 2021). Les cirrhes et ces petits points noirs observables à l'œil nu permettent de différencier la septoriose du blé d'une autre maladie commune : l'helminthosporiose (Livre Blanc Céréales, 2021). Le champignon *Z. tritici* va continuer sa progression sur l'entièreté de la feuille et les multiples lésions vont fusionner jusqu'à la destruction complète de la feuille (Yzerbyt, 2018).

Les deux types de fructifications (pycnides et pseudothèces) semblent assez similaires à l'œil nu. Néanmoins, plusieurs caractéristiques observables au microscope permettent de faire la différence entre celles-ci. Les pseudothèces (Figure 6A) sont globuleux, de couleur noire et mesurent en moyenne 68-114 µm de diamètre. Ils contiennent des asques (30-40 x 11-14 µm), cellules reproductrices des ascomycètes, produisant chacun 8 ascospores (Figure 6B). Ces spores sexuées sont hyalines et elliptiques ainsi que caractérisées par une taille de 9-16 x 2.5- 4 µm. Chaque ascospore est constituée de 2 cellules de longueur inégale (Yzerbyt, 2018). Les pycnides (Figure 6C) issues de la forme asexuée sont globuleuses à oblongues, de couleur noire et mesurent en moyenne 80-200 µm de diamètre. Elles produisent des pycnidiospores pouvant être de deux sortes : soit des macropycnidiospores (35-98 x 1-3 µm) filiformes, hyalines et légèrement courbées possédant 2-7 septations (Figure 6D), soit des micropycnidiospores (5-10.5 x 0.3-1 µm) hyalines, courbées et unicellulaires. Les deux formes de conidies sont cependant également capables d'infecter le blé.

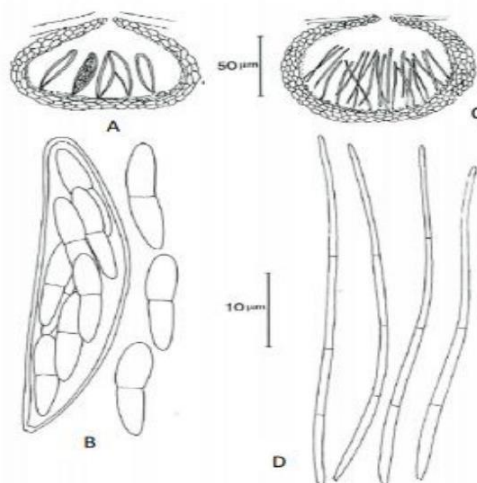


Figure 6. Les différentes structures de reproduction de l'agent pathogène *Z. tritici*. A gauche, la reproduction sexuée caractérisée par un pseudothèce (A), un asque et des ascospores (B). A droite, la reproduction asexuée caractérisée par une pycnide (C) contenant des pycnidiospores (D) (Morais, 2015).

2.2.4 Méthode de lutte

Les méthodes de lutte contre la septoriose sont principalement la variété de blé résistante ou plutôt tolérante puisqu'il n'existe pas de variété de blé complètement résistante à ce pathogène. Ceci est dû au mode de reproduction sexuée et donc au brassage génétique qui permet au champignon de s'adapter (Mejri, 2018).

Les principales variétés disponibles sont testées annuellement pour évaluer leur niveau de résistance à la septoriose. Les niveaux de résistance sont rapportés chaque année en septembre permettant aux agriculteurs de faire un choix approprié (Livre Blanc Céréales, 2021).

Une autre méthode de lutte non-négligeable réside dans les pratiques culturales :

- Couplés à l'utilisation des variétés résistantes, le labour et la rotation des cultures peuvent participer à la réduction de l'inoculum primaire (Livre Blanc Céréales, 2021).
- Le semis plus tardif peut-être utilisé pour que le cycle du pathogène ne coïncide plus à celui de l'hôte. Cela résulte souvent d'une moins bonne implantation de la maladie dans la culture avant l'hiver et donc une progression plus lente de l'épidémie au début du printemps (Livre Blanc Céréales, 2021).

Cependant, malgré l'impact positif du choix de cultivars de blé résistants et de bonnes pratiques agricoles, la lutte contre *Z. tritici* repose essentiellement sur l'utilisation massive des fongicides chimiques (Mejri, 2018).

Selon Mejri, dans le contexte où les préoccupations concernant les effets potentiels des pesticides chimiques sur la santé humaine et l'environnement augmentent, plusieurs pays adaptent leurs politiques quant à l'utilisation de ces produits (Mejri, 2018).

En Europe, la Directive 2009/128/EC a pour but de rendre l'utilisation des pesticides durable dans l'UE en réduisant les risques et les impacts de l'utilisation des pesticides sur la santé humaine et l'environnement et en promouvant l'utilisation de la lutte intégrée contre les ravageurs et des approches ou techniques alternatives, telles que les alternatives non chimiques aux pesticides (Commission européenne, 2009).

En Belgique, le programme 2018-2022 du Nationaal Actie – Plan d'Action National (NAPAN) comprend 176 actions visant globalement à réduire le risque lié à la protection des plantes au moyen de produits phytopharmaceutiques (NAPAN, 2018).

Les politiques européennes actuelles encouragent donc une lutte intégrée combinant divers facteurs alternatifs aux fongicides (Mejri, 2018). Des méthodes de lutte biologique se développent, telles que l'utilisation de micro-organismes bénéfiques, que sont les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) et les bactéries, notamment les plant growth promoting bacteria (PGPR).

2.3. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Dans la nature, les racines de la majorité des plantes vasculaires terrestres sont colonisées par des champignons symbiotiques pour former des mycorhizes (Brundrett & Tedersoo, 2018). Cette symbiose, soit une association à bénéfice réciproque entre un champignon du sol et une plante, joue un rôle clé dans le maintien de la productivité des plantes dans leur habitat naturel et agricole et pour de nombreux groupes taxonomiques fongiques, elle représente la principale source d'énergie (Brundrett & Tedersoo, 2018).

Selon des critères morphologiques des tissus racinaires et des lignées des plantes hôtes, les mycorhizes peuvent être divisées en quatre types: les ectomycorhizes, les mycorhizes éricoïdes, les mycorhizes à orchidées et les mycorhizes à arbuscules (MA) (Figure 7) (Brundrett & Tedersoo, 2018).

L'association MA existent depuis 400 millions d'années (Strullu-Derrien et al., 2018) et est majoritaire, il est en effet estimé que près de 72% des espèces végétales, dont la grande majorité des espèces agricoles et horticoles d'importance, forment des associations avec ces champignons du phylum des Glomeromycota (Redon, 2009; Miransari, 2011; Brundrett & Tedersoo, 2018).

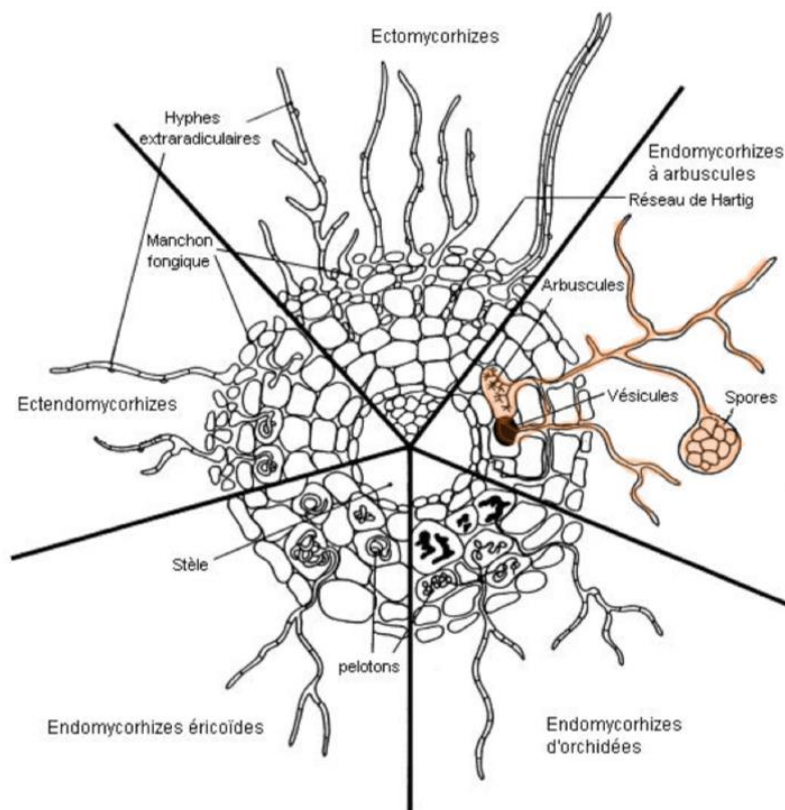


Figure 7. Les différents types d'associations mycorhiziennes d'après (Selosse & Le tacon, 1998)

L'association symbiotique entre les CMA et les plantes est dite mutualiste, c'est à-dire que les deux partenaires tirent profit de l'interaction (Bago et al., 2002). Les CMA (biotrophes obligatoires) reçoivent de la plante des éléments carbonés issus de la photosynthèse en échange d'une amélioration de la nutrition hydrique et des minéraux comme le phosphore et l'azote (Bago et al., 2002).

2.3.1 Cycle de développement et établissement de la symbiose

Les CMA, suite à leur coévolution avec les plantes hôtes, sont incapables de survivre sans celles-ci. En effet, ce sont des symbiontes biotrophes obligatoires (Redon, 2009).

Le cycle de développement des CMA (Figure 8) est composé de deux phase : la phase asymbiotique ou pré-symbiotique et la phase symbiotique. La première comprend la germination de la spore et sa ramification en hyphes germinatifs jusqu'au contact avec la racine et la seconde comprend la colonisation des racines de l'hôte.

Les CMA doivent compléter leur cycle de vie pour pouvoir produire des spores, structures essentielles à leur reproduction (Giovannini et al., 2020).

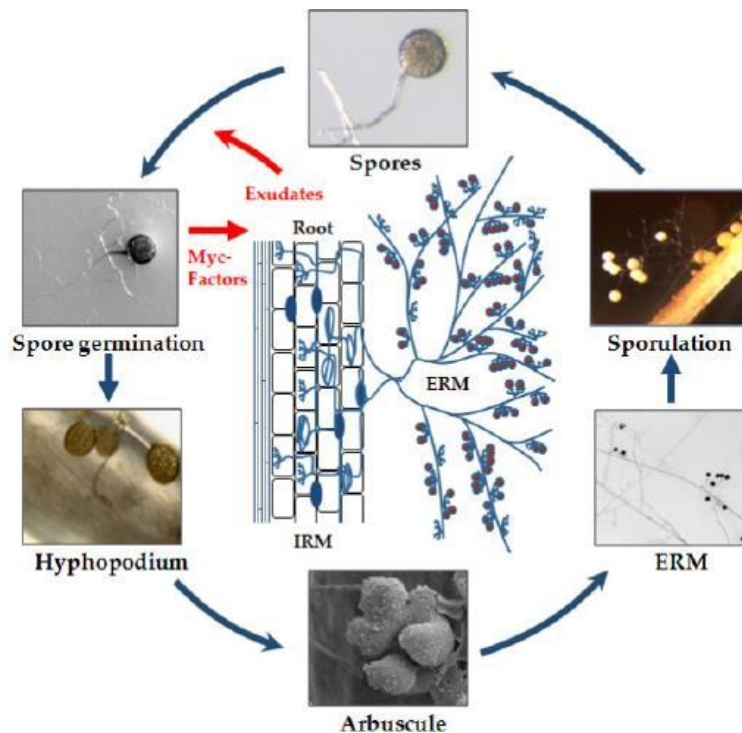


Figure 8. Cycle de vie d'un champignon mycorhizien à arbuscules. ERM : Réseau mycorhizien extra-racinaire. IRM : Réseau mycélien intra-racinaire d'après Bucking et al., 2012

Phase asymbiotique

Lors de la phase asymbiotique (Figure 8), le champignon germe et forme quelques ramifications appelé hyphes germinatives sans l'aide ou la présence du partenaire végétal (Savy, 2007). La germination est affectée par :

- Les conditions physico-chimiques du sol: la concentration en CO₂, le pH, la température, la concentration en nutriments.
- Les microorganismes présents dans l'environnement. (Giovannini et al., 2020)

Les spores des CMA peuvent entrer en dormance si l'hyphe germinatif ne rencontre pas de racine après 2 à 4 semaines de croissance, après rétractation du protoplasme et réallocation des ressources en attendant de meilleures conditions pour une nouvelle germination (Mosse, 1959; Koske, 1981; Giovannetti et al., 2010)

Phase pré-symbiotique

Ensuite commence la phase pré-symbiotique, où a lieu un dialogue chimique diffus dans le sol entre le champignon et la racine compatible qui leur permet de se rencontrer (Redon, 2009).

Lorsque des exsudats racinaires appelés « branching factor » de la plante hôte sont perçus, les hyphes germinatifs vont se ramifier à partir des réserves lipidiques et de glycogène (Redon,

2009). Une strigolactone et les flavonoïdes ont été isolés et identifiés par Akiyama et al. (2005) comme étant les composés induisant la ramification de l'hyphe germinatif issu de la spore. Des signaux émis par le CMA sont également indispensables pour établir une symbiose. Les CMA produisent des molécules diffuses qui leur permettent d'être reconnus par les plantes et que l'on appelle les « *Myc factors* » (Paszkowski, 2006 ; Bonfante & Requena, 2011) reconnu par les racines des plantes et qui vont induire chez celles-ci des modifications (Oláh et al., 2005; Mukherjee & Ané, 2011; Gutjahr et al., 2009). A la fin de la phase présymbiotique, a lieu la formation des appressoria, des structures d'ancrage. Celle-ci n'est pas déclenché par des signaux chimiques mais est établie une fois qu'il y a un contact entre le CMA et la plante. En effet, la seule présence physique de cellules épidermiques suffit à la formation d'appressoria (Redon, 2009).

Phase symbiotique

Suite à la formation de l'appressorium à la surface de l'épiderme, la plante met en place un appareil de pré-pénétration (PPA) pour guider le développement du champignon à travers les différentes couches de cellules jusqu'aux cellules du cortex interne où sont mis en place les arbuscules et où ont lieu les échanges (Figure 9) (Savy, 2007).

Lors de la phase symbiotique (Figure 8), les premières structures formées, sont les hyphes intra-racinaires du CMA dans le cortex racinaire sur lequel se forment ensuite des arbuscules intracellulaires et des vésicules (chez certains genres). (Bonfante & Genre, 2010).

L'arbuscule n'est pas en contact direct avec le cytoplasme de la cellule végétale. La structure fongique est enveloppée par une membrane végétale appelée la membrane péri-arbusculaire (Bonfante-Fasolo, 1984; Alexander et al., 1989; Smith & Smith, 1990; Pumplin & Harrison, 2009). L'arbuscule permet donc d'augmenter la surface de contact entre la plante et le champignon. Cette interface est primordiale car c'est à ce niveau qu'ont lieu les échanges des nutriments entre les symbiotes (Redon, 2009).Après quelques jours, les arbuscules dégénèrent peut-être pour limiter l'extension du CMA dans les racines mais ce phénomène est encore mal connu (Strack et al., 2003; Genre et al., 2005; Walter et al., 2007).

Certains CMA forment également des structures de stockage intercellulaires, riches en lipides de réserve, les vésicules. Ces structures peuvent se retrouver à l'intérieur des cellules racinaires ou entre les cellules et peuvent constituer des propagules capables de coloniser une autre plante (Biermann & Linderman, 1983; F. A. Smith & Smith, 1997; Declerck et al., 1998). Enfin, lors de la phase symbiotique, il y a également le développement d'un réseau dense mycorhizien extra-racinaire dans le sol sur lequel une nouvelle génération de spores est formée (Savy, 2007). Des structures ramifiées d'absorption vont permettre l'absorption des nutriments dans le sol pour les transférer à la plante hôte (Savy, 2007).

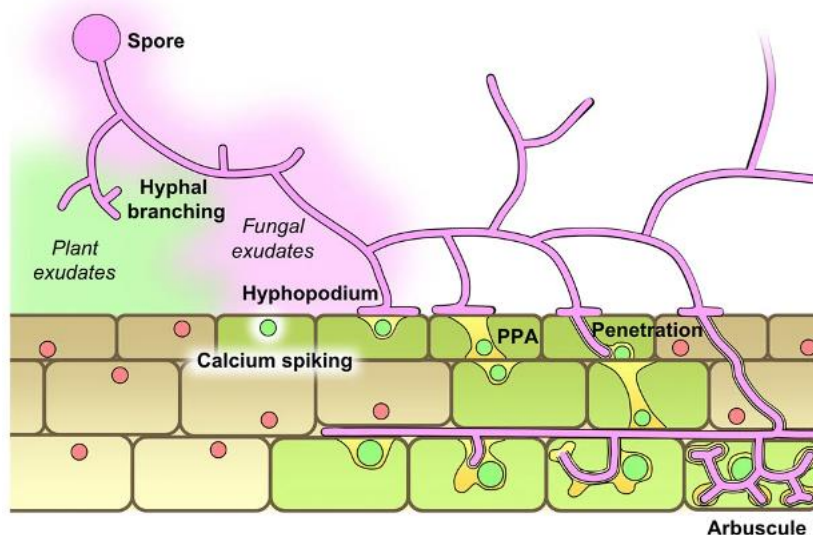


Figure 9. Schéma des différentes étapes de colonisation des CMA (adapté d'après Bonfante & Genre 2010) repris de (NDONDA, 2018)

Sans hôte, le champignon ne peut pas se développer et compléter son cycle de vie mais les spores peuvent se remettre en dormance après rétractation du protoplasme et réallocation des ressources en attendant de meilleures conditions (Redon, 2009).

2.3.2 Bénéfices de la symbiose

L'utilisation des CMA pour stimuler la croissance des plantes est intéressante dans un contexte où il est nécessaire de réduire l'utilisation des engrais et des produits phytosanitaires de synthèse. En effet, ils sont de plus en plus considérés dans les pratiques agricoles, notamment, pour leurs bénéfices apportés aux cultures (Smith et Read, 2008).

En effet, l'interaction mycorhizienne se caractérise par un transfert bi-directionnel de nutriments qui va agir comme un régulateur de la symbiose pour éviter de tendre vers une relation dite « parasite ». Les CMA améliorent la nutrition hydrique et minérale de la plante, notamment en phosphore (P) et en azote (N), en échange de ressources carbonées fournies par la plante (Smith et Read, 2008).

L'association MA permet également à la plante une meilleure protection/tolérance contre l'attaque de pathogènes mais également contre les stress abiotiques, comme détaillé ci-après.

Approvisionnement en éléments carbonés pour le CMA

La plante dérive une partie des éléments carbonés issus de la photosynthèse sous forme d'hexose et de lipides, qui pourront être transférés au CMA (Bago et al., 2003). L'interaction représente donc un coût pour le partenaire végétal. La part de photosynthétats transférée au champignon est non négligeable puisqu'elle peut atteindre jusqu'à 20 % du carbone fixé lors

de la photosynthèse (Duponnois et al., 2013). Il peut alors être estimé qu'environ 5 milliards de tonnes de carbone soient mobilisées et séquestrées par les CMA chaque année (Bago et al., 2002). Ces éléments carbonés sont assimilés par le champignon sous forme d'hexose et de lipides, puis métabolisés en composés indispensables pour son bon développement, tels que des protéines, lipides et glucides (Shachar-Hill et al., 1995; Pfeffer et al., 1999; Bago et al., 2002). En retour, le champignon va apporter de multiples bénéfices à la plante détaillés ci-dessous.

Amélioration de la nutrition minérale et hydrique des plantes

Le rôle majeur des CMA est l'amélioration de la nutrition hydrique et minérale de la plante. En effet, la plupart des études démontrent un accroissement de la biomasse des plantes mycorhizées attribué à une amélioration de la nutrition minérale, notamment phosphatée qui sera détaillé au point 2.3.3. Transport du P des CMA à la plante (Mustafa, 2015).

Ceci est lié à différents mécanismes. Premièrement, l'élongation des hyphes extra-racinaires permet une augmentation de la surface d'absorption entre les minéraux du sol et la racine. Il est estimé que la longueur des hyphes peut atteindre 81 à 111 m par cm³ de sol (Miller et al., 1995). De plus, ils peuvent explorer des zones non accessibles pour les plantes non-mycorhizées car les hyphes sont plus fins que les racines et les poils absorbants des plantes. Cela permet au champignon de prélever de l'eau et des nutriments dans des niches et de les transférer à la plante hôte (Smith and Read, 2008)

L'amélioration de la nutrition des plantes concerne les éléments suivants :

- Le phosphore (les détails sur le transport de P du CMA à la plante sont détaillés ci-après)
- L'azote est également un composant vital pour le CMA et la plante. Il entre dans la formation des phospholipides, des coenzymes et des acides aminés. L'azote est présent sous deux formes dans le sol: organique et minérale (nitrites, nitrates et ions ammonium). Cependant, le CMA est capable de prélever l'azote préférentiellement sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) (Mustafa, 2015).
- Les oligo-éléments sont quant à eux impliqués dans de nombreuses activités enzymatiques intervenant notamment dans la photosynthèse, la respiration oxydative, la protection contre les radicaux libres ou encore la biosynthèse des lipides (Mustafa, 2015). Un bénéfice du CMA dans la nutrition en oligoéléments, comme le fer, le cuivre ou encore le manganèse a été mis en évidence par Liu et al. (2000).

Amélioration de la structure du sol

Les CMA améliorent la stabilité du sol via la production de glomaline, une protéine qui permet une macro agrégation des constituants du sol et donc une augmentation de sa stabilité ainsi qu'une meilleure rétention de l'eau et des nutriments (Wright & Upadhyaya, 1998). Limiter l'érosion et donc la perte de nutriments et de la matière organique par lixiviation permet une augmentation de productivité en agriculture et permet d'éviter la fragilisation des écosystèmes (Wright & Upadhyaya, 1998).

Protection contre les stress abiotiques

De nombreux travaux ont décrit l'amélioration de la nutrition minérale des plantes qui permet un meilleur développement et dès lors une meilleure résilience face aux stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité, ou encore la pollution.

La tolérance des plantes mycorhizées à ces différents stress abiotiques serait attribuée à un ensemble de processus physiologiques dont :

- Une amélioration de la réponse à l'induction d'un stress oxydant.
Des molécules tels que la proline, la bêtaïne et les glucides solubles sont connues pour protéger les structures subcellulaires, pour maintenir les activités enzymatiques et limiter les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres en condition de stress (Plouznikoff et al., 2016). Il a été montré que lors d'un stress abiotique, comme l'abondance de métaux, les gènes actifs pour ces composés antioxydants sont stimulés par la symbiose (Hildebrandt et al., 2007).
- Une amélioration du statut hydrique.
En effet, la symbiose avec les CMA permet à la plante hôte de lutter contre la sécheresse indirectement en affectant le taux de rétention d'eau dans le sol *via* l'effet de la glomaline (Wu et al., 2008). De plus, le mycélium permet d'explorer un volume de sol beaucoup plus important que les racines et donc permet donc un bon maintien de l'équilibre hydrique et minéral de la plante (Ruiz-Lozano et al., 1995).
Ceci améliore la photosynthèse, la conductivité hydraulique et la régulation des niveaux de l'acide abscissique et par conséquent un meilleur taux de transpiration. La croissance et le développement de la plante sont donc favorisés (Sánchez-Blanco et al., 2004; Aroca et al., 2007; Aroca et al., 2008).
- La compensation de la réduction de la photosynthèse.
Plusieurs études ont montré une amélioration au niveau de la chlorophylle des plantes mycorhizées comparé aux plantes non mycorhizées, lorsque la plante hôte est soumise à un stress salin ou un stress de température (Evelin et al., 2009).
- Le maintien de l'intégrité des cellules racinaires.

Les racines mycorhizées doivent moins se développer grâce à l'extension fournie par le réseau d'hyphes extracellulaires. De plus, les cellules racinaires colonisées par le CMA produisent moins de métabolites associés aux stress. Le coût métabolique associé au stress abiotique est donc moindre (Lucini et al., 2017).

Dans un environnement soumis à de nombreux stress abiotiques, les symbioses avec des CMA permettent à la plante de compenser des pertes potentielles, améliorant ainsi leur rendement dans un environnement sous contraintes.

Les CMA pourraient donc être un potentiel outil pour mettre en place des systèmes agricoles adaptés aux climats futurs.

Protection contre les pathogènes

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser les CMA comme agents de biocontrôle contre les agents phytopathogènes. En effet, les plantes mycorhizées sont plus résistantes à plusieurs agents pathogènes racinaires et quelques agents pathogènes foliaires (Mustafa, 2015).

Parmi les mécanismes fréquemment rapportés, on trouve :

- La meilleure nutrition. Elle permet à la plante de croître et de compenser les effets induits par le pathogène (Dalpé, 2005 ; Gosling et al., 2006 ; Harrier & Watson, 2004).
- La compétition. En effet, il existe une compétition directe entre les pathogènes racinaires et les CMA liée à la disponibilité des nutriments, notamment des photosynthétats et des sites d'infection sur la racine (Dalpé, 2005 ; Gosling et al., 2006 ; Harrier & Watson, 2004).
- Modifications morphologiques et architecturales des racinaires. Les racines de plantes colonisées par des CMA sont plus ramifiées, plus épaisses, et leur poids est plus faible (Dalpé, 2005 ; Tawaraya, 2003). Cette structure spécifique des racines va permettre de freiner la dynamique infectieuse du pathogène, bien que la preuve d'une corrélation ne soit pas toujours mise en évidence à ce jour (Mustafa, 2015).
- Modification de la microflore et de l'augmentation du taux de matières organiques dans les sols. Ceci va mener à une modification des exsudats racinaires produits par la plante. Cette différence entre les concentrations et la composition en acides aminés produits par les racines de plantes mycorhizées va stimuler la synthèse de composés produits par la microflore ayant une activité antagoniste vis-à-vis de certains pathogènes racinaires (Barea et al., 2005; Dalpé, 2005; Harrier & Watson, 2004; M. Pozo et al., 2009; Wehner et al., 2010).
- L'induction de certains mécanismes de défense des plantes.

En effet, les plantes mycorhizées ont la capacité d'accumuler des phénols, des espèces réactives oxydatives, des phytoalexines. L'association d'une plante avec un CMA permet également la production d'enzymes qui ont un effet inhibiteur sur le développement des pathogènes comme les chitosanases, chitinases ou encore les peroxydases (El Ouakfaoui & Asselin, 1992 ; Garmendia et al., 2006 ; Somashekar & Joseph, 1996 ; M. J. Pozo et al., 2002).

Enfin, les CMA permettent à la plante de se protéger en accumulant des protéines de défense, notamment des protéines PR (*Pathogenesis Related*) et en sollicitant les voies de signalisation de l'acide jasmonique, de l'éthylène et l'acide salicylique (Van Wees et al., 2008).

- Compensation des dommages dus aux pathogènes. Les dommages causés par le pathogène peuvent être en partie contrebalancés par l'amélioration du statut nutritif et hydrique de la plante (Azcón-Aguilar & Barea, 1997 ; Harrier & Watson, 2004).

2.3.3 Transport du P des CMA à la plante

2.3.3.1 *Le phosphore dans l'environnement et son importance*

Les concentrations totales de P dans les sols varient de 101 à 103 g/kg de sol, en fonction de l'horizon du sol, du substrat, de l'âge du sol, de l'utilisation des terres et de l'intensité de l'utilisation des terres (Kruse et al., 2015).

Il est réparti dans 5 pools différents (Kruse et al., 2015):

- Dans la solution du sol
- Absorbé aux minéraux de la phase solide du sol
- Précipité sous formes minérales
- Dans la matière organique inerte
- Dans les microorganismes

Le P dans le sol se trouve sous forme organique (Po) et inorganique (Pi) sous différentes formes chimiques. Le Pi, est principalement retrouvé sous forme d'orthophosphates liés aux cations présents dans le sol pour former des complexes comme le phosphate de calcium (CaPO_4), le phosphate de fer (FePO_4) et le phosphate d'aluminium (AlPO_4). Tandis que le Po est principalement sous forme d'acide phytique (50% du Po dans le sol) (Grant et al., 2005; Javot et al., 2007).

Le P est peu mobile dans le sol, seule une faible proportion du P dans le sol est disponible pour les plantes. Or le P est un élément indispensable à la vie de la plante (Javot et al., 2007). En effet, il joue un rôle important dans de nombreux processus biochimiques comme la glycolyse, la respiration, la synthèse d'acide gras et la photosynthèse. Ce composé entre dans

la synthèse de nombreuses molécules telles que l'adénosine triphosphate (ATP), des constituants des acides nucléiques (ADN, ARN) ; des phospholipides ; certaines enzymes et co-enzymes (Gaude et al., 2008; Maartensson & Carlgren, 1994; Maathuis, 2009).

L'absorption du P est donc un problème majeur pour les plantes car celles-ci en ont besoin en grande quantité mais ont des difficultés pour l'acquérir (Javot et al., 2007; Richardson et al., 2009; S. Smith et al., 2011)

À l'échelle mondiale, les gisements de phosphate se composent de réserves qui sont actuellement exploitables et de ressources pour lesquelles les techniques d'exploitation doivent encore progresser afin d'avoir un intérêt économique (Syers et al., 2008). Les réserves et les ressources ont toutes deux une durée de vie limitée (Syers et al., 2008) ; il est donc primordial de rester attentif aux questions de sécurité d'approvisionnement. Selon la FAO, la demande mondiale d'engrais indique que leur utilisation va ne faire qu'augmenter. En effet, la quantité de phosphate utilisé comme élément fertilisant devrait passer de 43,8 millions de tonnes par an en 2015 à 52,9 millions de tonnes en 2030 (Tenkorang et Lowenberg-DeBoer, 2008) Il est donc essentiel de trouver des moyens alternatifs pour une production agricole avec moins de demande en intrants et une meilleure efficacité d'utilisation.

2.3.3.2 L'absorption du P par les plantes

Le phosphore est prélevé sous forme de phosphate inorganique (Pi) généralement sous forme d'anions H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} par les plantes (Javot et al., 2007). Cependant, la phase solide du sol forme très lentement ce Pi et celui-ci se diffuse donc très faiblement dans le sol. Le pool de P minéral est donc limité et sous l'action du prélèvement racinaire, des zones d'appauvrissement se créent rapidement autour des racines (Redon, 2009).

Les plantes doivent donc élaborer diverses stratégies pour s'affranchir de ce problème. Une solution pour la plante est d'augmenter l'interface racines/sol afin d'accéder à une plus grande quantité de P directement disponible (Bates et Lynch, 2006). Une autre stratégie est de solubiliser le Pi encapsulé dans les complexes formés avec des cations en sécrétant des acides organiques comme le malate, le citrate, ou des enzymes comme les phosphatases et phytases pour minéraliser le phosphore des composés organiques (Javot et al., 2007).

En plus de ces deux stratégies, l'association symbiotique entre la plante et un CMA permettrait d'augmenter l'acquisition de P (Javot et al., 2007).

2.3.3.3 Impact des CMA sur l'absorption du P

Le P étant peu mobile dans le sol et peu disponible pour les plantes, la présence du champignon est donc essentielle. Tout d'abord, le développement d'un réseau d'hyphes extra-racinaires permet d'explorer plus amplement le sol au-delà de la zone de déplétion racinaire, donnant ainsi accès au P pour la plante (Javot et al., 2007; Koide & Kabir, 2000). De

plus, le diamètre des hyphes est de 2-4 μm et celle des poils racinaires est de 10 μm , ce qui permet aux hyphes d'explorer des zones du sol où les pores du sol sont trop petits pour les racines (Grant et al., 2005). Les CMA sont également capable d'acidifier la rhizosphère pour y libérer le P surtout dans les sols neutres ou calcaires. Dans le cas des sols acides où le P est principalement lié au Fe ou Al, l'excrétion d'agents chélateurs comme l'acide citrique ou des sidérophores peut augmenter la disponibilité de P du sol (Grant et al., 2005).

Le P mobilisé par les CMA ont ensuite trois utilisations possibles : une partie est utilisée par le champignon directement, une autre partie est cédée à la plante via l'interface arbusculaire, et le reste est stocké dans les vacuoles du CMA sous forme de polyphosphates (Gavériaux, 2012).

La voie mycorhizienne pourrait être essentielle à la survie de certaines plantes ne possédant pas de poils absorbants et dont l'absorption de nutriments serait difficile. La majorité des études ont montré une meilleure nutrition phosphatée chez les plantes mycorhizées par rapport à celles non-colonisées (Doherty et al., 2008; Calonne-Salmon et al., 2018; Pioufle et al., 2019). Smith et al. (2003), ont montré que l'absorption du phosphore diffèrent en fonction de la plante hôte et la souche de CMA utilisée. En effet, certaines plantes reçoivent leurs P exclusivement par la voie mycorhizienne, mais pour des plantes comme la tomate inoculée par *Claroideoglomus caledonium*, 70% a été absorbé par la voie mycorhizienne. Il est également intéressant de noter que, bien que des plantes comme le maïs ayant reçu environ 40% du P de *Gigaspora rosea*, elles peuvent montrer une dépression de croissance par rapport aux contrôles non-mycorhizés.

Chez le blé de printemps (variété Brookton) colonisé par *Rhizophagus irregularis* DAOM 181602, Li et al. (2006) ont montré que la colonisation n'induisait pas de meilleure croissance ni une meilleure absorption de P_i , après 36 jours de croissance, soit lors des premiers stades de croissance. La contribution du CMA dans la nutrition phosphatée du blé dépassait cependant 50%. Néanmoins, cette dépression de croissance semble s'atténuer lors des stades de croissance suivants jusqu'à maturité (Li et al., 2005). Cela peut être expliqué par le fait que certaines souches de CMA nécessitent des quantités relativement élevées de C organique de la part des plantes (Smith et al., 2003).

2.3.3.4 Impact du P sur les CMA

La concentration de P dans le sol et dans la plante a un impact sur les CMA ; il est donc important d'en tenir compte lors de l'utilisation de fertilisants. En effet, une sur-fertilisation en P induit une diminution de la colonisation racinaire par les CMA (Grant et al., 2005). De plus, selon Maartensson et Carlgren (1994), même un apport modéré de fertilisant phosphaté de 45 kg de P minéral/ha/an sur une période de 5 ans, réduit le nombre de spores de 50%. Cette diminution de colonisation des racines et production de spores peuvent potentiellement être expliquées par une hypothèse formulée par Javot et al. (2007). Cette

hypothèse stipule qu'une fois qu'une certaine quantité de P est présente dans le sol ou dans les tissus, le transfert du carbone vers le CMA sera interrompu.

Au contraire, une carence en P peut stimuler les activités phosphatases excrétées par les CMA (Mousain et al., 1994) et donc potentiellement la nutrition phosphatée de la plante hôte.

2.4. Les bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

2.4.1 Taxonomie et biologie des PGPR

La rhizosphère est la région étroite du sol directement formée et influencée par le système racinaire et les micro-organismes associés (Beneduzi et al., 2012). Cette zone est riche en nutriments grâce à la production de différents types d'exsudats végétaux, tels que des acides aminés et des glucides qui fournissent une importante source d'énergie et de nutriments pour les bactéries (Beneduzi et al., 2012). La rhizosphère est donc peuplée par une population diverse de micro-organismes et les bactéries qui colonisent cet habitat sont appelées rhizobactéries (Schroth & Hancock, 1982).

Ces bactéries peuvent favoriser la croissance des plantes et augmenter leur résistance aux stress. Celles-ci sont communément appelées PGPR pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Les bactéries qui sont considérées comme des PGPR peuvent appartenir à plusieurs genres, dont le genre *Bacillus*. Les bactéries promotrices de croissance végétale appartenant au genre *Bacillus* sont les plus étudiées (Ongena & Jacques, 2008) et l'une d'entre elles sera étudiée dans le cadre de ce mémoire.

2.4.2 Création du Biofilm

Initialement, les bactéries se trouvent dans un état planctonique, motile ou non et la formation d'un biofilm va débuter lorsque celles-ci passent à un état sédentaire et que, au moins, une cellule adhère à une surface (Monds & O'Toole, 2009; Jefferson, 2004) (Figure 10). Ce passage d'un mode de vie mobile à sédentaire est régulé grâce à des mécano-senseurs qui permettent de détecter la présence de surface (Gode-Potratz et al., 2011). Suite à cette fixation, les bactéries se différencient et commencent à produire la matrice extracellulaire composée de substances polymères extracellulaires gluantes : des exopolysaccharides, et à coloniser la surface. En effet, elles vont former de longues chaînes de cellules non mobiles qui adhèrent les unes aux autres, et à la surface, en sécrétant une matrice extracellulaire indispensable pour assurer la cohésion des bactéries au sein du biofilm (Vlamakis et al., 2013; Sutherland, 2001) (Figure 10). La matrice extracellulaire du biofilm permet aux bactéries de résister à une grande variété d'agressions extérieures physiques ou chimiques, y compris les traitements antibiotiques (Cairns et al., 2014 ; Lopez et al., 2010; Mielich-Süss & Lopez, 2015;

Vlamakis et al., 2013). Ensuite, le biofilm va croître, se développer, protéger la communauté qui s'agrandit et lorsque il atteint maturité et lorsque les conditions ne sont plus propices à la survie de la cellule, les bactéries vont sporuler (Cairns et al., 2014 ; Lopez et al., 2010; Mielich-Süss & Lopez, 2015; Vlamakis et al., 2013). Finalement, Le biofilm va se disperser, ce qui permet la dispersion de la communauté bactérienne (Figure 10).

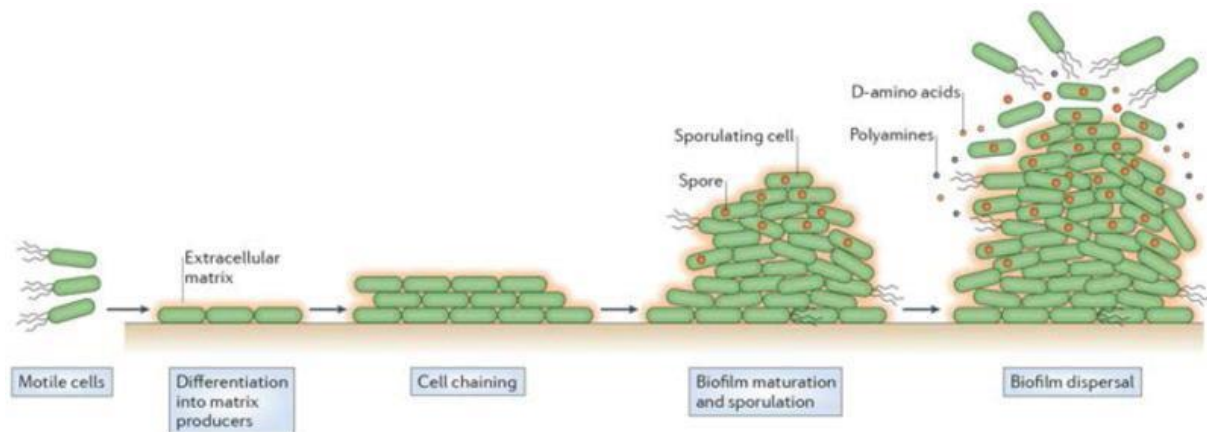


Figure 10. Processus de formation de biofilm par *B. subtilis* (Vlamakis et al. 2013)

2.4.3 Bénéfices des PGPR pour les plantes

Les PGPR apportent à la plante des bénéfices à deux niveaux :

- Directement en fournissant à la plante un composé synthétisé (ex : enzymes antioxydantes) par la bactérie ou en facilitant l'absorption de certains nutriments de l'environnement (Beneduzi et al., 2012).
- Indirectement grâce à la production des substances antagonistes ou en induisant une résistance ce qui permet de diminuer ou même prévenir les effets délétères d'un ou plusieurs organismes phytopathogènes (Beneduzi et al., 2012).

Ainsi il peut être considéré que les PGPR sont très prometteuses pour l'agriculture durable, notamment pour la culture du froment et peuvent être exploitées commercialement (Beneduzi et al., 2012).

Les composés synthétisés par la bactérie permettent également de lutter contre les stress abiotiques. En effet, les PGPR permettent aux plantes de mieux résister/tolérer les conséquences de stress climatiques grâce à :

- La réduction de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Artursson et al., 2006).
- L'augmentation de la production d'enzymes antioxydants permettant une meilleure tolérance aux ERO (Kasim et al., 2012).

- La réduction de la production de 'heat shock proteins' (HSP) soit des protéines produites lors de certains stress, notamment lors des températures élevées. Cela montre une meilleure adaptation aux stress thermiques (Abd El-Daim et al., 2014).
- La meilleure fluorescence de chlorophylle, qui correspond à une meilleure activité photosynthétique (Abd El-Daim et al., 2019).
- Une meilleure rétention d'eau lors de sécheresses (Kasim et al., 2012).

Les bactéries dites PGPR peuvent également augmenter le phosphate biodisponible. A partir de composés Pi et Po peu solubles dans le sol, les PGPR solubilisent le P et le libèrent dans la solution du sol (Artursson et al., 2006). Cela améliore donc la nutrition de la plante. Il est important de noter que la nutrition de la plante en azote pourrait également être améliorée grâce aux PGPR (Artursson et al., 2006).

Les PGPR améliorent la résistance des plantes vis-à-vis des pathogènes de différentes manières :

- Induction des mécanismes de « Induced system resistance » (ou ISR).
En effet, l'ISR induite par les rhizobactéries ressemble à la résistance dite « systemic acquired resistance » (SAR) induite par les agents pathogènes. Ces deux types de résistance induite rendent les parties non infectées de la plante plus résistantes aux agents pathogènes des plantes (Beneduzi et al., 2012).
La SAR se fait via la voie de l'acide salicylique et l'ISR nécessite les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Beneduzi et al., 2012).
La plante ne produit pas de métabolites mais se prépare à exprimer des gènes de défense rapidement en cas de contamination (Hellin 2020).
- La production de sidérophores soit des molécules pouvant fixer le fer. Elles capturent le fer dans le sol et le rendent ainsi indisponible pour les autres microorganismes du sol, notamment les organismes pathogènes (Chen et al., 2007).
- La production de composés à activité antimicrobienne. Il s'agit notamment d'antibiotiques à large spectre, d'acide lactique produit par les lactobacilles, d'agents lytiques tels que les lysozymes, de nombreux types d'exotoxines et de bactériocines, qui ont également un mode d'action bactéricide (Beneduzi et al., 2012).
- La production de lipopeptides. Celle-ci est en partie responsable des effets protecteurs des PGPR sur la protection de la plante lors d'un stress biotique (Ongena & Jacques, 2008). En effet, ces molécules sont impliquées dans l'induction du système de défense de la plante lors d'une attaque pathogène (Ongena et al., 2007).

2.4.4 Interaction PGPR - CMA

Les interactions entre les composants de la microflore du sol sont clés pour comprendre les processus dynamiques qui caractérisent les relations plante-sol. En plus des mécanismes indépendants pour chaque micro-organisme, les effets des rhizobactéries sur le développement et le fonctionnement des CMA sont d'un intérêt particulier (Andrade et al., 1997). Les CMA, à leur tour, affectent la composition des communautés bactériennes (Andrade et al., 1997).

En plus des effets synergiques entre les CMA et PGPR qui favorisent leur promotion de leur biologie propre, cette association permet le meilleur développement de la plante hôte (Kim et al., 2010; Toro et al., 1997; Zhang et al., 2018).

Stimulation de la biologie du CMA et des bactéries lors de leur interaction

Les interactions CMA – PGPR du sol sont influencées par différents facteurs. En effet, la capacité des bactéries à s'attacher aux hyphes du champignons varie en fonction de la plante hôte, de l'environnement, des souches spécifiques de microorganismes mais aussi en fonction du stade de la mycorhization (Miransari, 2011).

L'association des deux micro-organismes se fait par une succession de deux modes d'association :

- Le premier par effet électrostatique entre les hyphes de CMA et la bactérie
- Le second par un effet plus stable, avec la production d'exsudats bactériens (Artursson et al., 2006) (Bianciotto & Bonfante, 2002).

Selon Pivato, les souches bactériennes notamment *Pseudomonas fluorescens*, isolées des sporocarpes ou des spores de *Funneliformis mosseae*, stimulent la germination des spores de champignons et la formation de symbioses mycorhiziennes à arbuscules (Pivato et al., 2009).

Les effets de la bactérie *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* sur l'élongation et la ramification des hyphes de *Gigaspora margarita* ont été étudiés et se sont avérés plus élevés en présence de la bactérie. Ces études permettent de conclure que cette espèce bactérienne améliore la croissance pré-symbiotique du CMA (Pivato et al., 2009). De plus, les bactéries libres et endo-symbiotiques favorisent l'établissement de la mycorhize en augmentant le contact du champignon avec les racines de l'hôte (Pivato et al., 2009).

Les PGPR sont également capables d'augmenter le développement des CMA en affectant la colonisation des racines et en améliorant l'absorption de N et de P par les plantes (Artursson et al., 2006). En effet, selon Zhang et al. (2018), l'association entre *Rhizophagus irregularis* et *Rahnella aquatilis* en conditions *in vitro* induit une stimulation des activités phosphatases bactériennes de par le fructose produit et exsudé par le CMA et prélevé par la bactérie. Une

plus grande quantité de P a alors été solubilisée par la bactérie en présence du CMA, permettant une augmentation du prélèvement de P_i par ce dernier (Figure 11).

Réciproquement, l'influence du CMA sur le développement bactérien a été montrée par Toljander et al. (2006). En effet, un développement bactérien plus important en présence d'exsudats de *Glomus* sp. MUCL 43205 par rapport aux témoins a pu être démontré. Les hydrates de carbones et acides organiques exudés par les racines mycorhizées seraient utilisés par les bactéries pour leur métabolisme (Toljander et al., 2006).

Effet synergique de l'association CMA/bactérie sur le développement des plantes

Dans un milieu pauvre en P, les travaux de Toro et al (1997) ont montré que les plantes inoculées avec des CMA et PSB présentaient une meilleure nutrition en P et en N par rapport aux témoins. En effet, Zhang et al. (2018) ont démontré que le fructose exsudé par le champignon mycorhizien à arbuscules *R. irregularis* MUCL 43194 induit l'expression des gènes de phosphatase du PSB *Rahnella aquatilis* HX2.

Un effet synergique de *Methylobacterium oryzae* (PGPR) avec différents CMA sur le poivron a été mis en évidence par Kim et al. (2010). Les effets bénéfiques pour la plante se traduisent par une meilleure croissance, teneur en chlorophylle et teneur en N et P.

Récemment une étude menée par Zhang et al. (2018), ont démontré que le champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis* MUCL 43194 influence également les trois enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique (ATC) (c'est-à-dire la citrate synthase (*gltA*), l'isocitrate déshydrogénase (*kgdhc*) et l' α -oxoglutarate déshydrogénase (*icd*) dans la bactérie solubilisatrice de phosphate *R. aquatilis* HX2. Ceci est extrêmement bénéfique pour les bactéries PGPR car leur activité dépend de l'ATP, qui est principalement produit dans le cycle de l'ATC (Tortora et al., 2016).

Selon Zhang et al. (2018), il existe une récompense réciproque de C et P entre le CMA *R. irregularis* et *R. aquatilis*, au niveau transcriptionnel (Figure 11). Les hyphes extraradicaux de *R. irregularis* ont libéré des sucres dans l'environnement. Le fructose est absorbé préférentiellement au glucose et joue un rôle clé comme composé signal. Il stimule également l'expression des gènes de phosphatase dans la bactérie. Le CMA améliore l'efficacité de la sécrétion de la phosphatase dans l'environnement en régulant les systèmes de sécrétion des protéines dans la bactérie. En conséquence, l'activité phosphatase dans l'environnement est augmentée et favorise l'hydrolyse du P organique. Plus de P inorganique est donc disponible pour les CMA et les processus relatifs à l'absorption et au métabolisme du P sont stimulés

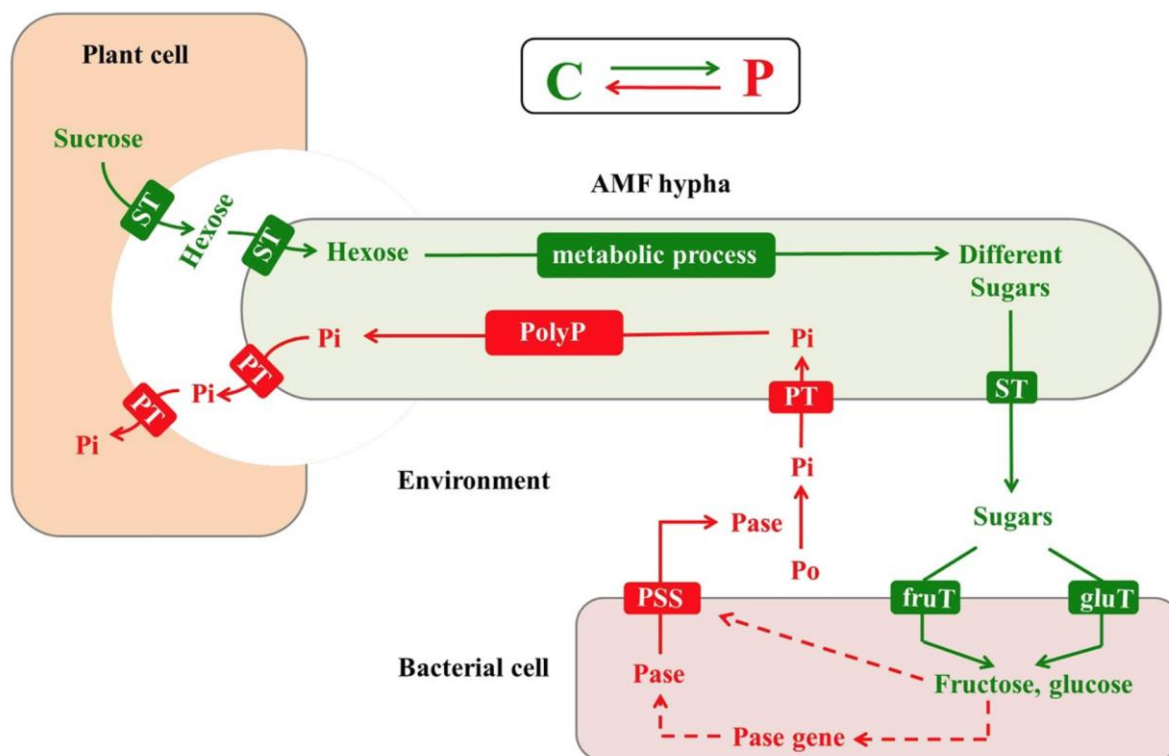


Figure 11. Représentation schématique de la rétribution réciproque du carbone (C) et du phosphore (P) entre le champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) *R. irregularis* et la bactérie solubilisatrice de phosphate (PSB) *R. aquatilis*. ST transporteur de sucre, fruT transporteur de fructose, gluT transporteur de glucose, PT transporteur de phosphate, PSS système sécrétoire des protéines, Pase phosphatase, Pi P inorganique, Po P organique (Zhang et al., 2018).

L'interaction des CMA et des PGPR avec les plantes, comme développé ci-dessus, devrait ainsi permettre une meilleure nutrition végétale, une meilleure tolérance/résistance aux stress biotiques mais aussi une résistance face aux stress abiotiques, susceptibles d'être de plus en plus fréquents à l'horizon 2050. Les microorganismes sont alors des pistes de réponses au défi de développer une méthode de culture efficace sous les projections climatiques futures, tout en ayant un impact le plus faible possible sur les écosystèmes.

Il est alors intéressant d'étudier les effets des microorganismes sur le développement des plantes à intérêt agronomique, notamment lorsqu'ils sont en interaction. Afin de les rendre applicables au champ, l'étude du comportement microbien dans un environnement complexe est également importante. Il est à noter que l'interaction entre les *Bacillus* et les CMA est encore relativement méconnue et mérite une recherche approfondie. Dans le cadre de ce mémoire, l'interaction entre *B. velezensis* et *R. irregularis* pour la nutrition phosphatée du blé sera ainsi étudiée.

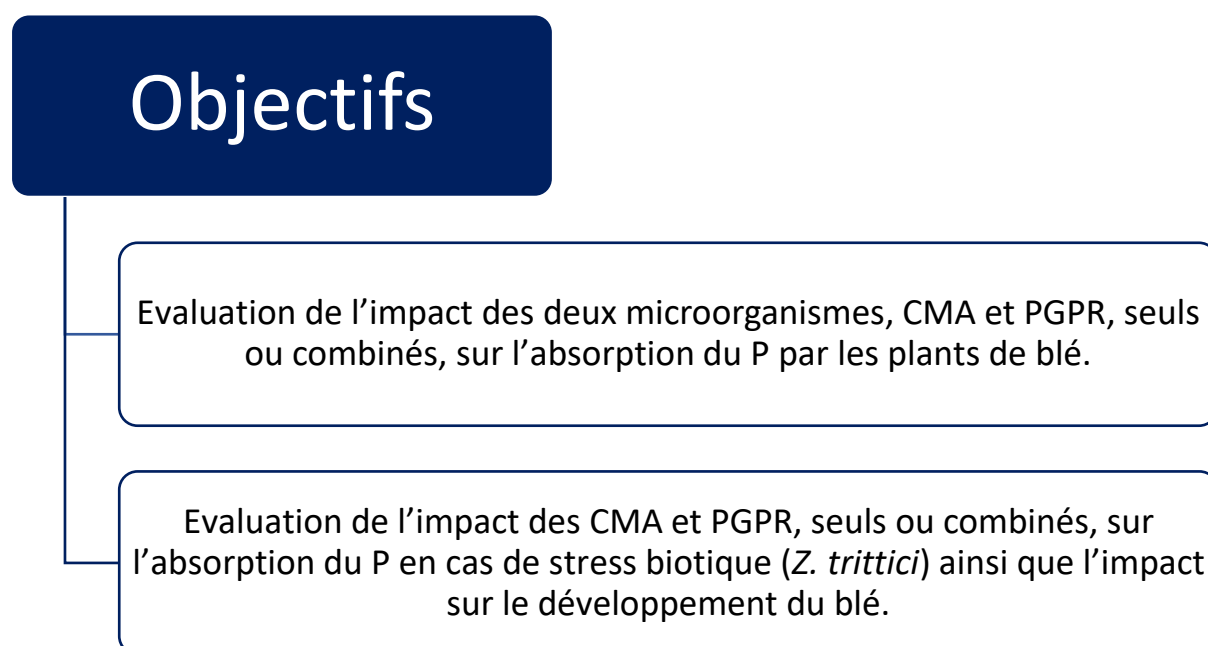
3. Objectifs

Ce mémoire s'intègre dans le projet nommé « MicroSoilSystem » qui vise à une réduction d'intrants par application de consortia microbiens à finalité bio-stimulante et de bio-contrôle adaptés au fonctionnement des sols en agriculture conventionnelle et de conservation.

L'objectif de ce mémoire est d'évaluer les bénéfices apportés par la combinaison d'un CMA (*R. irregularis*) et d'une PGPR (*B. velezensis*) sur (1) les paramètres de croissance et (2) le prélèvement en P du blé de la variété Faustus, ainsi que leurs effets respectifs en absence et en présence d'un stress induit par un pathogène tel que *Z. tritici*.

Afin d'étudier ces paramètres, un système de culture en conditions semi-hydroponiques à circulation continue en serres, mis au point au laboratoire de mycologie (Garcés-Ruiz et al., 2017) a été utilisé.

Ainsi les principaux objectifs de mon mémoire sont décrits ci-dessous :



4. Matériels et méthodes

4.1. Matériel biologique

4.1.1 Blé variété Faust

Pour l'ensemble de l'expérience, *Triticum aestivum* L. cultivar FAUSTUS a été utilisé (Figure 12).

Ce cultivar est un froment d'hiver (Bonnot, 2016; Marcussen et al., 2014), c'est à dire qu'une vernalisation est nécessaire pour que ce froment se développe correctement et atteigne la floraison. Il est également semi-précoce à l'épiaison et à maturité ce qui implique que la récolte se fait aux alentours de fin juillet – début août en fonction des conditions climatiques. Cette précocité est un avantage pour la plante car elle lui permet une meilleure adaptation aux sols à faible rétention en eau, malgré un rendement potentiel plus faible comparé à un froment tardif (CRA-W 2017).



Figure 12. Espèce FAUSTUS (Heens et al., 2016).

Selon Heens et al, 2016, le cultivar Faustus est recommandé en « protection intégrée ». En effet, cette variété possède des résistances partielles à plusieurs maladies communes des régions tempérées et notamment la septoriose¹ (Heens et al., 2016). Cette variété est également peu sujette à la verse et est plutôt adaptée à un semis normal à tardif (Heens et al., 2016). En 2017, Selon le livre blanc des céréales, le cultivar Faustus représentait 3,3% des cultivars récoltés en Wallonie (CRA-W 2017).

La caractéristique intéressante de ce blé pour la réalisation de ce mémoire est la bonne capacité des CMA à coloniser ce cultivar en conditions contrôlées. En effet, un test préalable dans le cadre du projet MicroSoilSystem avec diverses variétés de blé a été mené pour sélectionner la variété la plus mycotrophe.

¹ Sur une échelle de 1 à 9, 9 représentant une résistance totale à la maladie, le froment Faustus est résistant à la septoriose 6,7.

4.1.2 Champignon mycorhizien à arbuscules – CMA

La souche de CMA utilisée lors de cette expérience est *Rhizophagus irregularis* (Blaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.) MUCL 41833 (Figure 13). Cette souche a été fournie par la Glomeromycota IN vitro Collection (GINCO). En ce qui concerne la classification taxonomique, ce CMA appartient à l'ordre des *Glomerales*, la famille des *Glomeraceae*, le genre des *Rhizophagus* et l'espèce des *irregularis* (Tableau 2).

Le CMA *R. irregularis* MUCL 41833 a été choisi pour sa capacité à protéger les plantes contre des stress de types abiotiques et les stress biotiques (Gallou et al., 2011; Buysens et al., 2017; Alaux et al., 2018).

Dans le cadre de ce mémoire, le CMA a été produit en masse en pots sur racines de maïs (*Zea et mays* L.) en serre, cultivé dans de la terre de lave stérilisée deux fois à 121°C pendant 15 min.



Figure 13. Image de spores de *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 ainsi que ces hyphes. Copyright : Laboratoire de mycologie de l'UCLouvain.

Tableau 2. Classification taxonomique du champignon mycorhizien à arbuscules

Règne	Fungi
Phylum	Glomeromycota
Classe	Glomeromycetes
Ordre	Glomerales
Famille	Glomeraceae
Genre	<i>Rhizophagus</i>
Espèce	<i>irregularis</i>

4.1.3 Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR

La souche de PGPR sélectionnée pour cette expérience est *Bacillus velezensis* GA1. La souche utilisée est un mutant portant le gène codant pour la GFP². Ceci a permis de l'identifier facilement par fluorescence parmi la communauté bactérienne (Figure 14).

Bacillus velezensis, a été isolé pour la première fois près de l'embouchure de la rivière Velez à Malaga et décrite par Ruiz-García et al. en 2005, comme une bactérie Gram positive qui se développe dans une plage de température de 15 à 45 °C et un pH de 5,0 à 10. (Ye et al., 2018).

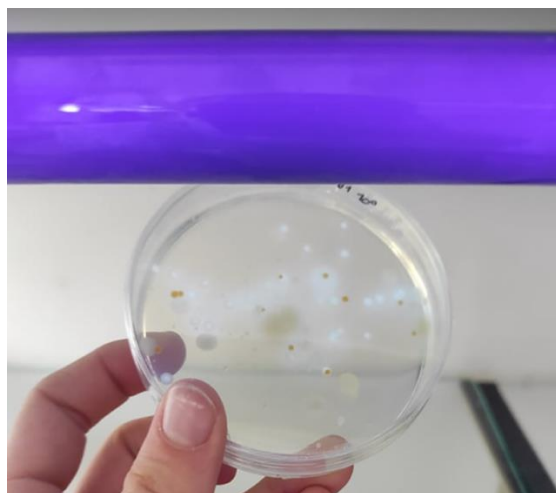


Figure 14. Photographie d'une boîte de Petri sur laquelle ont poussé des colonies de bactéries. Les colonies de *B. velezensis* exprimant la GFP sont fluorescentes

Au cours de la dernière décennie, les chercheurs ont mené une série d'études sur ses propriétés biologiques et ses mécanismes moléculaires. Cette bactérie produit des molécules antimicrobiennes et antifongiques, est capable d'entrer en compétition avec d'autres microorganismes, et d'induire les mécanisme de défense de la plante (Induced Systemic Resistance - ISR) (Ongena & Jacques, 2008; Ye et al., 2018).

La souche pure a été conservé dans un cryotube de 2 ml à -80°C dans 50% de glycérol.

Pour augmenter le nombre de UFC/ml afin d'inoculer les plants de blé, un prélèvement avec une hanse en plastique a été effectué dans le cryotube et déposé dans 4 tubes Falcon de 50 ml contenant le milieu 'root exudate wheat'³ (REW) (Voir annexe – Tableau 16) stérile (121°C pendant 15 min). Ceux-ci ont été ajoutés à 4 erlens contenant 150 ml de milieu REW stérile ensuite posés sur un agitateur à 180 rpm à 30°C dans l'obscurité pendant 24 heures.

Les cultures ont tout d'abord été purifiées (pour enlever les exsudats bactériens). Pour cela, le contenu de chaque erlen a été divisé en 4 tubes Falcon de 50 ml. Ceux-ci ont été centrifugés à 3600 rpm pendant 20 min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu 3 fois dans 5 ml d'eau physiologique (9 g/L de NaCl) stérile et centrifugé à 3600 rpm pendant 20

² Green Fluorescent Protein, protéine fluorescente provenant de *Aequorea* sous sa forme sauvage (Heim et al., 1995)

³ Root exudate wheat est un milieu basé sur la composition des exsudats de blé créé dans le cadre du Projet Microsoilsystem

min. Les culots obtenus ont été dilués à nouveau dans 2 ml d'eau physiologique et rassemblés dans un Falcon de 50 ml ce qui a formé la solution intermédiaire pour bactériser les plants. Une analyse spectrométrique a été réalisée pour connaître la concentration de *B. velezensis* dans cette solution intermédiaire.

La concentration a été ajustée à 5×10^7 CFU/ml pour former les bains de bactérisation dans lesquels les plantules de blé ont été inoculées avec les bactéries.

4.1.4 *Zymoseptoria tritici*

La souche de *Z. tritici* MUCL45408 utilisée a été fournie par la mycothèque de UCLouvain.

Cette souche a été isolée sur une feuille infectée dans un champ wallon à Acoz et cultivée sur un milieu composé de 2% de malt agar à 25°C. (*MUCL search results / BCCM Belgian Coordinated Collections of Microorganisms*, s. d.). Cette souche a été choisie pour sa bonne capacité de sporuler.

Le champignon a été cultivé sur un milieu composé de 2% de malt agar à 25°C pendant 18 jours à l'obscurité (Figure 15), avant de récolter les spores pour les inoculer sur les plants de blés.



Figure 15. Souche de *Z. tritici* MUCL45408 utilisée a été fournie par la mycothèque de Louvain-la-Neuve repiquée le 19/02/2021.

4.2 Dispositif expérimental : description du système semi-hydroponique à circulation continue

Le système semi-hydroponique mis au point par Garcés-Ruiz et al. (2017) est un système permettant une circulation continue fermée d'une solution nutritive dans un pot contenant des plants mycorhizés ou non. Cela permet de quantifier de manière facilitée et à intervalles réguliers la déplétion des éléments nutritifs dans la solution.

Les pots de culture sont chacun relié à une bouteille Duran 1 L remplie d'une solution nutritive de Hoagland low-P (réduite de 90% en Pi – composition disponible dans le tableau 3). Les éléments qui constituent la solution A et le fer ont été préparés séparément pour avoir une bonne solubilité de ces éléments, contrairement aux éléments de la solution B, qui ont été préparés dans la même bouteille. Une solution mère a été préparée pour ensuite la diluer 100 fois avant utilisation.

Tableau 3. Composition de la solution stock (solution mère) d'Hoagland concentrée 100 fois et réduite de 90% en phosphore exprimée en gramme par litre de solution

			Concentration solution stock (100X)	
Solution	Formule chimique	Composant	g/l	Mol/l
Solution A (pH 5,3)	NH ₄ NO ₃	ammonium nitrate	8,00	0,100
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	calcium nitrate	82,60	0,350
	KNO ₃	potassium nitrate	35,70	0,353
	KCl	potassium chloride	4,51	0,061
	K ₂ SO ₄	potassium sulfate	10,54	0,061
Solution B (pH 4,4)	KNO ₃	potassium nitrate	5,00	0,049
	KH ₂ PO ₄	potassium dihydrogeno phosphate	2,74	0,020
	MgSO ₄	magnesium sulfate	12,04	0,100
	MnSO ₄ ·H ₂ O	manganèse sulfate monohydrate	0,053	0,00031
	H ₃ BO ₃	borid acid	0,14	0,0023
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	copper sulfate pentahydrate	0,015	0,000060
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ ·4H ₂ O	ammonium molybdate tetrahydrate	0,008	0,0000065
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	zinc sulfate heptahydrate	0,06	0,00021
Solution C	C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈	Fe-EDTA	1,90	0,0052

Les bouteilles Duran contenant la solution nutritive sont chacune reliée au pot de culture de blé par un tuyau de 4 mm de diamètre via une pompe péristaltique. Cette pompe est réglée pour transporter la solution nutritive à une vitesse de 10 tours par minute (10 rpm) et permet de transporter la solution nutritive jusqu'au pot contenant le plant de blé. La solution nutritive est donc apportée par la pompe jusqu'au plant de blé et ensuite percole par gravité à travers le système racinaire pour retourner dans la bouteille contenant la solution nutritive via un tuyau de 4 mm de diamètre. Le circuit fermé est continu et permet des prélèvements de solution à intervalle régulier pour quantifier le Pi absorbé par la plante (Figure 16).

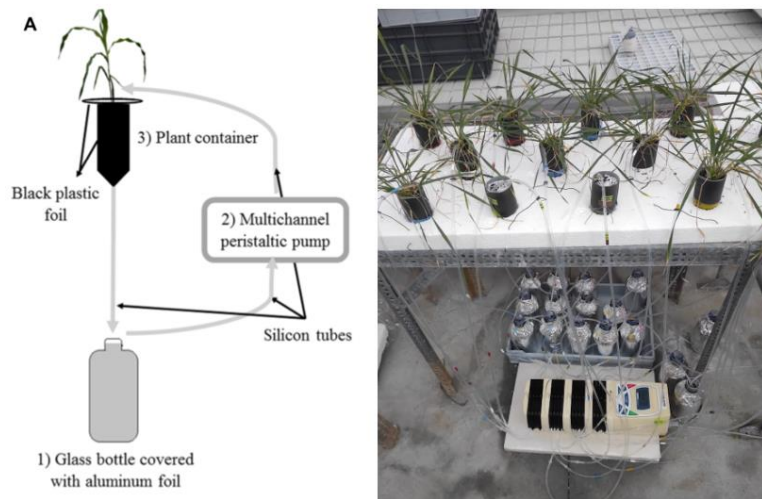


Figure 16. Système de culture circulaire et semi-hydroponique (Garcés-Ruiz et al., 2017).

Les pots contenant le plant de blé ont été construits à base de bouteilles en plastiques de 250 ml. Le fond de ces bouteilles a été coupé et une toile en nylon a été collée du côté du goulot pour maintenir le substrat à l'intérieur et pour empêcher les racines de venir boucher le bouchon goutte à goutte et donc le système.

Les pots de culture sont remplis de perlite. Ce substrat de croissance a été choisi car ce matériel est léger, inerte, colmate peu et permet un bon développement racinaire. Ce substrat facilite également le retrait des racines, leur nettoyage et leurs analyses par la suite. La perlite a été tamisée afin d'obtenir des particules de diamètre supérieur à 1 mm. Elle a ensuite été lavée avec de l'eau déminéralisée et finalement séchée à l'air libre pendant 5 jours.

Des tubes Falcon 50 ml à jupe ont été utilisés pour récupérer les échantillons de solution nutritive. Une structure en fil de fer permettait de tenir chaque tuyau en place dans la bouteille ou lors des prélèvements dans le Falcon.

4.3 Mise en place du pré-test

Pour mettre au point l'expérience finale, un prétest a été réalisé pour analyser la dynamique de prélèvement du Pi d'un plant de blé pendant 54 heures. Cinq prélèvements ont été effectués : T1 (temps 0), T2 (après 6 heures de circulation), T2 (après 24h de circulation), T3 (après 48h de circulation), T4 (après 54h de circulation).

La figure suivante (Figure 17) montre les différentes étapes suivies pour la réalisation de ce pré-test. Chaque étape est ensuite décrite en détail

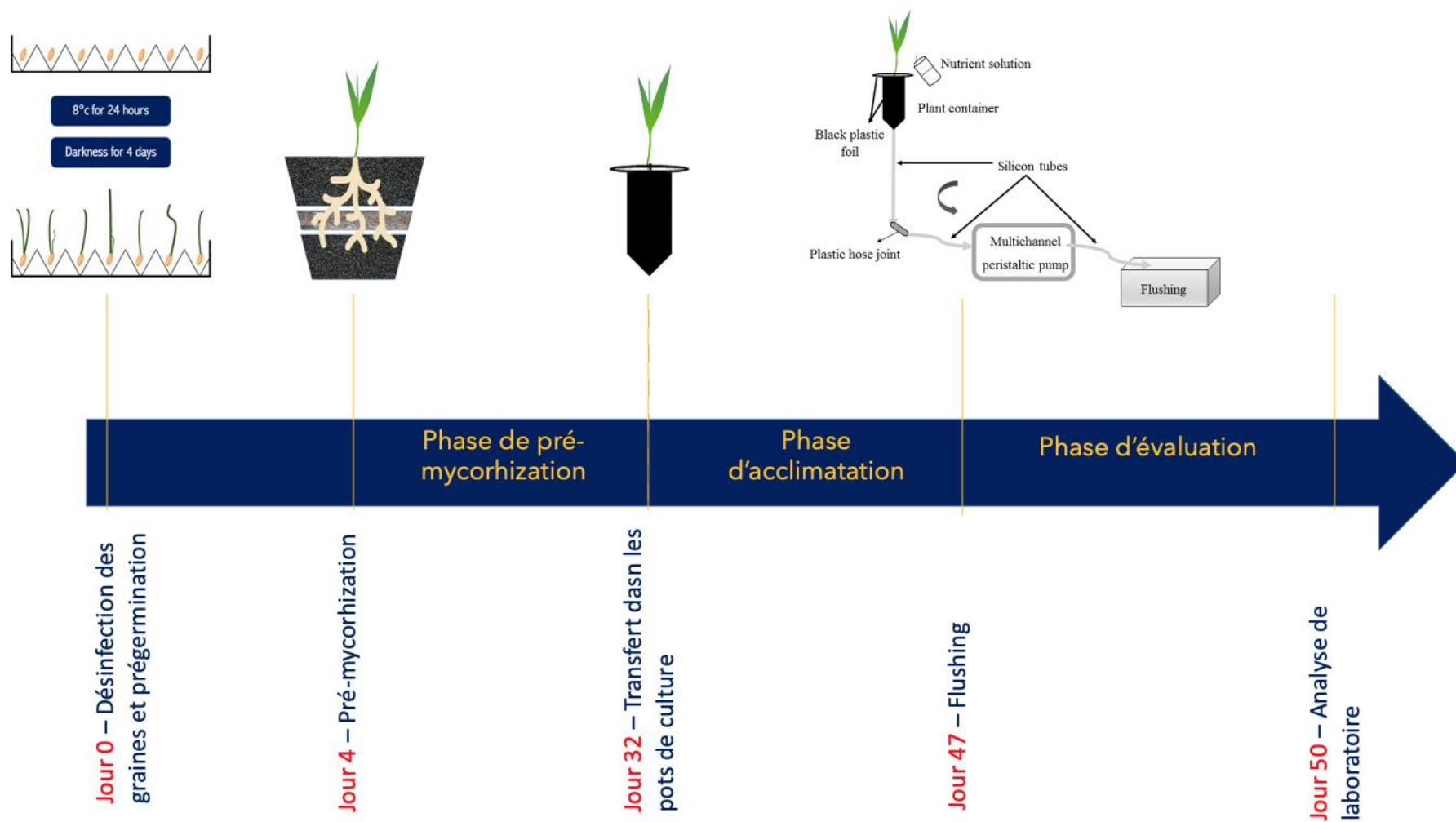


Figure 17. Schéma récapitulatif de la mise en place du Prétest.

4.3.1 Désinfection et pré-germination des graines de blé

Les graines de blé sans défaut visuel ont été sélectionnées. Pour désinfecter les graines et enlever la couche de fongicide qui l'entoure, celles-ci ont été placées dans un Erlenmeyer de 500 ml et recouvertes d'eau de javel. Ce mélange a été agité grâce à un agitateur pendant 10 min (Figure 18). Trois rinçages de 5 minutes avec de l'eau stérile ont ensuite été effectués. Pour finir, les graines ont été disposées sur du papier Tork pour être séchées.

Pour la pré-germination de semences de blé, celles-ci ont été arrangées dans le creux d'un papier plié en éventail qui a été placé dans des boîtes de micro-propagation fermées hermétiquement



Figure 18. Désinfection des graines à l'eau de Javel.

Les graines ont été stockées pendant 24h à 8°C pour induire un stress et accélérer leur germination. Par la suite, les graines ont été stockées à l'obscurité à température ambiante jusqu'au transfert dans les bacs de pré-mycorhizatio

4.3.2 Mycorhization des plantules de blé

Une culture en pot de 5 L de *R. irregularis* a été produite avec du maïs (*Zea mays* L.), plante modèle pour la production de masse de *R. irregularis* MUCL 41833. Cette production en masse sur maïs (Figure 19) a pour but l'enrichissement de la terre de lave en inoculum mycorhizien (spores, racines mycorhizées) capable de coloniser les plantules de blé.

Avant de replanter les plantules de blé, le taux de colonisation racinaire a été analysé dans le maïs donneur selon le protocole décrit dans la section 4.5.2.



Figure 19. Production de masse de *R. irregularis* MUCL 41833 sur de plants de blé

Tableau 4. Evaluation du taux de colonisation racinaire total, arbusculaire et vésiculaire des plants de maïs par *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833.

Traitement	Colonisation racinaire totale (%)	Colonisation arbusculaire (%)	Colonisation vésiculaire (%)
Maïs donneur	75,19 ± 21,83	45,35 ± 18,14	46,65 ± 33,50

Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 3 répétitions.

D'après l'analyse du taux de colonisation des racines de maïs par le CMA (Tableau 4), le pourcentage de colonisation racinaire totale est élevé. Les racines de ces plants de maïs étaient donc aptes à servir d'inoculum pour les plantules de blé.

Pour associer les plantules de blé germés avec le CMA, un cercle de textile GEOX a été placé au fond d'un pot de 5 L et le pot a ensuite été recouvert jusqu'à 1/3 de terre de lave stérilisée deux fois à 121°C pendant 15 min. Ensuite, une couche de 1-2 cm de racines de maïs pré-mycorhizée a été étalée et recouverte de 2/3 du pot de terre de lave stérile. Des micro-puits de 2 cm de profondeur ont ensuite été faits pour y insérer un grain de blé, recouvert ensuite de substrat.

La même procédure a été mise en place pour les plantes témoins non-associés au CMA, hormis que la terre de lave utilisée ne contenait pas d'inoculum mycorhizien.

Les plantules ont été arrosées à l'eau déminéralisée tous les deux jours et maintenues dans ce système pendant 1 mois.

4.3.3 Transfert des plantules de blé dans le système semi-hydroponique à circulation en continu

Les plantules de blé ont été extraites des pots de pré-mycorhization et les racines ont été lavées avec de l'eau déminéralisée pour éliminer les résidus de terre de lave, pour ensuite être transférées dans les pots servant à la circulation.

Après 30 jours de phase de mycorhization, le taux de colonisation racinaire a été analysé pour déterminer si le CMA s'était bien établi dans les racines.

D'après l'analyse du taux de colonisation, on a pu observer que le pourcentage de colonisation racinaire dans le blé (M 30j) est élevé et que les plants de blé non inoculés montrent que très peu de structures fongiques intra-racinaires. Ces structures observées proviennent sûrement d'un autre champignon, du fait de l'absence d'inoculation du substrat par le CMA et l'absence d'arbuscules et de vésicules caractéristiques des CMA.

Chaque pot est constitué d'une bouteille contenant 100 ml de perlite tamisée, lavée et séchée ainsi qu'une plantule de blé recouverte à nouveau de 100 ml de perlite. Finalement, 100 ml de solution d'Hoagland low-P ont été versés immédiatement après le transfert.

Les pots contenant chacun un plant de blé ont été déposés sur un support en frigolite percé, permettant d'espacer et tenir en place les pots. Les pots maintenus par les plaques de frigolite ont été sur une structure en métal dans une serre de l'UCLouvain.

4.3.4 Phase d'acclimatation des plantes

Les plantules ont ensuite été acclimatées à leur nouvel environnement (les bouteilles) pendant une période de 15 jours et arrosées tous les deux jours avec 70 ml de solution d'Hoagland low-P.

4.3.5 Dispositif expérimental et disposition en serre

Pour le prétest, 4 plantules mycorhizées (M) et 4 plantules non-mycorhizées (NM) ont été disposées de manière aléatoire sur le support en frigolite afin de maintenir les pots verticaux et placées sur une table en métal trouée (Figure 20) afin de laisser passer les tuyaux.

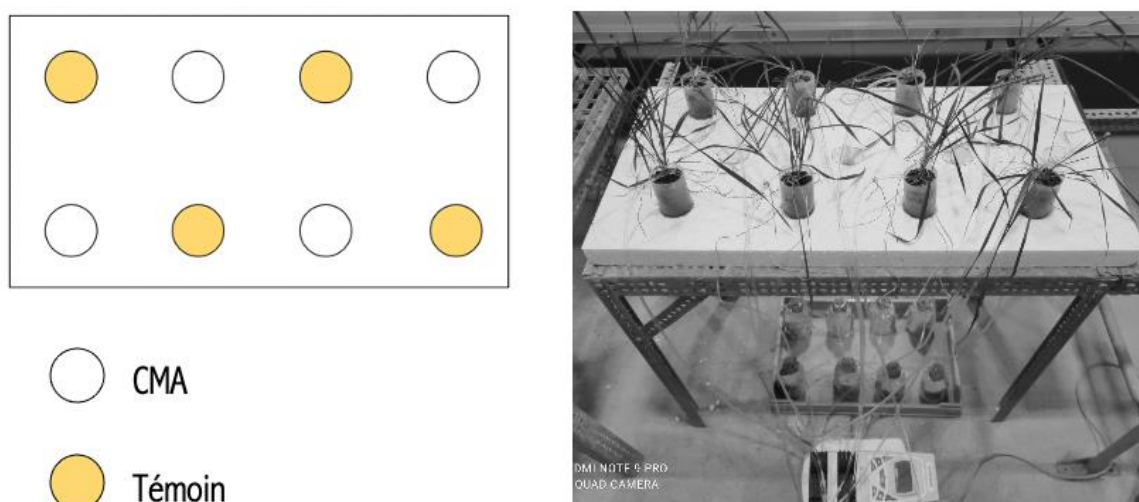


Figure 20. Dispositif expérimental et disposition des pots en serre lors du Prétest.

4.3.6 Mise en route du système à circulation en continu

Avant d'effectuer la circulation de la solution nutritive, il est essentiel de réaliser un « Flushing » (Figure 21). Cette opération consiste en l'addition de 100 ml de la solution nutritive dans chaque pot et, à l'aide d'une pompe péristaltique, à l'évacuation de cette solution. Ceci a pour but d'établir une concentration homogène en éléments nutritifs et en eau dans chaque pot avant mise en route du système.

Après cette étape, les tuyaux sont connectés et mis en place pour fermer le système et le démarrer.

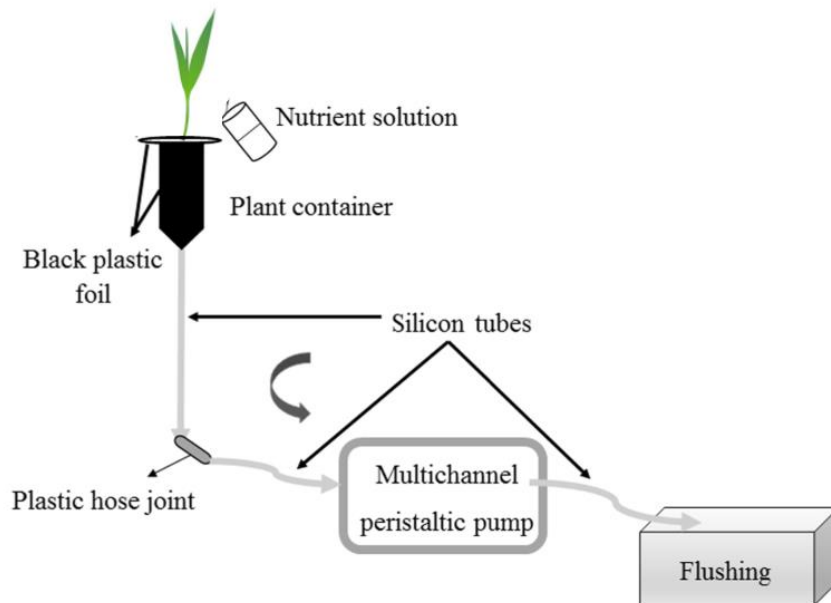


Figure 21. Dispositif pour effectuer le « Flushing ». D'après Garcés-Ruiz et al. (2017).

4.3.7 Échantillonnage

Lors du prétest, 20 ml d'échantillon de la solution nutritive ont été collectés à 0, 6, 9, 24, 48 et 54 heures après le démarrage de l'expérience.

Pour ce faire, la pompe a été arrêtée et les tubes qui alimentaient la plante ont été transvasés dans un tube Falcon de 50 ml avec jupe (Figure 22). Ensuite la pompe a été redémarré pour remplir chaque Falcon de 20 ml de solution nutritive. Après chaque collecte d'échantillons le système est refermé et la pompe est redémarré.

Les échantillons liquides ont été analysés selon le protocole décrit au point 4.5.4.1.

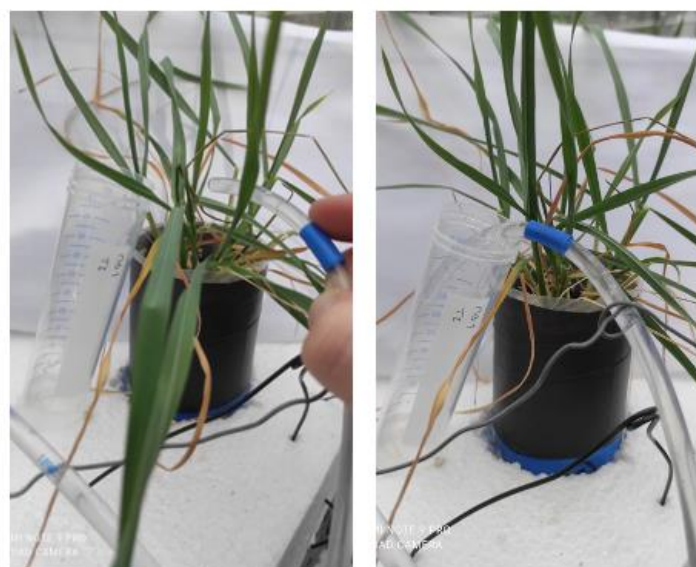


Figure 22. Prise d'échantillons

4.4. Mise en place de l'expérience finale

Les premières étapes : Désinfection, pré-germination des graines de blé et pré-mycorhisation des plants de blé ont été faites de manière identique au pré-test.

En effet, l'expérience a été réalisée de la même manière que le pré-test à l'exception de certaines étapes détaillées ci-dessous.

4.4.1 Transfert des plantules de blé dans le système semi-hydroponique à circulation en continu

C'est à ce moment soit au jour 30 de la phase de pré-mycorhization que le taux de colonisation racinaire a été analysé pour déterminer si le CMA s'est bien établi dans les racines de blé.

Tableau 5. Pourcentage de colonisation racinaire total, arbusculaire et vésiculaire des racines de blés colonisées par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 après 30 jours de colonisation avec l'inoculum.

Traitement	Colonisation racinaire totale (%)	Colonisation arbusculaire (%)	Colonisation vésiculaire (%)
M 30j	82,33 ± 3,51	21,33 ± 2,52	21 ± 4,36
NM 30j	6 ± 1	0 ± 0	0 ± 0

Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 3 répétitions.

D'après l'analyse du taux de colonisation du champignon (Tableau 5), on peut observer que le pourcentage de colonisation racinaire dans le blé (M 30j) est élevé.

Les plants de blé non inoculés avec le CMA ont également été contrôlés au jour 30 de la phase de pré-mycorhization (NM 30j) et montrent que très peu de structures fongiques intraracinaires (Tableau 5). Ces structures observées proviennent sûrement d'un autre champignon, du fait de l'absence d'inoculation du substrat par le CMA et l'absence d'arbuscules et de vésicules caractéristiques des CMA.

Pendant cette phase, la moitié des plants de blé mycorhizés a été bactérisée ainsi que la moitié des plants non-mycorhizés.

Pour cela, les plantules de blé ont été extraites des pots de pré-mycorhization et les racines ont été lavées avec de l'eau déminéralisée pour éliminer les résidus de terre de lave. Ensuite, la moitié de celles-ci a été plongée dans une solution contenant la bactérie *B. velezensis* GA1 à une densité optique (DO) de 0,25 à 600 nm (soit une concentration estimée à 5×10^7 UFC/mL) pendant 1,5h avant d'être transférée dans les bouteilles remplies de perlite (Figure 23). Cent ml de solution d'Hoagland low-P ont été versés immédiatement après le transfert.



Figure 23. Plants de blé dans un bain de solution bactérienne de *Bacillus velezensis* GA1.

Trois jours après le transfert, les plantes bactérisés (B) ont été arrosées et donc ré-inoculées avec 200 ml d'une solution à une DO de 0,01 (soit 2×10^6 UFC/ml). Les plants non-bactérisés ont reçu 200 ml d'Hoagland low-P sans bactéries.

Les plantes de froment sont donc traitées selon 4 inoculations différentes :

- Plantes témoins, ne contenant ni CMA, ni bactérie (traitement NM-NB)
- Plantes inoculées avec *R. irregularis* MUCL 41833 (traitement M-NB)
- Plantes inoculées avec *B. velezensis* GA1 (traitement NM-B)
- Plantes inoculées avec *R. irregularis* MUCL 41833 et *B. velezensis* GA1 (M-B)

Après 15 jours d'acclimatation, juste avant la réalisation du flushing de la première circulation, un dénombrement bactérien a été effectué selon le protocole expliqué au point 4.5.3. Le dénombrement a été effectué dans le système racinaire d'un plant M B et un plant NM B. Trois répétitions ont été faites par traitement.

4.4.2 Dispositif expérimental et disposition en serre

Pour chaque traitement, 6 plantules de chaque traitement (NM-NB, M-NB, NM-B et M-B) ainsi que 3 pots non végétalisés (appelés « blancs » et utilisés comme témoin et 3 pots non végétalisés mais bactérisés (avec la solution 1 D0/100 ml) ont été utilisés. Ces 30 pots ont été disposés de manière aléatoire sur un support en frigolite placé sur une table en métal trouée (Figure 24).

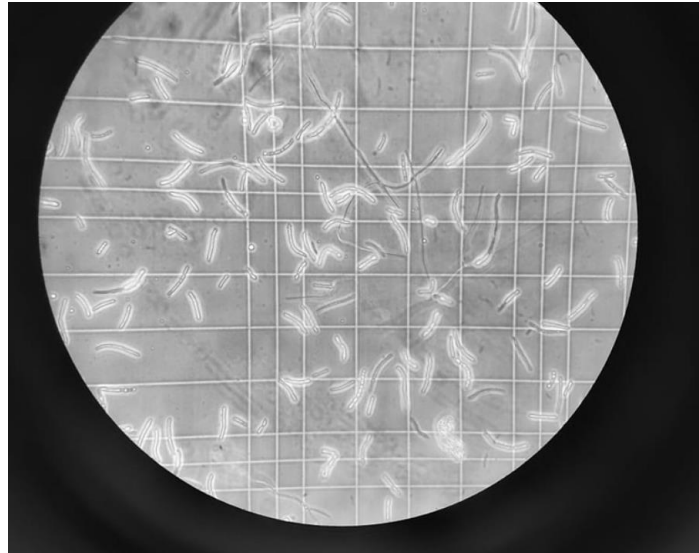


Figure 25. Comptage de spores de MUCL45408 dans une cellule de THOMAS (Grossissement = X40).

La concentration sporale a été ajustée à 56857 cellules/ml dans un volume total de 250 ml. Cette solution fongique a été appliquée au spray jusqu'à début de ruissellement sur les feuilles (3 sprays / plants) (Figure 26A). Ensuite, les plantules ont été couvertes avec des sacs à autoclave tenus grâce à des tuteurs pour maintenir une humidité proche de 90-100% pendant 3 jours (Figure 26B).

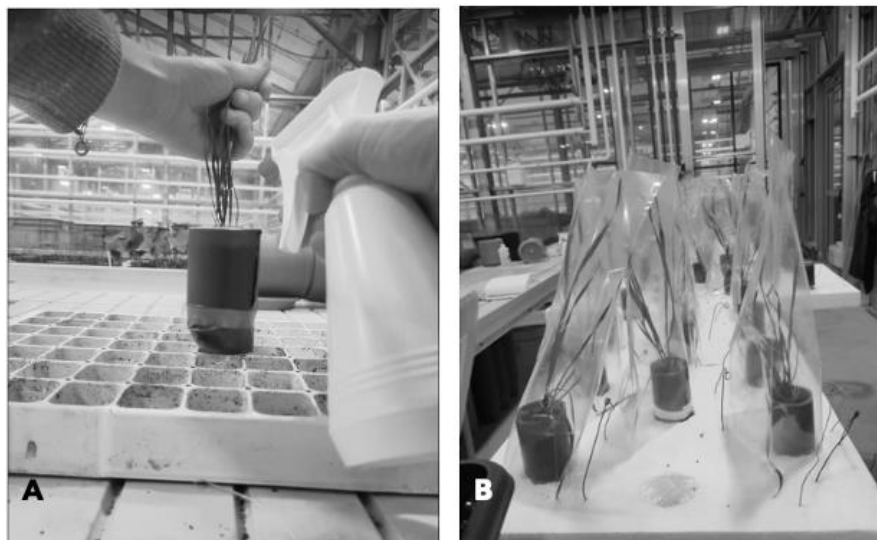


Figure 26. Application de la solution fongique par spray et plantules couvertes de sacs à autoclave.

4.4.5 Observations des symptômes

Les symptômes ont été observés après 2, 7, 14, 21 jours (les symptômes doivent être visibles après 21 jours).

Les feuilles ont été observées d'abords au binoculaire. Si une structure fongique potentielle est observée, la technique du « scotch » a été effectuée pour confirmer la présence de structures associée à *Z. tritici*.

Avant de prélever les structures, une incubation en chambre humide des feuilles a été réalisée pour que les structures fongiques se développent et soient plus facile à prélever. Ensuite , ces éventuelles structures sont prélevées à l'aide d'un scotch. Le scotch côté non-collant est placé sur une lame de microscope et est recouvert d'une à deux gouttes de bleu de lactophénol ⁴ pour colorer les structures. Le scotch est recouvert d'une microlame de microscope et la lame est passée rapidement dans une flamme pour tuer toutes les structures vivantes et faire bien rentrer le bleu de lactophénol dans celle-ci. La lame est scellée avec du vernis sur les bords de la microlame pour ensuite pouvoir l'observer au microscope.

Pour observer les structures au microscope, une coupe transversale dans les feuilles infectées à l'aide d'une lame de rasoir a été réalisée. Ces fines tranches ont été placées sur une plaque de microscope dans une goutte de bleu de lactophénol. La plaque microscopique est passée à la flamme pour tuer les structures fongiques et faire rentrer le bleu de lactophénol.

Des tâches ressemblant à des nécroses ont été légèrement visibles à l'œil nu mais malheureusement la présence de structure fongique n'a pu être confirmée sous binoculaire ou microscope pour confirmer la présence de la maladie. Il est possible que les tâches observées soient expliquées par la senescence naturelle des feuilles et non le développement de la maladie.

4.4.6 Échantillonnage

Vingt-cinq jours après l'inoculation du pathogène, une première circulation a été effectuée. Une fois le système démarré, les échantillons de la solution nutritive ont été collectés à 0, 3, 6, 12, 24 et 48 heures après le démarrage de l'expérience. Ces échantillons sont actuellement stockés pour analyse future.

Deux semaines plus tard, avant l'arrachage des plants, une troisième circulation a été réalisée. Les échantillons de la solution nutritive ont été collectés à 0, 3, 6, 12, 24, 36 et 48 h après le démarrage de l'expérience. Les temps 0, 12, 24 et 36 h ont été analysés.

⁴ Le bleu de lactophénol est un colorant de la chitine qui est l'un des composants des parois cellulaires des champignons.

4.5 Mesures effectuées

4.5.1 Développement de la plante



Figure 27. Plantes dans leur pot de culture juste avant d'être récoltées.

Quarante-huit heures après le début de la dernière circulation, soit 64 jours après leur transfert en perlite, divers paramètres de croissance ont été mesurés chez la plante :

- La hauteur des plantules a été évaluée depuis la base de la tige jusqu'à la plus longue feuille étirée verticalement (Figure 27).
- Le nombre de thalles par plants a été compté ainsi que le nombre de feuilles par thalles.
- La surface foliaire totale a été calculée à l'aide du logiciel ImageJ IJ 1.46r 2012 (Schneider et al., 2012). Pour ce faire, toutes les feuilles d'un plant de blé ont été étalées à plat et prises en photo sur un fond blanc (Figure 28). Ensuite, cette image a été rentrée dans le logiciel pour calculer la surface foliaire totale. La règle graduée permet de calibrer le logiciel et d'obtenir des mesures de surface en cm^2 (Figure 29).



Figure 28. Exemple d'une photographie de feuilles de froment qui sera entré dans le logiciel ImageJ IJ 1.46r 2012 pour obtenir une mesure de surface foliaire. La règle à gauche permet la calibration du logiciel.

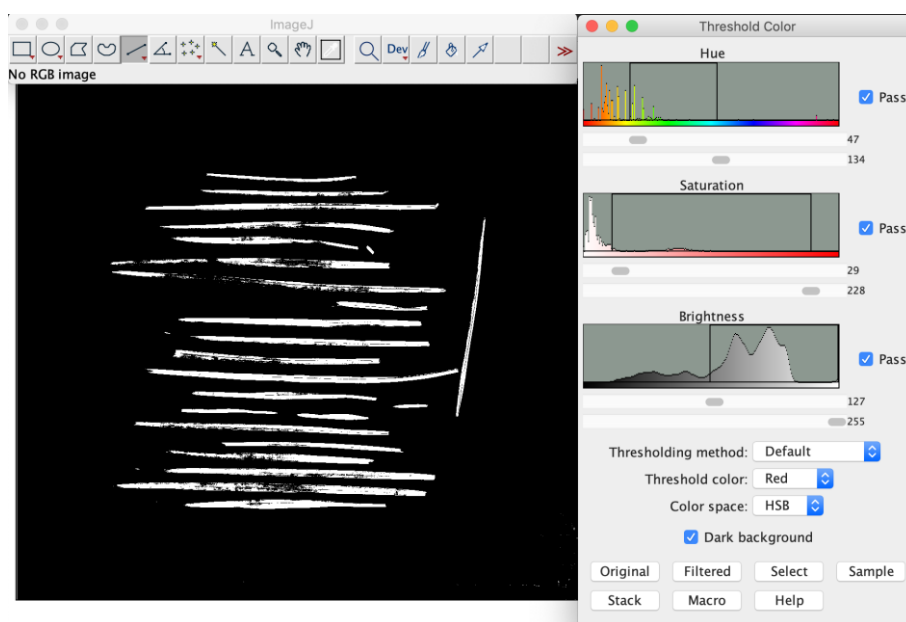


Figure 29. Interface du logiciel ImageJ IJ 1.46r 2012. Exemple d'analyse des surfaces foliaires des plantes analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

- Les poids secs et les pourcentage en eau de la partie aérienne et du système racinaire ont été déterminés. La partie aérienne (au-dessus du collet) et le système racinaire (en-dessous du collet) ont été pesés dès l'arrachage pour déterminer le poids frais (Figure 30A). La détermination du poids sec de la partie aérienne et du système racinaire a été réalisée après séchage du matériel dans une étuve à 70°C pendant 5 jours (jusqu'à la stabilisation du poids) (Figure 30B).



Figure 30. Pesée des parties racinaires pour déterminer le poids frais (A) et séchage des parties aériennes et racinaires dans une étuve à 70°C pendant 5 jours (B).

4.5.2 Croissance intra-racinaire du CMA

L'évaluation du taux de colonisation racinaire par le CMA a été évaluée 1 jour avant le transfert des plantules dans les bouteilles du système semi-hydroponique, c'est-à-dire 1 mois après la phase de pré-mycorhization et à la fin de l'expérience 2, au moment de la récolte.

4.5.2.1 Coloration racinaire

Pour la coloration des racines, le protocole couramment utilisé au laboratoire de mycologie est décrit dans leur syllabus « International training on in vitro culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi - Complementary Session : Root Staining » a été suivi (Figure 31).

Ce sont les racines préalablement séchées à 70°C pendant 5 jours qui ont été utilisées pour la coloration et après avoir suivi différentes étapes détaillées ci-dessous. Tout d'abord, les racines ont été réhydratées pendant une nuit. Après le retrait de l'eau, les racines ont été plongées dans un bain de KOH 10% et incubées à 70°C pendant 1 heure pour les éclaircir en éliminant le contenu cellulaire. Ensuite, les racines ont été plongées dans un deuxième bain composé de HCl 1% pendant 15 min à température ambiante. Cette étape est essentielle pour neutraliser le restant de KOH et permettre à l'encre de pénétrer et de s'accrocher sur les tissus fongiques. Le troisième et dernier bain composé d'encre à 5% et de HCl à 1% a été réalisé dans une étuve à 70°C pendant 30 min.

Une fois l'incubation terminée, l'excès d'encre est retiré, les racines sont recouvertes d'eau distillée puis conservées au réfrigérateur à 4°C pendant maximum 3 jours avant observation au microscope.

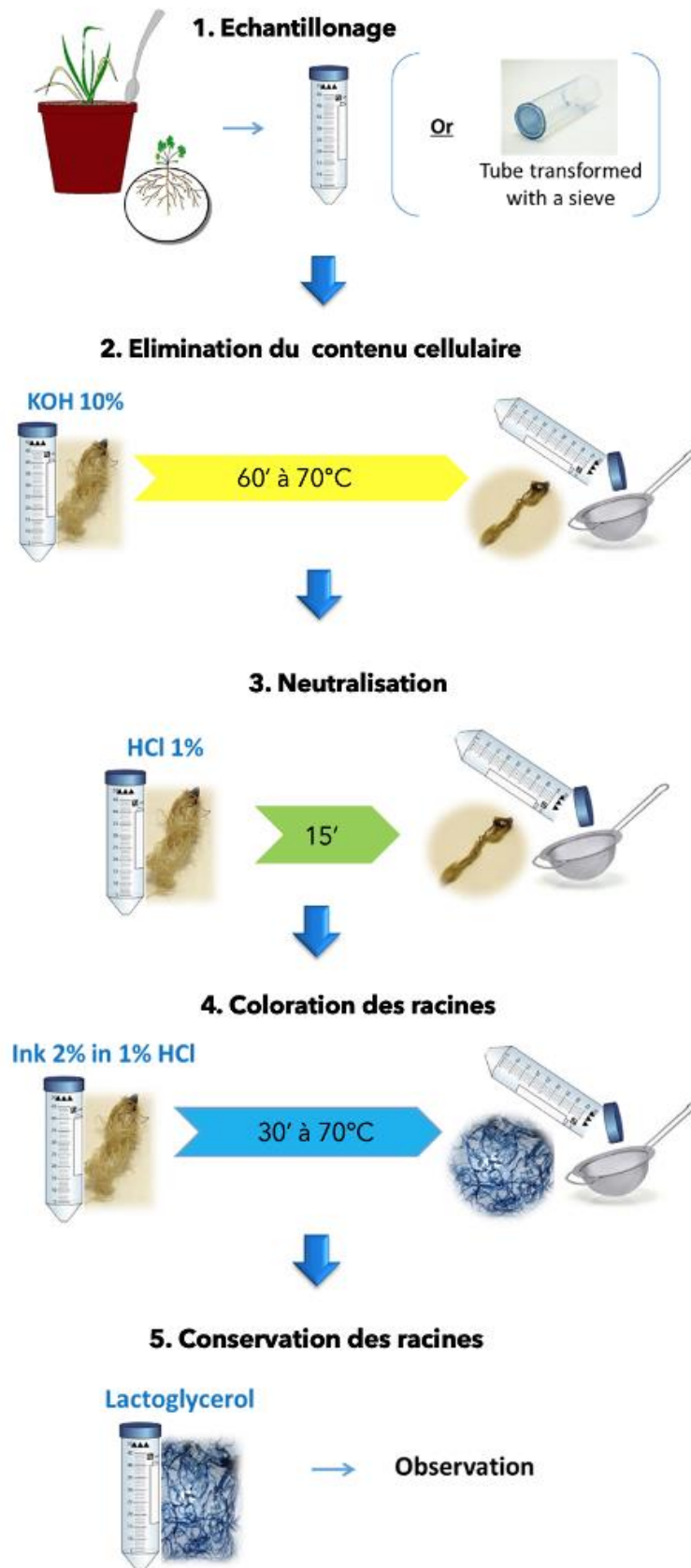


Figure 31. Protocole de coloration des racines selon le manuel créé par le laboratoire de mycologie.

4.5.2.2 Quantification du taux de colonisation

La quantification des structures fongiques a été réalisée suivant la méthode de Mc Gonigle et al. (1990). Les observations ont été faites au microscope optique avec un grossissement de X200.

Les lames de microscope ont été préparées de telle manière que 15 fragments de 1 cm de racines ont été déposés parallèlement (3 colonnes composées de 5 fragments). Pour que les lames soient observables au microscope, les fragments sont recouverts de lactoglycérol 6% avant d'être recouverts d'une lamelle. Près de 200 observations ont été réalisées par lame et donc par système racinaire (soit entre 12 et 15 observations par fragment racinaire).

La méthode de Mc Gonigle (Mc Gonigle et al., 1990) permet d'évaluer le taux de colonisation racinaire des CMA au microscope optique. Elle consiste à observer 200 interesections et de compter le nombre d'intersections avec présence des structures fongiques (Figure 32).

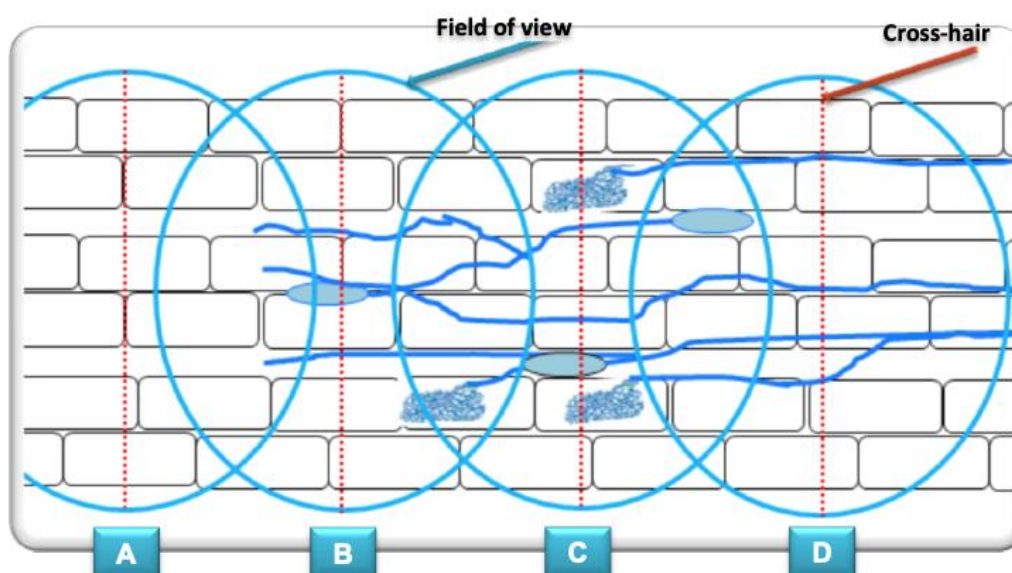


Figure 32. Représentation de l'évaluation du taux de colonisation racinaire par les CMA selon la méthode de Mc Gonigle et al. (1990) d'après le manuel écrit par le laboratoire de mycologie.

Plus simplement dit, on compte pour chaque ligne verticale espacée de manière homogène, la présence ou non d'une structure fongique traversant cette ligne: arbuscules, vésicules et/ou hyphes. Le comptage se fait selon 7 cas de figures (Tableau 6) :

Tableau 6. Tableau représentant le comptage des structures de CMA grâce à la méthode mise au point par McGonigle et al. (1990).

Structures traversées par la ligne imaginaire	Comptage
Aucune (A)	1 Négatif
Un ou plusieurs hyphes (D)	1 Hyphe
Hyphe + Arbuscule	1 Arbuscule
Hyphe + Vésicule (B)	1 Vésicule
Un ou plusieurs arbuscules	1 Arbuscule
Un ou plusieurs vésicules	1 Vésicule
Arbuscule + Vésicule (C)	1 Arbuscule + 1 Vésicule

Cette méthode permet d'évaluer le nombre d'observations négatives, le nombre d'observations d'arbuscules, de vésicules et d'hyphes ainsi que le nombre d'observations totales. Cela permet donc de quantifier les taux de colonisation (TC), arbusculaires (TA) et vésiculaires (TV), exprimés en pourcentage (Équation 1).

Équation 1. Calculs des taux de colonisation (TC), taux d'arbuscules (TA) et taux de vésicules (TV).

$$TC = \frac{\text{Observations totales} - \text{Négatifs}}{\text{Observations totales}}$$

$$TA = \frac{\text{Arbuscules}}{\text{Observations totales}}$$

$$TV = \frac{\text{Vésicules}}{\text{Observations totales}}$$

4.5.3 Développement de la bactérie PGPR

Un dénombrement des bactéries présentes dans la solution a été réalisé à deux reprises : à la fin de la première et de la deuxième circulation.

Cinq dilutions de solution nutritive ont été réalisées par échantillon dans des tubes Eppendorf® 2 mL stériles (Figure 33). Pour réaliser la première dilution, 0,1 mL de solution nutritive concentrée à 100% a été mélangé à 0,9 mL d'eau physiologique. Ensuite, les autres dilutions ont été faites en cascade en utilisant 0,1 mL de la dilution précédente, à nouveau mélangée à 0,9 mL de mélange d'eau physiologique. Finalement quatre dilutions de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ont été obtenues ainsi que l'échantillon non dilué 10^0 .

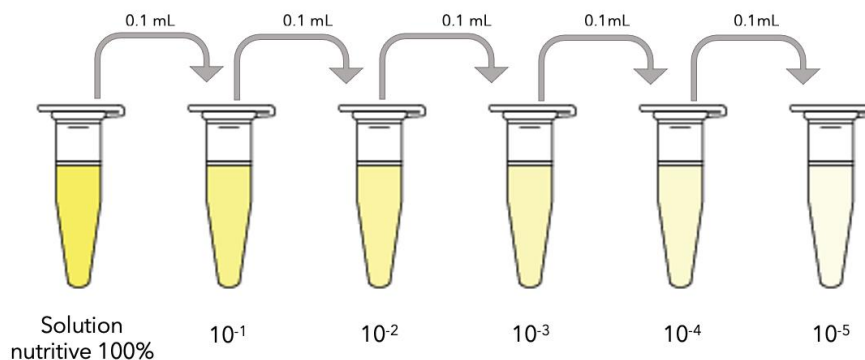


Figure 33. Cinq dilutions de solution nutritive.

Un dénombrement des bactéries présentes dans les racines a été réalisé à deux reprises : avant la première circulation pour vérifier la bonne inoculation et à la fin de l'expérience.

Après l'arrachage et la pesée des racines, une partie de celles-ci ont été mises en suspension dans 5 mL d'eau physiologique dans un tube Falcon de 50 mL. Une vingtaine de billes de verre stériles ont été ajoutées à chaque récipient qui a été agité pendant 3 min au vortex. Quatre dilutions de suspension racinaire ont été faites par échantillon dans des tubes Eppendorf® 2 mL stériles. Pour réaliser les dilutions, 0,1 mL de suspension concentrée à 100% ont été mélangé à 0,9 mL d'eau physiologique afin d'obtenir la première dilution à 10^{-1} . Ensuite, les autres dilutions ont été faites en cascade en utilisant 0,1 mL de la dilution précédente, à nouveau mélangée à 0,9 mL de mélange d'eau physiologique. Finalement quatre dilutions de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ont été obtenues.

Pour les systèmes racinaires non-bactérisés, 0,1 mL des dilutions à 10^0 , 10^{-1} mL de suspension/mL ont été prélevé et déposé dans 1 boîte de Petri contenant un milieu de culture *Lysogeny Broth* (LB). Pour les systèmes racinaires bactérisés, les dilutions à 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} de suspension/mL ont été prélevés et déposés dans 2 boîtes de Petri contenant ce même milieu. Pour étaler de manière homogène la solution, des billes de verre ont été utilisées.

Les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C pendant 48h. Toutes les colonies ont été comptées pour quantifier la microflore totale. Afin de détecter la souche de *B. velezensis* GA1 portant le gène codant la GFP, les boîtes ont été passées en-dessous d'une lampe UV. Ceci a permis de compter les colonies fluorescentes, dont celles de *B. velezensis* GA1 GFP et donc d'estimer la concentration bactérienne présente dans l'échantillon.

4.5.4 Analyses minérales

4.5.4.1 Teneur en P dans la solution nutritive

Pour l'analyse de la teneur en P dans la solution nutritive, des échantillons ont été collectés dans des tubes Falcon de 50 mL, comme expliqué précédemment.

Les échantillons ont été envoyés à la plateforme MOCA pour l'analyse du P total par spectrométrie d'absorption atomique. Une dilution 2 fois (5 ml d'échantillon de solution nutritive et 5 ml d'eau millipore) et une digestion avec 50 µL de HNO₃ Suprapur 65% ont été réalisées avant analyse au spectrophotomètre ICP-OES sur ICAP 6100 (Thermo scientifique) (voir analyse dans la section 4.5.4.3).

La quantité de Pi dans la solution nutritive en ppm a été transformée en mg de Pi par kg de solution nutritive par rapport au facteur de dilution (le poids de l'échantillon additionné au poids de l'eau dans lequel il est dilué divisé par le poids de l'échantillon). Ensuite la quantité de P total a été standardisée par rapport à ce qui a été absorbé dans la solution circulant dans les pots non-végétalisés, grâce à cette formule (Garcès-Ruiz et al., 2017) (Équation 2):

Équation 2. Quantité de phosphore standardisée

$$\text{Quantité de P standardisée} = [P]_{xh*} = [P]_{xh} + ([P]_{\text{témoin-0h}} - [P]_{\text{témoin-xh}})$$

Où

$[P]_{xh*}$: Quantité de P standardisée

$[P]_{xh}$: la quantité de Pi dans la solution nutritive (mg/kg)

En effet, la quantité de Pi absorbée par le substrat au temps analysé est additionnée à la quantité de Pi au temps x détectée dans la solution nutritive. Cela permet de faire nos analyses sur le Pi absorbée uniquement par la plante et pas par la plante et le substrat dans les bouteilles.

Le pourcentage de déplétion a été calculé grâce à cette formule (Équation 3):

Équation 3. Pourcentage de déplétion

$$\text{Pourcentage de déplétion (\%)} = \left(\frac{[P]_{xh*}}{[P]_{0h}} \right) * 100$$

4.5.4.2 Analyse minérale de la partie aérienne et système

La teneur en P des parties aériennes et racinaires a été évaluée dans les échantillons récoltés à la fin de la troisième circulation. Ces échantillons ont été séchés à 70°C pendant 5 jours puis coupés en petits morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux. Un petit volume de feuilles ou de racines a été pris pour chaque échantillon et pesé (environ 500 mg ont été analysés).

A ces échantillons, 6 ml de HNO₃ 65% Suprapur pour les parties aériennes et 8 ml pour les parties racinaires ont été ajoutés aux béchers contenant les échantillons. Chaque bécher a été recouvert d'un verre de montre et placé sur une plaque chauffante à 60°C (Figure 34). La digestion a eu lieu pendant une nuit (environ 18h). Quatre ml ont été ajoutés aux parties racinaires pendant 5 heures pour que toute la matière organique soit digérée.



Figure 34. Digestion des échantillons avec 6 ml de HNO_3 sur plaque chauffante à 60°C recouvert d'un verre de montre.

Ensuite, les solutions obtenues ont été évaporées sur une plaque chauffante à 120°C . Les résidus obtenus ont été dissous avec 4 ml d'eau « régale » (3ml HCL 38% pour 1 ml HNO_3 65% Suprapur) (Figure 35). La solution a ensuite été mise dans un ballon jaugé de 25ml et complétée avec de l'eau millipore.



Figure 35. Les résidus ont été dissous avec 4 ml d'eau « régale » (3ml HCL 38% pour 1ml HNO_3 65%).

Finalement les solutions ont été filtrées à l'aide de papier filtre Whatman (grade 41) de porosité de 20 micromètres (Figure 36) et les solutions finales ont été analysée par spectrométrie d'absorption atomique ICP-AES sur ICAP 6100 (Thermo scientifique).



Figure 36. Les solutions ont été filtrées à l'aide de papier filtre Whatman (grade 41) de porosité de 20 micromètres.

4.5.4.3 Paramètres analytiques de l'ICP-OES

La concentration en P dans la solution nutritive et dans les parties aériennes et racinaires du blé ont été analysées via une ICP-OES iCAP 6500 (Thermo Fisher Scientific) avec les paramètres analytiques suivants :

- Mode d'observation de l'émission spectrale: DUAL Radial-Axial
- Temps de lecture: 10 s / Axial – Radial - Low wavelength - High WL / 3 runs
- Nébuliser: quartz concentric
- Chambre de nébulisation: Glass cyclonic
- Torche: Duo quartz, centre tube 2 mm ID
- Puissance du générateur: 1150 W
- Débit d'argon de nébulisation: 0.5 L/min
- Débit d'argon auxiliaire: 1.0 L/min
- Débit d'argon plasmagène: 14 L/min
- Débit de la pompe d'échantillonnage: 50 rpm

Le P a été déterminé dans les raies d'émission suivants : 177.495 nm, 178.284 nm, 185.942 nm, 213.618 nm et 214.914 nm. La limite de détection se situe entre 0.01 mg/l et 0.1 µg/l.

4.6 Analyses statistiques

Une ANOVA suivie d'un test de Student a été réalisée pour les données du pré-test.

Une ANOVA 2 suivie d'un test de Student a été réalisée la majorité des données de l'expérience finale (circulation 1 et 3).

Les hypothèses de normalité des données et d'homogénéité des variances ont été vérifiées grâce au test de Shapiro-Wilk et un test de Levene. Dans le cas où ces conditions n'ont pas

été remplies, des transformations ont été effectuées avec des fonctions de logarithme, carré, arcsin ou BoxCox en faisant varier le paramètre λ (Équation 4)

Équation 4. Transformation BoxCox, où y représente les valeurs transformées et x la valeur initiale.

$$y = \frac{x^\lambda - 1}{\lambda}$$

De telle manière, les hypothèses de normalité des données et d'homogénéité des variances sont satisfaites. Les variables concernées sont reprises dans le Tableau 7.

Tableau 7. Tableau des transformations des variables afin de satisfaire l'hypothèse de normalité. Le facteur λ se réfère à la transformation BoxCox; log représente une transformation logarithmique ; sqrt représente une transformation racine carrée.

	Transformation
Dénombrement de bactéries fluorescentes telles que <i>B. velezensis</i> GA1 dans les racines (UFC tot/100microlitre) effectué avant la première circulation	Log
Pourcentage d'eau dans les parties racinaires	Log
Pourcentage d'eau dans les parties aériennes	$\lambda = 0,5$
Poids sec aérien	Log
Flore totale dans les solutions nutritives	Log
Flore totale dans les racines	Log
Concentration en Phosphore dans les parties aériennes (mg/kg)	$\lambda = 0,5$

Les valeurs de taux de colonisation, le pourcentage d'eau dans les parties aériennes et racinaire ainsi que le pourcentage de P prélevé, ont été transformés afin de supprimer la borne supérieure par la racine du pourcentage et par son arcsinus : $\sin^{-1}(\sqrt{VTC}, TA, TV$ ou % d'eau dans les parties aériennes et racinaires ou % de Pi absorbée).

Premièrement, les analyses de la variance ont permis d'évaluer la validité de l'hypothèse nulle selon laquelle toutes les moyennes de chaque traitement sont identiques. Si la valeur p ($\text{Prob} > F$) est inférieure à 0,05, l'hypothèse nulle n'est pas acceptée, les moyennes sont statistiquement différentes. Dans le cas contraire, si la valeur p est supérieur à 0,05 l'hypothèse nulle ne peut pas être rejeté », on ne peut pas conclure que les moyennes soient statistiquement différentes.

Dans un second temps, un test t ou test de Student est utilisé afin de déterminer l'influence ou non du ou des paramètre(s) et, dans le cas de deux paramètres, leurs interactions. Les tests t permettent d'évaluer la validité de l'hypothèse nulle selon laquelle la valeur du

paramètre testé est égale à zéro. Si la valeur t ($\text{Prob} > t$) est inférieure à 0,05, l'hypothèse nulle n'est pas acceptée, le paramètre est supérieur à zéro et a donc une influence.

Finalement, pour l'expérience finale, l'ANOVA 2 et le test de Student ont été suivis d'un test HSD de Tukey pour analyser l'interaction entre les deux paramètres (colonisation mycorhizienne et colonisation bactérienne).

Cependant, pour les données :

- De colonisation racinaire totale à 82 jours
- De colonisation d'arbuscule à 82 jours
- De colonisation de vésicule à 82 jours
- Le dénombrement de bactéries fluorescentes telles que *B. velezensis* GA1 dans la solution nutritive (CFU tot/100microlitre).
- Le dénombrement de bactéries fluorescentes telles que *B. velezensis* GA1 dans les racines (CFU tot/100microlitre).
- De concentration en phosphore dans la partie racinaire (mg/g)

La normalité n'a pas pu être obtenue et le test de Wilcoxon a donc été utilisée pour déterminer s'il y a un effet significatif ou non de la mycorhization et de la présence de bactéries. Le test de Wilcoxon est un test non paramétrique résistant aux valeurs aberrantes et qui ne nécessite pas de normalité.

Pour la deuxième expérience, des tests de corrélations entre les différentes variables ont été effectués. Pour ces tests, ce sont les variables de chaque plante qui ont été testées.

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel JMP.

5. Résultats

5.1. Résultats du pré-test : prélèvement du Pi par les plantes mycorhizées et non-mycorhizées dans la solution de Hoagland low-P

Le prélèvement en P dans la solution nutritive a été estimé sur une période de 54 heures (0, 6, 24, 48 et 54h) pour déterminer la dynamique de prélèvement par les plants de blé M et NM.

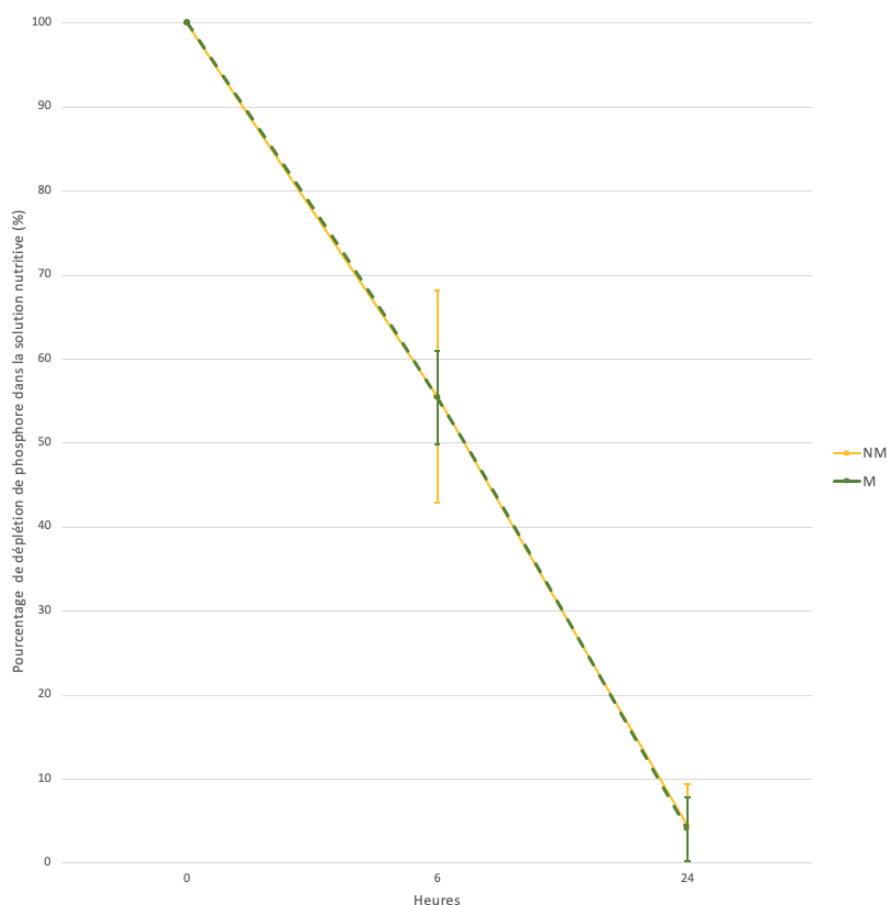


Figure 37. Pourcentage de déplétion de Pi (%) dans la solution nutritive circulant dans les pots de culture des plantes inoculées (M) ou non (NM) par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833, après 0, 6 et 24 heures. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 4 répétitions par traitement. L'absence d'astérisque (*) démontre de l'absence de différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux traitements selon une ANOVA 1, suivie d'un test de Student.

Les résultats dans la figure 37 montrent un prélèvement identique de Pi dans la solution nutritive par les plantes cultivées en présence comme en absence du CMA au cours du temps (Annexe 1). Il est à noter qu'après 24h de circulation de la solution nutritive dans les pots, les plants de blé avaient absorbé quasiment tout le Pi contenu dans la solution de Hoagland low-P. En effet, après 48 et 54h, les concentrations de P dans la solution de Hoagland low-P étaient en dessous des seuils de détection. Il a donc été décidé d'analyser le prélèvement de Pi dans la solution de Hoagland low-P sur des périodes plus courtes pour l'expérience finale.

5.2. Résultats de l'expérience finale : prélèvement du Pi par les plantes mycorhizées et non-mycorhizées, bactérisées et non-bactérisées dans la solution de Hoagland low-P en absence de pathogène

5.2.1 Dénombrements bactériens

Avant d'effectuer la première circulation, un dénombrement de bactéries fluorescentes telles que *B. velezensis* GA1 dans les racines a été effectué pour vérifier si la bactérie s'est bien établie sur les racines de blé (Tableau 8).

Tableau 8. Dénombrements bactériens (en UFC/100 μ L) des bactéries fluorescentes telles que *Bacillus velezensis* GA1 sur les racines de plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833.

Traitement	Dénombrement de bactéries fluorescentes telles que <i>B. velezensis</i> GA1 sur les racines (UFC tot/100 μ L)
NM B	1756,67 $\pm$ 1061,43 a
M B	1920,67 $\pm$ 955,95 a
Analyse de la variance	
(Prob > F)	0,7768

Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 3 répétitions de 5 dilutions du même plant pris au hasard. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 1.

Les résultats obtenus montrent que l'inoculation de *B. velezensis* a bien été effectuée mais qu'il n'existe aucune différence significative entre les traitements M et NM.

5.2.2 Analyse minérale

5.2.2.1 Prélèvement en P_i dans la solution nutritive

Le prélèvement en P_i de la solution nutritive a été estimé après 0, 6 et 12h de circulation de la solution nutritive Hoagland low-P dans les pots (les valeurs sont détaillées en Annexe 2).

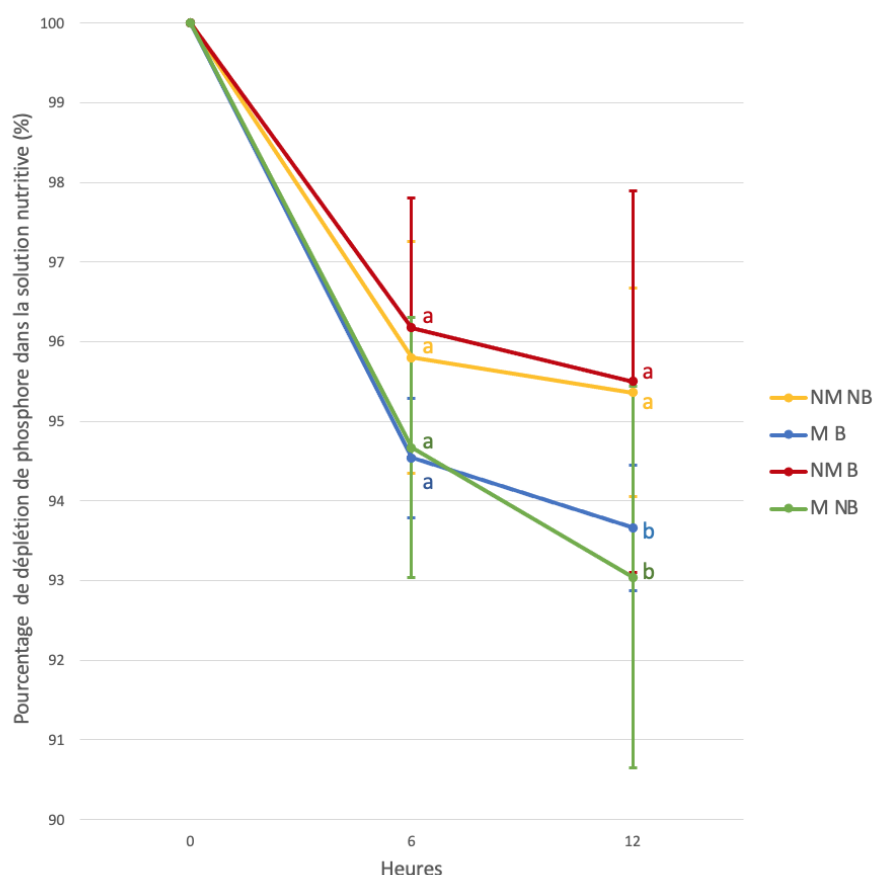


Figure 38. Pourcentage de déplétion de P_i (%) dans la solution nutritive circulant dans les pots de culture des plantes inoculées (M) ou non (NM) par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (B) ou non (NB) par la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, après 0, 6 et 12 heures lors de la 1^{ère} circulation. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 6 répétitions par traitement. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test test HSD-Tukey.

Les résultats dans la figure 38 montrent le prélèvement de P_i par les plantes mycorhizées ou non et bactérisées ou non dans la solution de Hoagland low-P, au cours du temps (Figure 38).

Après 6 et 12h de circulation de la solution nutritive dans les pots de culture, les plants de blé ont absorbé environ 5 et 6% du P initial dans la solution de Hoagland low-P, respectivement. Aucune différence significative n'est observée entre les plantes mycorhizées ou non et bactérisées ou non et aucune interaction entre l'effet bactéries et mycorhizes n'est déterminée, 6h après le début de la circulation. En revanche, au temps T_{12h} , une différence significative est observée entre les plants mycorhizés (M) et non-mycorhizés (NM), quel que soit leur niveau de bactérisation (p -value : 0,0021).

5.3. Résultats de l'expérience finale : prélèvement du Pi par les plantes mycorhizées et non-mycorhizées, bactérisées et non-bactérisées dans la solution de Hoagland low-P, après inoculation du pathogène

5.3.1 Développement de la plante

Quarante-huit heures après le début de la dernière circulation, les plants de blé ont été mesurés et récoltés pour y mesurer divers paramètres, décrits dans le tableau 9.

Tableau 9. Hauteur (cm), nombre de thalles/plants, nombre de feuilles chlorophylliennes/plant et surface foliaire (cm²) / plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB) par la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).

Traitement	Hauteur des plants (cm)	Nombres de thalles / plants	Nombre des feuilles chlorophylliennes / plants	Surface foliaire / plants (cm ²)
NM NB	37,68 ± 3,1 a	10 ± 1,41 a	28,67 ± 2,88 a	193,78 ± 26,43 a
NM B	41,17 ± 4,79 a	9,33 ± 1,37 a	25,83 ± 3,31 a	212,80 ± 14,00 a
M NB	40,22 ± 2,21 a	9,5 ± 1,97 a	27,67 ± 4,03 a	223,94 ± 9,16 a
M B	37,03 ± 3,19 a	9,83 ± 0,98 a	29,5 ± 2,59 a	218,45 ± 18,85 a
Analyse de la variance				
(Prob > F)	0,5711	0,8572	0,2673	0,0881
Effet (p-valeur)				
Bactéries	0,9162	0,7852	0,3267	0,9102
CMA	0,5763	1,0000	0,7101	0,0257
Bactéries*CMA	0,0281	0,4170	0,0938	0,1698

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type de 6 répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test HSD-Tukey. Les p-valeurs en gras montrent un effet significatif du facteur (ou p-valeur) sur le jeu de données.

Les résultats montrent que les plants de blé mesuraient en moyenne entre 37 et 41 cm. L'analyse statistique a montré qu'il existe une interaction entre l'effet « bactéries » et « CMA » sur la hauteur moyenne des plantes. Cela signifie que le degré de colonisation influe généralement sur l'effet des bactéries sur la croissance du blé et inversement. Cependant, l'analyse post-hoc, n'a pas permis de révéler une différence significative entre les différents traitements. Une tendance est cependant observée : les plantes NM B présentaient une légère augmentation de la hauteur par rapport à celles NM NB, alors que les plantes M B présentaient une légère diminution de leur croissance par rapport à leur témoin M NB. En

revanche, le nombre de thalles par plant et le nombre de feuilles chlorophylliennes total ne sont pas statistiquement différents.

Quant à la surface foliaire par plant, un effet du facteur « CMA » est démontré statistiquement, suggérant que les plantes M présentent une surface foliaire plus importante que les plantes NM, même si cela n'est pas démontré par le test post-hoc. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les plantes B et NB, quel que soit leur degré de mycorhization.

5.3.1.1 Pourcentage en eau relative et poids sec de la partie aérienne et du système racinaire

Les résultats dans le Tableau 10 montrent que les plants de blé contenaient entre 72,21 et 80,16 % d'eau relative dans les parties aériennes et entre 74,04 et 83,1 % dans les parties racinaires. Les analyses statistiques montrent un effet « CMA » sur les pourcentages en eau relative dans les parties aériennes des plants de blé, suggérant que les plants M contiennent davantage d'eau que les plants NM, même si cela n'est pas révélé par le test post-hoc. En revanche la présence ou absence de la bactérie n'a pas d'effet sur le pourcentage en eau relative dans la partie aérienne de la plante.

En revanche, un effet « bactérie » est observé sur le pourcentage en eau relative dans les parties racinaire. En effet une différence significative est observée entre les traitements B et NB. Les racines de blé B contiennent moins d'eau que les racines NB, quel que soit leur degré de mycorhization. L'association avec le CMA n'a, en revanche, aucun impact sur la teneur en eau relative des racines.

Tableau 10. Pourcentage en eau relative (%) dans la partie aérienne et dans le système racinaire des plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB) par la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).

Traitement	Pourcentage en eau relative dans la partie aérienne (%)	Pourcentage en eau relative dans la partie racinaire (%)
NM NB	72,21 ± 13,32 a	83,1 ± 3,25 a
NM B	78,22 ± 1,9 a	75,46 ± 1,58 b
M NB	78,82 ± 1,11 a	81,07 ± 2,61 a
M B	80,16 ± 1,42 a	74,04 ± 5,45 b
Analyse de la variance		
(Prob > F)	0,0770	0,0001
Effet (p-valeur)		
Bactéries	0,1576	0,0001
CMA	0,0282	0,5572
Bactéries*CMA	0,5977	0,1805

Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 6 répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test HSD-Tukey. Les p-valeurs en gras montrent un effet significatif du facteur (ou p-valeur) sur le jeu de données.

Au contraire, ni la présence/absence du CMA ou de la bactérie n'impacte le poids sec de la partie aérienne (tableau 11).

Quant au poids sec de la partie racinaire des plants de blé, les résultats du tableau 11 montrent que les plants inoculés avec *B. velezensis* GA1 présentent un poids sec statistiquement supérieur à celui de plants NB, quel que soit leur degré de mycorhization. Les différences de poids sec de la partie racinaire ne sont pas statistiquement expliquées par la présence de CMA ni par l'interaction entre ceux-ci et les bactéries.

Tableau 11. Poids sec de la partie aérienne et racinaire (g) des plants de blé inoculés (M) ou non (NM) par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB) par la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).

Traitement	Poids sec de la partie aérienne (g)	Poids sec de la partie racinaire (g)
NM NB	2,59 $\pm$ 1,18 a	1,2 $\pm$ 0,32 a
NM B	1,97 $\pm$ 0,37 a	2,15 $\pm$ 0,19 b
M NB	2,03 $\pm$ 0,14 a	1,61 $\pm$ 0,49 a
M B	1,83 $\pm$ 0,15 a	2,33 $\pm$ 0,46 b
Analyse de la variance		
(Prob > F)	0,3773	0,0002
Effet (p-valeur)		
Bactéries	0,1291	0,0001
CMA	0,3988	0,0748
Bactéries*CMA	0,8046	0,4441

Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 6 répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test HSD-Tukey. Les p-valeurs en gras montrent un effet significatif du facteur (ou p-valeur) sur le jeu de données.

5.3.2 Pourcentages de colonisation des racines de blé par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833.

Pour rappel, le taux de colonisation racinaire a été analysé à deux reprises : dans les plants de blé deux jours avant le transfert dans les pots de culture en conditions semi-hydroponiques, soit au jour 30 de la phase de pré mycorhization, ainsi qu'à la fin de la deuxième circulation.

D'après l'analyse du taux de colonisation du champignon (Tableau 5 – section matériels et méthodes), on peut observer que le pourcentage de colonisation racinaire dans le blé (M 30j) est élevé, il atteint 82,33%. Cependant les taux de colonisation arbusculaires et vésiculaires, qui atteignent 21,33 et 21% respectivement, sont plus bas que ceux analysés dans les plants de maïs donneur.

Les plants de blé non-inoculés avec le CMA ont été contrôlés au jour 30 de la phase de pré-mycorhization (NM 30j) et montrent que très peu de structures fongiques intra-racinaires. Ces structures observées proviennent sûrement d'un autre champignon du fait de l'absence d'arbuscules et de vésicules caractéristiques des CMA.

Le taux de colonisation a également été évalué à la fin de l'expérience 2, soit après 82 jours de culture, à l'arrachage des plants (tableau 12).

Tableau 12. Pourcentage de colonisation total, arbusculaires et vésiculaires (%) des racines de blé par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et bactérisés (B) ou non (NB), par la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).

Traitement	Colonisation racinaire totale (%)	Colonisation arbusculaire (%)	Colonisation vésiculaire (%)
M NB 82j	21,84 ± 17,42 a	0,33 ± 0,52 a	7,5 ± 6,16 a
M B 82j	27,84 ± 13,5 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
Effet p-valeur			
Bactéries	0,7614	0,9645	0,4691

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type de 6 répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 1, suivie d'un test de Student.

Les pourcentages de colonisation totaux, arbusculaires et vésiculaires atteignent en moyenne 24, 0,16 et 3,75% respectivement. Ces pourcentages de colonisation sont similaires, quelle que soit l'application de *B. velezensis* GA1 dans la rhizosphère du blé.

Il est à noter que d'après l'analyse du développement du champignon dans les racines de blé (Tableau 12) il peut être observé que le pourcentage de colonisation total arbusculaire et vésiculaire a, en règle générale, diminué au cours du temps. En effet, l'évaluation du taux de colonisation racinaire montre qu'après 82 jours, les pourcentages de colonisation racinaire totaux, arbusculaires et vésiculaires sont significativement inférieurs aux valeurs mesurées au jour 30 de la phase de pré-mycorhization (au moment du transfert en pot).

5.3.3 Dénombrements bactériens sur les racines et dans la solution nutritive

Un dénombrement bactérien a été effectué à la fin de la dernière circulation dans la solution nutritive et sur les racines, soit après 82 jours de culture dans la rhizosphère des racines de blé. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Dénombrements bactériens (en UFC/100 μ L) de la flore totale et des bactéries fluorescentes telles que *Bacillus velezensis* GA1 dans la solution nutritive et sur les racines de plantes inoculées (M) ou non (NM) avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1.

Traitement	Dénombrement de la flore totale dans la solution nutritive (UFC tot/100 μ L)	Dénombrement de la flore totale sur les racines (UFC tot/100 μ L)	Dénombrement de bactéries fluorescentes telles que <i>B. velezensis</i> GA1 dans la solution nutritive (UFC tot/100 μ L)	Dénombrement de bactéries fluorescentes telles que <i>B. velezensis</i> GA1 sur les racines (UFC tot/100 μ L)
NM NB	270,08 $\pm$ 67,21 b	44732,22 $\pm$ 24820,92 b	14,58 $\pm$ 11,3 a	5333,34 $\pm$ 8165,63 a
NM B	904,67 $\pm$ 808,98 a	45149,17 $\pm$ 45713,61 b	56,33 $\pm$ 96 a	152,78 $\pm$ 127,11 a
M NB	361,5 $\pm$ 214,38 b	222860 $\pm$ 121117,25 a	20,42 $\pm$ 15,41 a	56833,33 $\pm$ 137422,58 a
M B	1464,25 $\pm$ 1804,56 a	53446,67 $\pm$ 18405,45 b	67,67 $\pm$ 145,99 a	786,11 $\pm$ 1050,58 a
Analyse de la variance				
(Prob > F)	0,0463	0,0008	/	/
Effet (p-valeur)				
Bactéries	0,0095	0,0123	0,9769	0,4346
CMA	0,3445	0,0012	0,6426	0,9769
Bactéries * CMA	0,5455	0,0726	/	/

Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 6 répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test HSD-Tukey. Pour les dénombrements de bactéries fluorescentes telles que *B. velezensis* GA1 dans la solution nutritive et dans les racines un test non-paramétrique de Wilcoxon a été utilisé. Les p-valeurs en gras montrent un effet significatif du facteur (ou p-valeur) sur le jeu de données.

Un effet du facteur « bactéries » a été mesuré dans le dénombrement de la flore totale dans la solution nutritive. En effet, la concentration de la flore totale dans la solution nutritive des plants B est significativement supérieure à celui dans la solution des plants NB, quel que soit leur degré de mycorhization. Le nombre de colonies dans la solution n'est pas expliqué par la présence du CMA ni par l'interaction entre les deux micro-organismes.

Dans les racines, à la fois un effet « bactéries » et un effet « CMA » sont significatifs sur la concentration en flore totale sur les racines. En revanche, aucune interaction significative entre les deux micro-organismes n'a été observé. Après inoculation avec *B. velezensis* GA1, la flore totale augmente en comparaison avec les racines NB. Cela est particulièrement démontré chez les racines M. Quant à l'effet du facteur « CMA », il peut être observé que les racines M NB présentent une microflore bactérienne totale supérieure à celle mesurée chez les racines NM NB.

Malgré une tendance à ce que les bactéries fluorescentes, telles que *B. velezensis* GA1, soient plus élevées dans la solution nutritive des plants inoculés (B), cela n'a pas été révélé statistiquement. Il n'y a pas de différence statistique entre les différents traitements. De même, aucune différence significative de la concentration en bactéries fluorescentes, telles que *B. velezensis* GA1 n'est observé sur les racines, malgré une plus faible proportion de bactéries fluorescentes dans les traitements bactérisés.

5.3.4 Analyse minérale

5.3.4.1 Prélèvement en Pi dans la solution nutritive

Le prélèvement en Pi de la solution nutritive a été estimé sur une période de 48 heures (0, 3, 6, 12, 24, 36 et 48h). Suite aux résultats de la 1^{ère} circulation où le prélèvement de P a été relativement faible sur 12h, les temps 0, 12, 24 et 36h ont été analysés pour cette circulation.

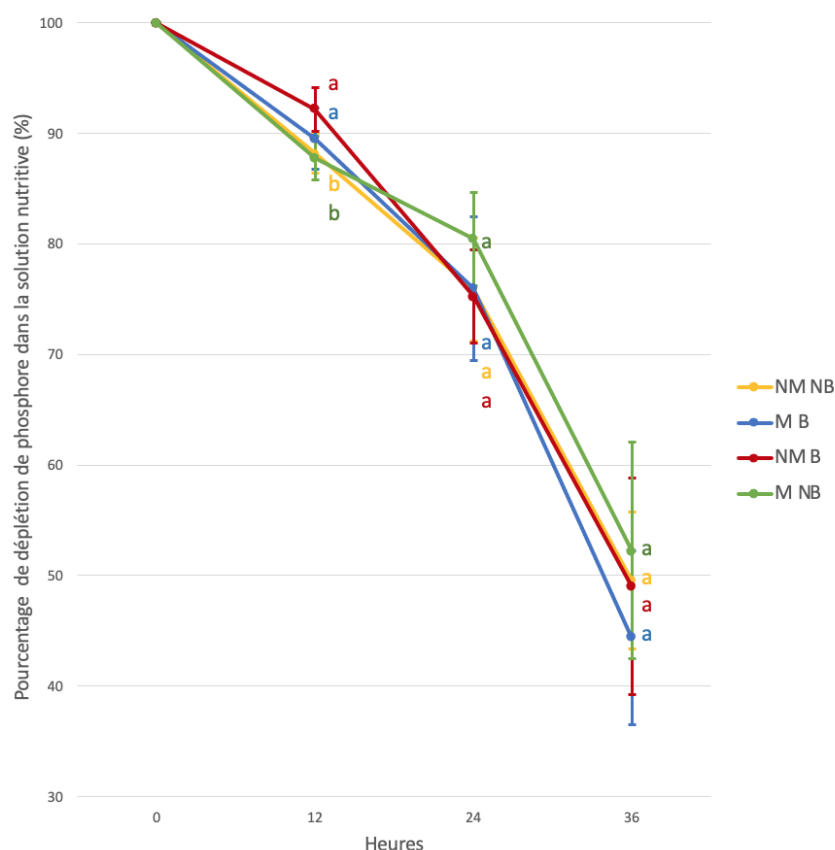


Figure 39. Pourcentage de déplétion de Pi (%) dans la solution nutritive circulant dans les pots de culture des plantes inoculées (M) ou non (NM) par le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (B) ou non (NB) par *Bacillus velezensis* GA1, après 0, 12, 24 et 36 heures. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 6 répétitions par traitement. Les points suivis d'une même lettre ne sont pas significativement différents ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2 suivie d'un test HSD-Tukey.

Les résultats de la figure 39 montrent un prélèvement de Pi par les plantes en présence comme en absence du CMA et de la bactérie, dans la solution de Hoagland low-P, au cours du temps. Après 36h, les plants de blé ont prélevé environ 50% du P initial présent dans la solution nutritive.

Au temps T_{12h}, les plants associés à *B. velezensis* GA1 ont prélevé significativement moins de Pi que les plants NB, quel que soit leur degré de colonisation mycorhizienne. Au contraire, le prélèvement de Pi n'est impacté, ni par la présence de CMA, ni par l'interaction des deux micro-organismes.

Au temps T_{24h} et au temps T_{36h}, le prélèvement de Pi par les plants de blé associés ou non à la bactérie et/ou au CMA reste similaire.

5.3.4.2 Concentration en P dans la partie aérienne et racinaire

La concentration et la quantité de P dans le système racinaire et la partie aérienne ont été évaluées à la fin de la 3^{ème} circulation, soit 67 jours après le transfert en pot (Tableau 14).

Tableau 14. Concentration (mg/kg) et quantité (mg/plante) en P dans les parties aériennes et racinaires des plantes inoculées (M) ou non (NM) avec le CMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (B) ou non (NB) avec la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, au moment de la récolte (soit 82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).

Traitements	Concentration en phosphore dans la partie racinaire (mg/kg)	Concentration en phosphore dans la partie aérienne (mg/kg)	Quantité de phosphore dans la partie racinaire (mg)	Quantité de phosphore dans la partie aérienne (mg)
NM NB	1335,59 ± 310,84 a	2133,70 ± 360,53 a	7,45 ± 1,87 a	7,31 ± 1,55 a
NM B	687,97 ± 106,38 b	2196,42 ± 309,29 a	4,93 ± 0,92 b	7,99 ± 1,66 a
M NB	1311,42 ± 300,03 a	2651,65 ± 460,78 a	8,14 ± 2,06 a	9,37 ± 0,79 a
M B	720,59 ± 93,27 b	2371,75 ± 236,28 a	4,85 ± 0,45 b	8,79 ± 1,18 a
Analyse de la variance				
(Prob > F)	< 0,0001	0,0793	0,0010	0,0710
Effet (p-valeur)				
Effet bactéries	0,0001	0,5190	<0,0001	0,9240
Effet CMA	0,9310	0,0241	0,6115	0,0164
Bactéries * CMA	/	0,2671	0,5266	0,2641

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type de 6 répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test HSD-Tukey. Pour la concentration en phosphore dans la partie racinaire un test non-paramétrique de Wilcoxon a été utilisé. Les p-valeurs en gras montrent un effet significatif du facteur (ou p-valeur) sur le jeu de données.

Le P dans la plante est représenté ici de deux manières, ou en concentration de P donc en mg/kg de plante ou en quantité (mg) par plante (Annexe – Figure 41, 42, 43, 44).

Dans les racines, les résultats montrent que la concentration et la quantité en P des plants qui ont été inoculés par *B. velezensis* GA1 (B) sont significativement inférieures aux plants NB. En

revanche ni la présence de CMA, ni l'interaction entre les deux facteurs n'expliquent les différences entre traitements.

Dans les parties aériennes, l'inverse est observé. Les résultats montrent que la concentration et la quantité en P dans la partie aérienne des plants inoculés avec *R. irregularis* MUCL 41833 (M) sont significativement supérieures aux plants NM, même si cela n'est pas révélé par le test post-hoc. En revanche, ni la présence de bactéries, ni l'interaction entre les deux facteurs n'expliquent les différences entre traitements.

La quantité de P total par plante est influencée par les facteurs 'bactéries' et 'CMA' mais pas par l'interaction des deux. En effet, les plantes bactérisées présentent une quantité de P inférieure aux plantes NB, ce qui est particulièrement visible chez les plants M. Par ailleurs, les plants M possèdent généralement une plus forte quantité de P que les plants NM, même si cela n'est pas révélé par le test post-hoc.

Tableau 15. Concentration (mg/kg) et quantité (mg) de phosphore dans les parties aériennes et racinaires des plantes inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de *Zymnoseptoria Tritici*, estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot).

Traitements	Quantité de phosphore total (mg)
NM NB	14,75 ± 2,38 ab
NM B	12,91 ± 1,56 b
M NB	17,51 ± 2,21 a
M B	13,64 ± 1,32 b
Analyse de la variance	
(Prob > F)	0,0028
Effet (p-valeur)	
Effet bactéries	0,0016
Effet CMA	0,0380
Bactéries * CMA	0,2103

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type de 6 répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), selon une ANOVA 2, suivie d'un test HSD-Tukey. Les p-valeurs en gras montrent un effet significatif du facteur (ou p-valeur) sur le jeu de données.

6. Discussion

Depuis longtemps, la lutte contre l'agent *Z. tritici* repose principalement sur l'utilisation de variétés de blé résistantes et sur l'application de fongicides, notamment les strobilurines, les dérivés de benzimidazole et les triazoles. Suite à l'apparition rapide de souches fortement résistantes aux strobilurines et aux dérivés de benzimidazole, ces deux classes de produit ont été retirées du marché. Aussi, depuis le début du 21^{ème} siècle, la fréquence de souches exprimant des résistances moyennes à fortes aux triazoles, a augmenté drastiquement (Yzerbyt, 2018) .

En agriculture, une des solutions étudiées pour lutter contre cet agent repose sur l'utilisation de microorganismes, comme les CMA et PGPR, qui forment déjà naturellement des associations avec les plantes. Ces associations plantes – microorganismes présentent des intérêts multiples pour les plantes cultivées. Cependant, même si l'effet de ces microorganismes seuls sont bien connus, la combinaison des CMA et PGPR pour la nutrition phosphatée des plantes est, à l'heure actuelle, peu étudiée.

Ce mémoire a donc pour objectif de tester les effets de deux microorganismes (*R. irregularis* et *B. velezensis*) combinés sur le développement du froment et le prélèvement de Pi, en conditions de serres avant et après l'application d'un stress biotique, comme l'inoculation du phytopathogène *Z. tritici*.

6.1. Pré-test

6.1.1 Analyse minérale

6.1.1.1 Prélèvement en Pi dans la solution nutritive

Lors du pré-test, il n'y a eu aucune différence dans le prélèvement du Pi entre plantes M et NM, contrairement à d'autres plantes comme le maïs ou la luzerne dans les mêmes conditions expérimentales (Garcés-Ruiz et al., 2017 ; Calonne-Salmon et al., 2018).

Une première hypothèse à ce résultat serait que la colonisation racinaire par le CMA ne se soit pas bien établie. En effet, quelques racines ont été prélevées aléatoirement avant de transférer les plants dans les bouteilles. Cependant, le taux de colonisation n'a pas été quantifié précisément et n'a pas été analysé juste avant d'effectuer la circulation du pré-test. Il est donc possible que la colonisation ne se soit pas bien établie, ce qui expliquerait le manque d'effet « CMA ». Une autre explication possible serait une croissance forte des racines dans nos conditions de culture alors que la colonisation des racines par le CMA serait plus lente, et induirait un effet « dilution ». En effet, lorsque les plants de blé transférés dans les pots de circulation sont arrosés pendant 15 jours avec la solution nutritive, les racines se développent très rapidement et il est possible que la colonisation des nouvelles racines ne

soit pas aussi rapide. Il est alors probable que le pourcentage de colonisation soit faible et n'induisse pas d'effet significatif sur le prélèvement de P.

Lors du prétest, le blé semble avoir absorbé la majorité du Pi disponible dans la solution nutritive après 12 heures de circulation. Ceci peut être expliqué par le fait que la quantité de Pi absorbé est souvent relativement plus importante en début qu'en fin de cycle de végétation. En effet, le blé absorbe 70 % de ses besoins en P entre le tallage et la floraison (Gachon, 1988).

6.2. Expérience finale

6.2.1 Diminution des pourcentages de développement du CMA dans les racines au cours du temps

D'après l'analyse du développement du champignon, il peut-être observé que le pourcentage de colonisation total, arbusculaire et vésiculaire a diminué drastiquement après le transport en pot jusqu'à la récolte (soit durant 52 jours). Ceci peut être expliqué par le transfert physique des plantules pré-mycorhizés dans un nouveau substrat dans les pots du système circulatoire. En effet, le transfert a pu casser des hyphes extra-racinaires et une partie des racines du froment, induisant un stress et ralentissant la croissance du CMA dans ce nouveau substrat.

D'autre part, comme pour le pré-test, il est possible d'imaginer un effet de dilution de la colonisation des racines, soit que les racines se soient développées beaucoup plus rapidement que le CMA.

La diminution de colonisation analysée à la fin de la deuxième circulation pourrait s'expliquer également par le fait que les feuilles devenaient sénescentes et que donc la photosynthèse pouvait être réduite. En effet, au moment de l'arrachage, les plantes étaient en stade de fin de tallage. Bien qu'Olsson et al. (2010) ont montré un maintien de l'allocation en hydrate de carbone de la plante vers le CMA en cas de réduction de luminosité, Shi et al. (2014) ont démontré que l'ombrage réduit la colonisation des racines par les CMA. On peut donc émettre l'hypothèse que lorsque la photosynthèse diminue, il est probable que moins d'hydrates de carbone ne soient acheminés vers le CMA, limitant sa croissance.

Par ailleurs, aucun effet bactérien significatif n'a été observé sur le taux de colonisation racinaire, contrairement aux résultats obtenus par Ferreira et al. (2020) et Saia et al. (2015), qui ont montré que la présence de bactéries permet une minéralisation de nutriments dans la rhizosphère et permet donc un meilleur développement des CMA. Dans nos conditions expérimentales, les minéraux étant déjà totalement disponibles pour le CMA et la plante, ce bénéfice a possiblement été amoindri.

6.2.2 Effet de *Rhizophagus irregularis* sur le développement du blé, le prélèvement et l'accumulation de P

Les résultats ont tout d'abord montré que les surfaces foliaires chlorophylliennes totales des plants M sont significativement supérieures aux plants NM. Ceci a également été observé sur le mil (*Pennisetum glaucum*) inoculé par le CMA *Glomus aggregatum* pour lequel la sénescence, estimée par la proportion de surfaces vertes en fin d'expérience, a été plus précoce pour les plants NM que pour les plants M (Plenchette et al., 2000). Ceci pourrait être expliqué par le besoin en ressources carbonées produites par l'activité photosynthétique de la plante hôte (Smith et Read, 2008). La plante a donc tout intérêt à maintenir une activité photosynthétique plus élevée le plus longtemps possible pour pouvoir subvenir aux besoins du CMA. En plus d'une augmentation de l'activité photosynthétique Feng et al. (2002) et Aroca et al. (2007) ont également démontré que la présence de CMA limitait la déshydratation des feuilles et donc qu'elles restaient plus vertes que les feuilles des plants NM. Des résultats similaires ont été obtenus dans nos conditions de culture à la fin de l'expérience. Les pourcentages d'eau dans les parties aériennes analysées des plants M en fin de circulation étaient généralement supérieurs par rapport à ceux des plants NM.

En revanche, l'inoculation avec le CMA n'a pas permis de mesurer des différences de poids sec de la partie aérienne et racinaire et la hauteur des plants de blé. Contrairement à nos résultats, la littérature rapporte dans la grande majorité des cas d'accroissements de biomasse en présence de CMA (Smith et Read, 2008), notamment chez le blé cultivé au champ (Smith et Read, 2008, Pellegrino et al., 2015). Au contraire, d'autres études montrent une diminution de la croissance des plantes M et une diminution de la production de biomasse, en comparaison aux plantes NM (Kahiluoto et al., 2000; Valentine et al., 2001). Ceci pourrait être lié à une disponibilité suffisante des éléments nutritifs pour toutes les plantes M ou non, résultant en l'absence de différences comme observé par Colpaert et al. (1999). Dans nos conditions de culture, les plantes ayant accès à suffisamment d'éléments nutritifs, il est possible que l'association soit moins efficace, les plantes ayant moins besoin du CMA pour combler leurs besoins en minéraux. L'absence de différences significatives entre plantes M et NM pourrait également être expliquée par un déséquilibre entre le flux de carbone vers le CMA en échange d'éléments minéraux (Grant et al., 2005). En effet, il est possible qu'un flux important de C vers le CMA ait été faiblement compensé par le transport de minéraux du CMA vers la plante. Cependant le taux de colonisation étant faible en fin d'expérience dans les racines, cette hypothèse semble moins probable.

Lors de la première circulation, au temps T_{12h} , une différence significative dans le prélèvement du Pi entre plantes M et NM a été mesuré. Les plantes M ont prélevé davantage de Pi que les plantes NM, comme précédemment observé par Garcés-Ruiz et al. (2017) et Calonne-Salmon et al. (2018) chez le maïs et la luzerne. La différence d'absorption de Pi au temps T_{12h} n'est probablement pas attribuée uniquement au volume plus élevé de perlite exploré par les

racines colonisées par les CMA. En effet, selon les travaux de Colpaert et al. (1999) basé également sur l'utilisation d'un système circulatoire, la percolation constante de la solution nutritive empêche la formation de zones d'épuisement autour des racines et des hyphes. Par conséquent, les pourcentages élevés d'absorption de Pi des systèmes racinaires M ne peuvent pas être expliqué uniquement par une meilleure exploration du substrat par le champignon, mais plutôt par le grand nombre de transporteurs de Pi opérant dans les systèmes racinaires M que dans les racines NM (Colpaert et al., 1999). Selon l'expérience menée par Smith et al. (2003), il existerait un moment où il y aurait une perte de fonction de la voie d'absorption directe dans les racines de la plante colonisée par les CMA, qui pourrait être complète dans certaines symbioses avec des CMA. En effet, les gènes végétaux codant pour les transporteurs de P exprimés dans l'épiderme et les poils des racines peuvent être régulés à la baisse en réponse à la colonisation par les CMA.

En revanche, lors la deuxième circulation aux temps T12h, T24h et T36h, les résultats montrent que les plants M n'ont pas prélevé davantage de Pi que les plants NM. Ceci est potentiellement expliqué par une biomasse en fin d'expérience identique, résultant en des besoin en Pi identiques. Des observations similaires ont été faites par Calonne-Salmon et al., (2018) dans les mêmes conditions de culture. En effet, lors de la 1ère et 2ème circulation, un effet « CMA » a été observé sur le prélèvement de Pi, qui disparaît à la 3^{ème} circulation quand les plantes commencent leur floraison. Une hypothèse serait que l'effet « CMA » disparaît après les 1^{ers} stades du cycle de vie du blé.

Même si aucun symptôme dû au pathogène *Z. tritici* n'a pu être observé, l'inoculation de ce pathogène a possiblement induit un stress à la plante. Selon Jemmali (2015), la plante enclenche déjà des réponses durant les 5 jours qui suivent l'inoculation de *Z. tritici*. Les CMA peuvent rentrer en compétition directe avec les organismes phytopathogènes, et ce notamment en compétition pour la disponibilité des nutriments, les photosynthétats et les sites d'infection sur la racine (Cordier et al., 1996) ; (Dalpé, 2005) ; (M. Pozo et al., 2013) ; (Wehner et al., 2010) (Whipps, 2004). Cependant, *Z. tritici* étant un pathogène aérien, une interaction directe avec le CMA est peu probable. Une hypothèse serait donc que la plante ait activé ses mécanismes de défenses pour lutter contre un pathogène, et ceux-ci pourraient impacter négativement le développement du CMA, et donc induire une réduction du prélèvement en Pi.

En fin d'expérience, les résultats montrent que la concentration et la quantité en P dans les parties aériennes des plants inoculés par *R. irregularis* MUCL 41833 (M) sont significativement supérieurs aux plants NM, comme rapportés par Pellegrino et al. (2015) dans leur méta-analyse chez le blé cultivé au champ. Ces résultats sont également en lien avec une meilleure absorption du Pi lors de la 1^{ère} circulation. Fiorilli et al. (2013) ont suggéré que, une fois que les CMA ont satisfait leurs besoins en Pi, la plupart du flux de P est orienté vers l'hôte. Les résultats obtenus dans le présent travail suggèrent une meilleure translocation du P chez les

plants M avec potentiellement des conséquences positives sur la qualité du grain en fin de croissance. Une meilleure accumulation de P dans les parties aériennes du blé a été recensée dans la méta-analyse achevée par Pellegroni et al. (2015), en lien avec une meilleure accumulation de P dans les grains et la paille. Une meilleure translocation explique également l'absence d'accumulation de P dans les racines, et donc que les concentrations et quantités de P dans les racines soient égales entre plantes M et NM.

6.2.3 Développement de la population bactérienne et de *Bacillus velezensis*

Malgré une tendance à ce que les bactéries fluorescentes telles que *B. velezensis* GA1 dans la solution nutritive soit plus élevée, cela n'a pas été révélé statistiquement. De même, malgré la plus faible proportion de bactéries fluorescentes dans les traitements bactérisés, aucune différence significative n'est observée entre les traitements bactérisés (B) et non-bactérisés (NB).

La grande quantité de colonies fluorescentes observées sur les systèmes racinaires des traitements NB, peut s'expliquer par le développement d'une autres bactérie naturellement fluorescente, possiblement des *Pseudomonas*. Or, dans les racines qui ont été inoculées par *B. velezensis*, une compétition entre celles-ci et d'autres bactéries pourrait expliquer un dénombrement plus faible.

L'absence de différence statistique peut également s'expliquer par les très grandes variations des moyennes. Celles-ci sont dûes à un manque de précision pour calculer le dénombrement. En effet, la lampe fluorescente n'était pas adéquate pour révéler la fluorescence de *B. velezensis* GA1.

6.2.4 Effet de *Bacillus velezensis* sur le développement du blé, le prélèvement et l'accumulation de P

Le poids sec de la partie racinaire des plants inoculés avec *B. velezensis* était statistiquement supérieur à celui de plants non-inoculés. Nos résultats corroborent de nombreux articles scientifiques montrant une augmentation de la croissance et du développement des plantes inoculées avec une PGPR (Kasim et al., 2012 ; Abd El-Daim et al., 2014), en lien avec une meilleure nutrition des plantes hôtes. Cependant, nos résultats ont montré que les racines des plantes B contenaient moins de P que celles NB, en lien avec un plus faible prélèvement de Pi dans la solution nutritive, comme démontré à 12h lors de la dernière circulation. Il peut être suggéré que la réduction de P dans les racines est le résultat d'un stress nutritif. En effet, dans leur méta-analyse, Qi et al. (2019) ont signalé que les plantes ont tendance à allouer plus de biomasse aux racines dans des conditions plus stressantes et pauvres en nutriments.

Comme mentionné précédemment, nos résultats lors de la deuxième circulation montrent qu'au temps T_{12h}, les plants, qui ont été bactérisés, ont prélevé significativement moins de

Pi que les plants NB. Ceci a également été observé dans l'étude réalisée par Talboys et al. (2014). Les auteurs ont constaté que les plants de blé inoculés par *B. amyloliquefaciens* FZB42 (appartenant au même 'groupe opérationnel *B. amyloliquefasciens*' que *B. velezensis* – Fan et al., 2017) entraînaient un taux d'absorption de Pi réduit dans des conditions de Pi externe faible par rapport aux témoins non-inoculés. La bactérie *B. amyloliquefaciens* FZB42, comme une grande partie des microbes de la rhizosphère, sécrète de l'auxine dans le cadre de son interaction avec la plante. Les résultats de cette étude ont démontré que l'application d'auxine exogène au système racinaire de *T. aestivum*, tout en étant capable de stimuler une augmentation de la production racinaire, a également réduit le taux d'absorption de Pi par unité de surface racinaire dans les sols à faible teneur en Pi. En effet, l'expression relative des gènes codant pour les transporteurs Pi cellulaires individuels tels que TaPHT1.8 et TaPHT1.10, est significativement inférieure dans les plants inoculés par *B. amyloliquefaciens* FZB42 par rapport au contrôle NB (après 24h de mesure). Dans nos conditions de culture, après 24h et 36h, les plants B ont prélevé des concentrations similaires en Pi que les plantes NB, suggérant une adaptation des plantes B et la mise en place d'alternatives pour prélever le Pi.

En ce qui concerne la concentration et la quantité en P dans la partie racinaire, les plants inoculés par *B. velezensis* (B) sont significativement inférieurs aux plants non-bactérisés (NB), en lien avec le plus faible prélèvement de Pi dans la solution. Ce résultat ne peut pas être expliqué par une plus forte allocation du P dans les parties aériennes car aucun effet positif dû à la présence de PGPR n'est observé. La concentration et la quantité de P dans les plantes entières (partie aérienne et partie racinaire) B sont donc significativement inférieures aux plantes NB, comme mesuré par Talboys et al. (2014). Cependant, de nombreux articles scientifiques ont obtenu des résultats contradictoires (Hemissi et al., 2020) (Vyas & Gulati, 2009). Cela démontre bien que les interactions entre plantes et bactéries de la rhizosphère restent complexes.

6.2.5. Interaction de *Bacillus velezensis* et *Rhizophagus irregularis*

Les bactéries PGPR sont capables de stimuler la croissance des plantes et la plupart des racines des plantes sont colonisées par des champignons mycorhiziens qui stimulent aussi généralement la croissance des plantes. Depuis peu, les interactions entre ces microorganismes et leurs potentiels effets synergiques sur la croissance et la nutrition des plantes commencent à être étudiés.

Les résultats obtenus dans le présent travail ne semblent montrer aucune interaction entre les microorganismes. En effet, les taux de colonisation de CMA ne sont pas affectés par l'inoculation de *B. velezensis* et réciproquement.

Par ailleurs, il existe très peu d'interaction entre les facteurs « CMA » et « bactéries » sur la croissance et le prélèvement de P par les plants de blé dans notre expérience. Seuls les résultats de hauteurs des plants ont montré une interaction entre l'effet 'bactéries' et 'CMA'.

Cela signifie que le degré de colonisation influe en général, négativement l'effet des bactéries sur la hauteur des plants de blé et inversement. Les CMA et PGPR semblent donc entrer en compétition puisque la hauteur est plus faible dans le traitement inoculé avec les deux microorganismes (M-B). Selon Hodge et Fitter (2010), les CMA peuvent utiliser de l'azote organique pour leur propre développement. Ceci pourrait expliquer une compétition entre les deux microorganismes pour les nutriments, comme l'azote et donc un effet négatif sur la hauteur de plants. Cependant, les résultats obtenus dans cette étude entrent en contradiction avec ceux trouvés par (Pivato et al., 2009). La promotion bactérienne (la souche C7R12 de *Pseudomonas fluorescens* et souche J5B4 de la famille des *Oxalobacteraceae*) de la mycorhization de *M. truncatula* par *F. mosseae* BEG12 a conduit à une croissance accrue de la plante, alors que chaque micro-organisme n'a eu aucun effet séparément.

A cette exception près, il n'y a donc pas d'effet synergique ni délétère de la combinaison des deux microorganismes sur les plants de blé de cette variété. On peut donc conclure que soit cette variété répond peu à cette combinaison, soit la combinaison de microorganismes n'est pas optimale et devrait être modifiée dans nos conditions de culture.

6.3. Limites des expériences et perspectives

Tout d'abord, il est important de noter que comme aucun symptôme suite à l'inoculation de *Z. tritici* n'a été observé, on ne peut pas assurer avec certitude que le pathogène a été perçu par la plante. Il serait donc intéressant de recommencer cette expérience avec un pathogène plus virulent ou un cultivar plus sensible à la septoriose. D'autres méthodes d'inoculation pourraient être plus adaptées. Par exemple, il serait envisageable d'inoculer le pathogène en faisant baigner les graines de blé dans un bain de conidies pendant 15 min comme dans les travaux de Shin et al., (2014)

Par soucis de temps, les mêmes plants de blé ont été utilisés pour la première circulation et la deuxième circulation de l'expérience finale. Comme discuté au point précédent, l'âge de la plante peut expliquer des différences de prélèvement de Pi. Il aurait été intéressant de pouvoir comparer des plantes (4 traitements différents) du même âge, la moitié inoculées avec *Z. tritici* et l'autre non.

Les racines du blé se sont fortement développées au cours des différentes circulations et les bouteilles contenant les plants de blé étaient peut-être trop limitants. Lors de l'arrachage, il a été observé que certaines racines avaient percé la membrane en nylon et bouchaient l'ouverture de la bouteille. Ceci aurait pu modifier les résultats de prélèvement de Pi.

Dans notre étude, nous avons démontré que les CMA et les PGPR ont pu apporter des bénéfices à la plante hôte. Cependant, il est probable que certains bénéfices n'aient pas été mesurés par les paramètres évalués. Par exemple, il serait peut-être intéressant de quantifier l'expression relative des gènes codant pour les transporteurs Pi cellulaires individuels tels que

TaPHT1.8 et TaPHT1.10 dans les 4 traitements différents. Pour avoir une réponse plus pertinente à la question du mémoire, il serait également intéressant de reproduire l'expérience en la prolongeant jusqu'au stade grain mature. Ceci nous permettrait de collecter des informations sur l'impact des micro-organismes sur le rendement et les pertes de rendements dû à *Z. tritici*. Cependant, ce genre d'expérience nécessiterait une période de vernalisation et une durée de culture longue (environ 10 mois) pour obtenir les résultats, donc trop longue pour pouvoir la réaliser dans le cadre d'un mémoire d'environ 1 an.

Finalement, le dénombrement bactérien de *B. velezensis* GA1 portant le gène codant la GFP n'a pas été réalisé avec beaucoup de précision. Le dénombrement a été effectué à l'aide d'une lampe UV et non pas à l'aide d'une caméra CCD (Charge-Coupled Device, dispositif à transfert de charge). Cette exposition révèle les colonies fluorescentes de bactéries *B. velezensis* GA1 porteuses du marquage GFP de manière plus précise.

7. Conclusion

L'agriculture a un rôle central dans la transition écologique. En effet, l'utilisation des pesticides synthétiques peut avoir des conséquences majeures pour l'Homme et son environnement. Le monde agricole doit donc mettre en place des alternatives afin de maintenir des rendements suffisant à nourrir la population mondiale.

Des méthodes de lutte alternative contre les maladies et ravageurs sont développées, notamment par l'utilisation de micro-organismes bénéfiques tels que les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) et les Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). En effet, ces organismes vivants révèlent de nombreux avantages pour la production végétale. Le projet MicroSoilSystem s'intègre parfaitement dans l'objectif de maintenir une production tout en réduisant l'impact néfaste des pesticides synthétiques sur la santé humaine et l'environnement.

L'objectif de ce mémoire était d'étudier le rôle d'un CMA (*R. irregularis* MUCL 41833) combiné ou non à une PGPR (*B. velezensis* GA1), sur la dynamique de prélèvement du phosphore inorganique (Pi) par le blé durant les premiers stades de développement de la plante et suite à une attaque de *Z. tritici*, responsable de la septoriose chez le blé. Cet objectif a été réalisé via un système de culture semi-hydroponique à circulation continue en conditions de serre.

Un effet « CMA » positif a été observé sur la surface foliaire, le prélèvement du Pi à certains stades du cycle de vie du blé et sur la concentration de P dans les parties aériennes. L'inoculation de *B. velezensis* a montré comme résultat un poids sec racinaire plus élevé.

Un effet indépendant de chaque micro-organisme a pu être observé. Cependant aucun effet synergique ni délétère de la combinaison des deux microorganismes sur les plants de blé de cette variété n'a été identifié. On peut donc conclure qu'il n'existe aucune interaction entre *B. velezensis* GA1 et *Rhizophagus irregularis* associé au blé. D'autres combinaisons devraient ainsi être étudiées pour trouver la meilleure avec la variété de blé utilisée.

Les résultats de ce mémoire démontrent bien la complexité de l'interaction entre micro-organismes de la rhizosphère bénéfiques pour les plantes, et l'intérêt d'étudier chaque combinaison sur chaque variété de plantes cultivées pour une potentielle utilisation au champ.

8. Bibliographie

- Abd El-Daim, I. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2019). *Bacillus velezensis* 5113 Induced Metabolic and Molecular Reprogramming during Abiotic Stress Tolerance in Wheat. *Scientific Reports*, 9(1), 16282. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52567-x>
- Abd El-Daim, I. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2014). Improved heat stress tolerance of wheat seedlings by bacterial seed treatment. *Plant and Soil*, 379(1), 337-350. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2063-3>
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824-827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Andrade, G., Mihara, K., Linderman, R. G., & Bethlenfalvay, G. (1997). Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 192, 71-79. <https://doi.org/10.1023/A:1004249629643>
- Aroca, R., Porcel, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2007). How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *The New Phytologist*, 173(4), 808-816. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01961.x>
- Aroca, R., Vernieri, P., & Ruiz-Lozano, J. M. (2008). Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2029-2041. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern057>
- Artursson, V., Finlay, R. D., & Jansson, J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>
- ARVALIS - institut végétale (2013). Septoriose—Maladie sur Blé tendre, blé dur, triticales. Consulté 2 avril 2021, à l'adresse <http://www.fiches.arvalis-infos.fr>
- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6), 457-464. <https://doi.org/10.1007/s005720050147>

- Bago, B., Pfeffer, P. E., Abubaker, J., Jun, J., Allen, J. W., Brouillette, J., Douds, D. D., Lammers, P. J., & Shachar-Hill, Y. (2003). Carbon Export from Arbuscular Mycorrhizal Roots Involves the Translocation of Carbohydrate as well as Lipid. *Plant Physiology*, 131(3), 1496-1507. <https://doi.org/10.1104/pp.102.007765>
- Bago, B., Pfeffer, P. E., Zipfel, W., Lammers, P., & Shachar-Hill, Y. (2002). Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Metabolism and transport in AM fungi. Plant and Soil*, 244(1), 189-197. <https://doi.org/10.1023/A:1020212328955>
- Barea, J.-M., Pozo, M. J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri197>
- Bednarek, J. (s. d.). Analyse fonctionnelle de TaGW2, une E3 ligase de type RING, dans le développement du grain de blé tendre (*Triticum aestivum*). 468.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1044-1051.
- Bianciotto, V., & Bonfante, P. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi : A specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 365-371. <https://doi.org/10.1023/A:1020544919072>
- Biermann, B., & Linderman, R. G. (1983). Use of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Roots, Intraradical Vesicles and Extraradical Vesicles as Inoculum *. *New Phytologist*, 95(1), 97-105. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1983.tb03472.x>
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1), 48. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Bonfante, P., & Requena, N. (2011). Dating in the dark : How roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 451-457. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.014>
- Bonfante-Fasolo, P. (1984). Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US882892688>

- Bonnot, T. (2016). Réponse du grain de blé à la nutrition azotée et soufrée : Étude intégrative des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement du grain par des analyses -omiques [Thesis, Clermont-Ferrand 2]. In [Http://www.theses.fr](http://www.theses.fr). <http://www.theses.fr/2016CLF22767>
- Breiman, A., & Graur, D. (1995). Wheat Evolution. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43(2), 85-98. <https://doi.org/10.1080/07929978.1995.10676595>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108-1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Buysens, C., Alaux, P.-L., César, V., Huret, S., Declerck, S., & Cranenbrouck, S. (2017). Tracing native and inoculated *Rhizophagus irregularis* in three potato cultivars (Charlotte, Nicola and Bintje) grown under field conditions. *Applied Soil Ecology*, 115, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.007>
- Cairns, L. S., Hobley, L., & Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis* : New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular Microbiology*, 93(4), 587-598. <https://doi.org/10.1111/mmi.12697>
- Calonne, M. (2012). Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorrhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis*. [Thèse de doctorat - Université du Littoral Côte d'Opale]. TEL archives ouvertes (01333596)
- Catégorisation du blé | Yara Belgique. (2018, juin 14). Yara België. <https://www.yara.be/fr-be/fertilisation/ble/categorisation-ble/>
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007-1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>
- Colpaert, J. V., VAN Tichelen, K. K., VAN Assche, J. A., & VAN Laere, A. (1999). Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *The New Phytologist*, 143(3), 589-597. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00471.x>

Commission Grandes cultures – Orge Brassicole—Plan de développement stratégique 2019 – 2029. (2019). 113.

Cordier, C., Gianinazzi, S., & Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant and Soil*, 185(2), 223-232. <https://doi.org/10.1007/BF02257527>

CRA-W. 2021. Livre Blanc Céréales.

CRAW (s. d.) Septoriose – Livre Blanc Céréales. Consulté 2 avril 2021, à l'adresse <https://www.livre-blanc-cereales.be/thematiques/maladies/froment/septoriose/>

Dalpé, Y. (2005). Les mycorhizes : Un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection*, 86(1), 53-59. <https://doi.org/10.7202/011715ar>

Declerck, S., Strullu, D. G., & Plenchette, C. (1998). Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem : A proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, 90(4), 579-585. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026946>

Duponnois, R., Hafidi, M., Wahbi, S., Sanon, A., Galiana, A., Baudoin, E., Sanguin, H., Bâ, A., Prin, Y., & Bally, R. (2013). La symbiose mycorhizienne et la fertilité des sols dans les zones arides : Un outil biologique sous-exploité dans la gestion des terres de la zone sahélo-saharienne. In A. Dia (Éd.), *La Grande Muraille Verte : Capitalisation des recherches et valorisation des savoirs locaux* (p. 349-367). IRD Éditions. <http://books.openedition.org/irdeditions/3304>

El Ouakfaoui, S., & Asselin, A. (1992). Multiple forms of chitosanase activities. *Phytochemistry*, 31(5), 1513-1518. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83097-I](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83097-I)

European commission (s.d.) Sustainable use of pesticides. Consulté 30 juin 2021, à l'adresse https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides_fr

Evelin, H., Kapoor, R., & Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress : A review. *Annals of Botany*, 104(7), 1263-1280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp251>

Fan, B., Blom, J., Klenk, H., Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex. *Pubmed*. Doi: 103389/fmicb.2017.00022

- Feng, G., Zhang, F. S., Li, X. L., Tian, C. Y., Tang, C., & Rengel, Z. (2002). Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*, 12(4), 185-190. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0170-0>
- Ferreira, D. A., Silva, T. F. da, Pylro, V. S., Salles, J. F., Andreote, F. D., & Dini-Andreote, F. (2020). Soil Microbial Diversity Affects the Plant-Root Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01502-z>
- Fiorilli, V., Lanfranco, L. & Bonfante, P. (2013). The expression of GintPT, the phosphate transporter of *Rhizophagus irregularis*, depends on the symbiotic status and phosphate availability. *Planta* 237, 1267–1277. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1842-z>
- Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat : An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- Gachon Louis & Institut national de la recherche agronomique France. (1988). Phosphore et potassium dans les relations sol-plante [Texte imprimé] : Conséquences sur la fertilisation / sous la dir. de Louis Gachon ; [publ. par l'] Institut national de la recherche agronomique. INRA.
- Garcés-Ruiz, M., Calonne-Salmon, M., Plouznikoff, K., Misson, C., Navarrete-Mier, M., Cranenbrouck, S., & Declerck, S. (2017). Dynamics of Short-Term Phosphorus Uptake by Intact Mycorrhizal and Non-mycorrhizal Maize Plants Grown in a Circulatory Semi-Hydroponic Cultivation System. *Frontiers in Plant Science*, 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01471>
- Garmendia, I., Aguirreolea, J., & Goicoechea, N. (2006). Defence-related Enzymes in Pepper Roots During Interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi and/or *Verticillium dahliae*. *BioControl*, 51(3), 293. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-4238-6>
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., & Barker, D. G. (2005). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection[W]. *The Plant Cell*, 17(12), 3489-3499. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035410>
- Giovannini, L., Palla, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., & Giovannetti, M. (2020). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Associated Microbiota as Plant Biostimulants : Research Strategies for the Selection of the Best Performing Inocula. *Agronomy*, 10, 106. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010106>

- Gode-Potratz, C. J., Kustus, R. J., Breheny, P. J., Weiss, D. S., & McCarter, L. L. (2011). Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Molecular Microbiology*, 79(1), 240-263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07445.x>
- Godin, B., Chandelier, A., Jacquemin, G., Meza, R., Eylenbosch, D., Lateur, M., Blanchard, R., Meurs, R., Bodson, B., & Sinnaeve, G. (2020). 6. Valorisation des froments et épeautres de la récolte 2020. 15.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., & Bending, G. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113, 17-35. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.09.009>
- Gouel, C., Guimbard, H. (2019). Nutrition Transition and the Structure of Global Food Demand. *American journal of Agricultural Economics*,
- Grant, C., Bittman, S., Montreal, M., Plenchette, C., Morel, C., Bittman, C., & Montreal, S. (2005). Soil and fertilizer phosphorus : Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Plant Science*, 85. <https://doi.org/10.4141/P03-182>
- Gutjahr, C., Casieri, L., & Paszkowski, U. (2009). Glomus intraradices induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist*, 182(4), 829-837. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02839.x>
- Handler, K. (2018, 17 janvier). How was Wheat Domesticated ?.. Yale Scientific Magazine. Consulté 11 juin 2021, à l'adresse <https://www.yalescientific.org/2018/01/how-was-wheat-domesticated/>
- Harrier, L. A., & Watson, C. A. (2004). The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management Science*, 60(2), 149-157. <https://doi.org/10.1002/ps.820>
- Heim, R., Cubitt, A. B., & Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature*, 373(6516), 663-664. <https://doi.org/10.1038/373663b0>
- Hemissi, I., Labidi, S., Dhifalli, F., Hammami, R., Hachana, A., Hlel, D., Sifi, B., & Faysal, B. (2020). Effet de la bio inoculation mycorrhizienne et rhizobiale sur les composantes de rendement du blé dur (*Triticum durum* Desf.).

- Hildebrandt, U., Regvar, M., & Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1), 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.023>
- Hodge, A., Fitter, A. (2010). Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(31), 13754-13759. doi: 10.1073/pnas.1005874107.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163-173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>
- Jemmali, L. (2015). Stimulateurs des défenses naturelles du blé dur en Tunisie et du blé tendre en France contre la septoriose causée par *Zymoseptoria tritici* [Phdthesis, Université du Littoral Côte d'Opale]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01626008>
- Kahiluoto, H., Ketoja, E., & Vestberg, M. (2000). Promotion of utilization of arbuscular mycorrhiza through reduced P fertilization 1. Bioassays in a growth chamber. *Plant and Soil*, 227(1), 191-206. <https://doi.org/10.1023/A:1026555717663>
- Kasim, W., Osman, M., Omar, N., Abd El-Daim, I., Bejai, S., & Meijer, J. (2012). Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9283-7>
- Kim, K., Yim, W., Trivedi, P., Madhaiyan, M., Deka Boruah, H. P., Islam, Md. R., Lee, G., & Sa, T. (2010). Synergistic effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* strains on growth and nutrient uptake of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil*, 327(1), 429-440. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0072-4>
- Larousse, É. (s. d.). Définitions : Hygroscopique - Dictionnaire de français Larousse. Consulté 21 juin 2021, à l'adresse <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/hygroscopique/40941>
- Li, H., Smith, S., Holloway, R., Zhu, Y., Smith, A. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *The New phytologist*, 2006;172(3):536-43. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01846.x.
- Liu, A., Hamel, C., Hamilton, R., Ma, B., & Smith, D. (2000). Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s005720050277>

- Lopez, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2, a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
- Lucini, L., Bernardo, L., Morcia, C., Rizza, F., Terzi, V., Carletti, P., Ghizzoni, R., & Badeck, F. W. (2017). Proteomic insight into the mitigation of wheat root drought stress by arbuscular mycorrhizae. *JOURNAL OF PROTEOMICS*, 169, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.024>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Marcussen, T., Sandve, S. R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M., International Wheat Genome Sequencing Consortium, Jakobsen, K. S., Wulff, B. B. H., Steuernagel, B., Mayer, K. F. X., & Olsen, O.-A. (2014). Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6194), 1250092. <https://doi.org/10.1126/science.1250092>
- Matsuoka, Y. (2011). Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation : The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant and Cell Physiology*, 52(5), 750-764. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr018>
- Mejri, S. (2018). Efficacités et modes d'action de nouveaux simulateurs de défenses des plantes sur le pathosystème blé-Zymoseptoria tritici. [Thèse de doctorat - Université du Littoral Côte d'Opale]. TEL archives ouvertes (02001770)
- Meurs, R. (2018). Etude de l'effet des conditions climatiques, de l'influence du choix variétal et de l'efficacité des traitements fongicides sur la dynamique des principales maladies fongiques du blé d'hiver. [Mémoire - Université de Liège - Faculté Gembloux Agro-Bio Tech].
- Mielich-Süss, B., & Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environmental microbiology*, 17(3), 555-565. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12527>
- Miller, R. M., Jastrow, J. D., & Reinhardt, D. R. (1995). External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*, 103(1), 17-23. <https://doi.org/10.1007/BF00328420>

- Miransari, M. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 917-930. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3004-6>
- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms : Ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73-87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
- Morais, D. (2015). Les déterminants des phases épidémiques précoces de la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici*) : Quantité, efficacité et origine de l'inoculum primaire [Thèse - AgroParisTech]. TEL archive ouvertes (01142864).
- MUCL search results | BCCM Belgian Coordinated Collections of Microorganisms. (s. d.). Consulté 7 mai 2021, à l'adresse https://bccm.belspo.be/catalogues/mucl-search-results?FIRSTITEM=1&LIST1=STRAIN_NUMBER&TEXT1=45408&LIST2=NAME&TEXT2=&LIST3=ORGANISM_TYPE&TEXT3=&LIST4=ORIGINAL_SSTR&TEXT4=&LIST5=ALL+FIELDS&TEXT5=&CONJ=OR&RANGE=20&B3=Run+Query
- Mukherjee, A., & Ané, J.-M. (2011). Germinating spore exudates from arbuscular mycorrhizal fungi : Molecular and developmental responses in plants and their regulation by ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(2), 260-270. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0146>
- Mustafa, G. (2015). Protection du blé contre l'oïdium par des champignons mycorrhiziens à arbuscules : Mécanismes et optimisation [Thèse, Université du Littoral Côte d'Opale]. TEL archives ouvertes (01451353).
- OECD and FAO. (2020). Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2020-2029. FAO and OECD. <https://doi.org/10.1787/cc6f09c-fr>
- Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., & Gough, C. (2005). Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 44(2), 195-207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02522.x>
- Olsson, P. A., Rahm, J., & Aliasgharzad, N. (2010). Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 125-131. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00833.x>

- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides : Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, 9, 1084-1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Palmer, C.-L., & Skinner, W. (2002). *Mycosphaerella graminicola* : Latent infection, crop devastation and genomics. *Molecular Plant Pathology*, 3(2), 63-70. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2002.00100.x>
- Paszkowski, U. (2006). A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. *New Phytologist*, 172(1), 35-46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01840.x>
- Pfeffer, P. E., Douds, D. D., Bécard, G., & Shachar-Hill, Y. (1999). Carbon Uptake and the Metabolism and Transport of Lipids in an Arbuscular Mycorrhiza. *Plant Physiology*, 120(2), 587-598.
- Pioufle, O., Ganoudi, M., Calonne, M., Dhaou, F., & Declerck, S. (2019). *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 Improves Phosphorus Uptake and Water Use Efficiency in Maize Plants During Recovery From Drought StressTable_1.XLSX. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00897>
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougél, C., Lemanceau, P., & Berta, G. (2009). Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19(2), 81-90. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0205-2>
- Plenchette, C., Bois, J.-F., Duponnois, R., & Cadet, P. (2000). La mycorhization (*Glomus aggregatum*) du mil (*Pennisetum glaucum*). *Étude et Gestion des Sols*, 5.
- Plouznikoff, K., Declerck, S., & Calonne, M. (2016). Mitigating Abiotic Stresses in Crop Plants by Arbuscular Mycorrhizal Fungi (p. 341-400). https://doi.org/10.1007/978-3-319-42319-7_15
- Porter, J. R., & Semenov, M. A. (2005). Crop responses to climatic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1463), 2021-2035. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1752>

- Pozo, M. J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J. M., & Azcón-Aguilar, C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(368), 525-534. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.368.525>
- Pozo, M., Jung, S., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J., Azcon-Aguilar, C., & Barea, J.-M. (2013). Root Allies : Arbuscular Mycorrhizal Fungi Help Plants to Cope with Biotic Stresses (p. 289-307). https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4_15
- Pozo, M., Verhage, A., García-Andrade, J., García, J., & Azcon-Aguilar, C. (2009). Priming Plant Defence Against Pathogens by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In *Mycorrhizas—Functional Processes and Ecological Impact* (p. 123-135). https://doi.org/10.1007/978-3-540-87978-7_9
- Programme 2018—2022 du NAPAN | Nationaal Actie Plan d’Action National (NAPAN). (s. d.). Consulté 30 juin 2021, à l’adresse <https://search.fytoweb.be/napanweb/fr/programme-18-22.html>
- Pumplin, N., & Harrison, M. J. (2009). Live-Cell Imaging Reveals Periarbuscular Membrane Domains and Organelle Location in *Medicago truncatula* Roots during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Physiology*, 151(2), 809-819. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141879>
- Redon, P.-O. (2009). Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*) (Numéro 2009NAN10015) [Theses, Université Henri Poincaré - Nancy 1]. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748490>
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. Nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 191-195. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.63310-0>
- Ruiz-Lozano, J. M., Azcon, R., & Gomez, M. (1995). Effects of Arbuscular-Mycorrhizal Glomus Species on Drought Tolerance : Physiological and Nutritional Plant Responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 456-460.
- Saia, S., Ruisi, P., Fileccia, V., Di Miceli, G., Amato, G., & Martinelli, F. (2015). Metabolomics Suggests That Soil Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi Decreased Free Amino Acid Content in Roots of Durum Wheat Grown under N-Limited, P-Rich Field Conditions. *PloS One*, 10(6), e0129591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129591>

- Sánchez-Blanco, M. J., Ferrández, T., Morales, M., Morte, A., & Alarcón, J. J. (2004). Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *Journal of plant physiology*, 161, 675-682. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01191>
- Savy, S. (2005). Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques: Des carotènes aux xanthophylles. [Thèse - Université de Bretagne occidentale - Brest]. TEL archives ouvertes (00193188)
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schroth, M. N., & Hancock, J. G. (1982). Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* (New York, N.Y.), 216(4553), 1376-1381. <https://doi.org/10.1126/science.216.4553.1376>
- Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P. E., Douds, D., Osman, S. F., Doner, L. W., & Ratcliffe, R. G. (1995). Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek. *Plant Physiology*, 108(1), 7-15. <https://doi.org/10.1104/pp.108.1.7>
- Shi, G., Liu, Y., Johnson, N. C., Olsson, P. A., Mao, L., Cheng, G., Jiang, S., An, L., Du, G., & Feng, H. (2014). Interactive influence of light intensity and soil fertility on root-associated arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 378(1-2), 173-188. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2022-z>
- Shin, S., Kim, K., Kang, C., Cho, K., Park, C., Okagaki, R. et Park, J. (2014). A Simple Method for the Assessment of Fusarium Head Blight Resistance in Korean Wheat Seedlings Inoculated with *Fusarium graminearum*. *Plant Pathol J.*, 30(1): 25-32. Doi: 10.5423/PPJ.OA.06.2013.0059
- Siah, A., Deweer, C., Duyme, F., Sanssené, J., Durand, R., Halama, P., & Reignault, P. (2010). Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology*, 59, 661-670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x>
- Smith, F. A., & Smith, S. E. (1997). Structural diversity in (vesicular)–arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 137(3), 373-388. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00848.x>
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (1990). Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist*, 114(1), 1-38. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00370.x>

- Smith, S. E., Smith, F. A., & Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. *Plant Physiology*, 133(1), 16-20. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024380>
- Smith, S., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Somashekar, D., & Joseph, R. (1996). Chitosanases — properties and applications : A review. *Bioresource Technology*, 55(1), 35-45. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00144-1](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00144-1)
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., & Walter, M. H. (2003). Arbuscular mycorrhiza : Biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology*, 29(9), 1955-1979. <https://doi.org/10.1023/a:1025695032113>
- Strullu-Derrien, C., Selosse, M.-A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses : From palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, 220(4), 1012-1030. <https://doi.org/10.1111/nph.15076>
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides : A strong and sticky framework. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 1), 3-9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Talboys, P.J., Owen, D.W., Healey, J.R. et al. (2014). Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biol* 14, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-51>
- Tawaray, K. (2003). Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(5), 655-668. <https://doi.org/10.1080/00380768.2003.10410323>
- Toljander, J. F., Artursson, V., Paul, L. R., Jansson, J. K., & Finlay, R. D. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 34-40. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00003.x>
- Toro, M., Azcon, R., & Barea, J. (1997). Improvement of Arbuscular Mycorrhiza Development by Inoculation of Soil with Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria To Improve Rock Phosphate Bioavailability ((sup32)P) and Nutrient Cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4408-4412. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.11.4408-4412.1997>

- Torriani, S. F. F., Melichar, J. P. E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., & Courbot, M. (2015). *Zymoseptoria tritici* : A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 79, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.010>
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2016). *Microbiology: An introduction* (4th edition). Pearson.
- Tuberosa, R., Graner, A., & Frison, E. (2013). *Genomics of Plant Genetic Resources : Volume 1. Managing, sequencing and mining genetic resources*. Springer Science & Business Media.
- Valentine, A. J., Osborne, B. A., & Mitchell, D. T. (2001). Interactions between phosphorus supply and total nutrient availability on mycorrhizal colonization, growth and photosynthesis of cucumber. *Scientia Horticulturae*, 88(3), 177-189. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00205-3)
- Van Wees, S. C. M., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. J. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 443-448. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together : Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature reviews. Microbiology*, 11(3), 157-168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- Vyas, P., & Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, 9, 174. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-174>
- Walter, M., Floss, D., Hans, J., Fester, T., & Strack, D. (2007). Apocarotenoid Biosynthesis in Arbuscular Mycorrhizal Roots : Contributions from Methylerythritol Phosphate Pathway Isogenes and Tools for Its Manipulation. *Phytochemistry*, 68, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.032>
- Wehner, J., Antunes, P. M., Powell, J. R., Mazukatow, J., & Rillig, M. C. (2010). Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas : A role for fungal diversity? *Pedobiologia*, 53(3), 197-201.
- Whipps, J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1198-1227. <https://doi.org/10.1139/b04-082>

- Wright, S. F., & Upadhyaya, A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 198(1), 97-107. <https://doi.org/10.1023/A:1004347701584>
- Wu, Q.-S., Xia, R.-X., & Zou, Y.-N. (2008). Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology*, 1(44), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.10.001>
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., Li, F., & Wang, Z. (2018). Characteristics and Application of a Novel Species of *Bacillus* : *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*, 13(3), 500-505. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00874>
- Yzerbyt, L. (2018). Caractérisation de la résistance de *Zymoseptoria tritici* aux Inhibiteurs de la déméthylation dans la population belge.
- Zhang, L., Feng, G., & Declerck, S. (2018). Signal beyond nutrient, fructose, exuded by an arbuscular mycorrhizal fungus triggers phytate mineralization by a phosphate solubilizing bacterium. *The ISME Journal*, 12(10), 2339-2351. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0171-4>

Annexes

Annexes 1 : Compléments aux matériels et méthode

Tableau 16. Root exudate wheat est un milieu basé sur la composition des exudats de blé crée dans le cadre du Projet Microsoilsystem

RE wheat medium	
50% de basal medium + 50% all media à pH 6,8	
BASAL MEDIUM	
Éléments	Concentration (g/L)
Glucose	0,1
Sucrose	1
Maltose	7,5
Citrate	0,05
Oxalate	0,05
Malate	0,05
Acides Casamino	0,15
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
Eau	Q.S.P 1L
ALL MEDIA	
Éléments	Concentration (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,685
MOPS	21
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Extrait de levure	1
Trace solution	100 µl de chaque solution
Eau	QSP 1L

TRACE SOLUTION	
Éléments	Concentration (g/L)
Fe ₂ (SO ₄) ₃	120mg/10mL
MnSO ₄	40mg/10mL
CuSO ₄	160mg/10mL
Na ₂ MOo ₄	400mg/10mL

Annexes 2 : Compléments aux résultats

Tableau 17. Pourcentage de déplétion dans la solution nutritive des plantes de blé lors du pré-test après 6 et 24 heures de circulation.

Traitement	Pourcentage de déplétion de phosphore dans la solution nutritive (%)	
	Temps	
	6 heures	24 heures
M	44,61 ± 5,52 a	95,93 ± 3,83 a
NM	44,48 ± 12,59 a	95,57 ± 5,04 a
Analyse de la variance		
p-value	0,9835	0,9903

Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 4 répétitions. Plantes (M) inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833, plantes (NM) non inoculées. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes. Les p-valeurs en gras représentent des différences significatives (ANOVA 1, test t student, P<0.05).

Tableau 18. Pourcentage de déplétion (en % de la concentration initiale de Pi dans la solution de Hoagland low-P) dans la solution nutritive des plantes de blé inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (M-B) ou non (M-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non mycorhizées et inoculer (NM-B) ou non (NM-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, après 6 et 12 heures de circulation de la solution de Hoagland low-P dans les pots de culture

Traitement	Pourcentage de déplétion de phosphore dans la solution nutritive (%)	
	Temps	
	6 heures	12 heures
NM NB	4,2 ± 0,75 a	4,64 ± 1,07 a
NM B	3,83 ± 1,45 a	4,49 ± 1,31 a
M NB	5,33 ± 1,63 a	6,96 ± 1,31 b
M B	5,46 ± 0,75 a	6,33 ± 0,79 b
Analyse de la variance		
(Prob > F)	0,0603	0,0172
Effet p-valeur		
Effet bactéries	0,7667	0,5882

Effet CMA	0,0099	0,0021
Bactéries * CMA	0,4917	0,8180

Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 6 répétitions. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes. Les p-valeurs en gras représentent des différences significatives (ANOVA 2, test HSD-Tukey $p < 0.05$).

Tableau 19. Pourcentage de déplétion (en % de la concentration initiale de Pi dans la solution de Hoagland low-P) dans la solution nutritive des plantes de blé inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (M-B) ou non (M-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non mycorhizées et inoculer (NM-B) ou non (NM-NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, après 12, 24 et 36 heures de circulation de la solution de Hoagland low-P dans les pots de culture.

Traitement	Pourcentage de déplétion de phosphore dans la solution nutritive (%)		
	Temps		
	12 heures	24 heures	36 heures
NM NB	11,77 ± 1,79 a	24,11 ± 4,66 a	50,41 ± 6,19 a
NM B	7,81 ± 1,39 b	24,75 ± 3,63 a	50,96 ± 10,66 a
M NB	12,21 ± 1,97 a	19,57 ± 4,19 a	47,72 ± 9,81 a
M B	10,47 ± 2,76 b	24,03 ± 6,52 a	55,59 ± 7,87 a
Analyse de la variance			
(Prob > F)	0,0113	0,3349	0,5711
Effet (p-valeur)			
Bactéries	0,005	0,2639	0,2951
CMA	0,0986	0,2248	0,8194
Bactéries*CMA	0,2116	0,4078	0,3714

Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de 5 répétitions (Pas 6 répétitions car les valeurs obtenues pour NM NB5, NM B6, M NB5 et MB 6 étaient défectueuses). Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes. Les p-valeurs en gras représentent des différences significatives (ANOVA 2, test HSD-Tukey $p < 0.05$).

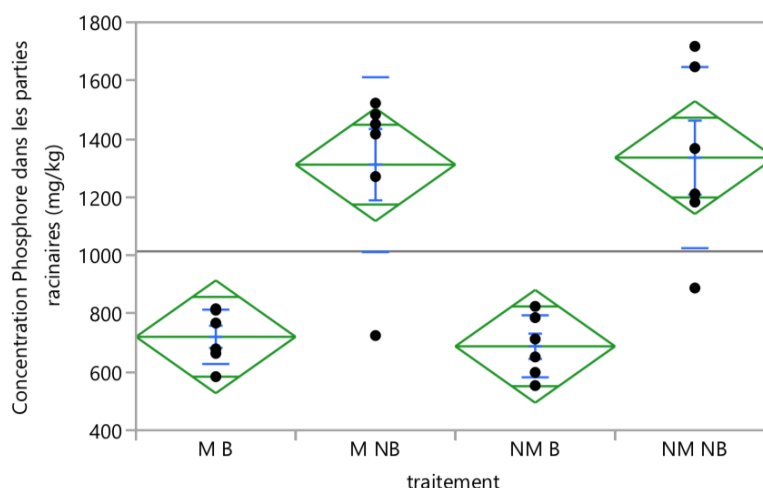


Figure 40. Concentration en phosphore dans les parties racinaires des plantes inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408

de *Zymnoseptoria Tritici*, estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).

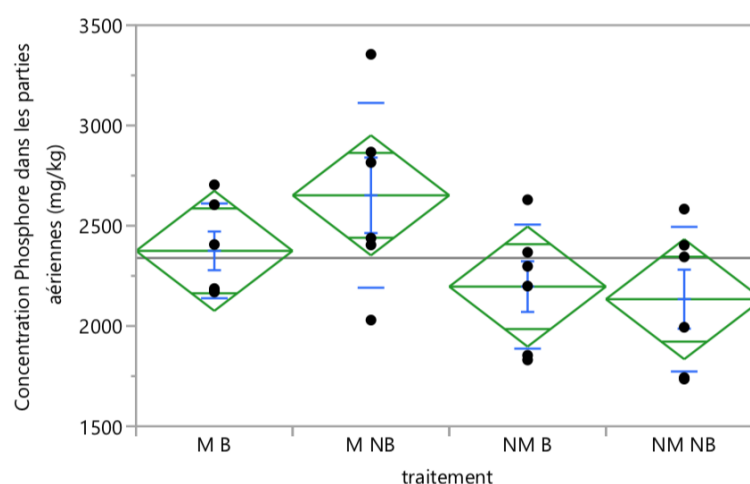


Figure 41. Concentration en phosphore dans les parties aériennes des plantes inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de *Zymnoseptoria Tritici*, estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).

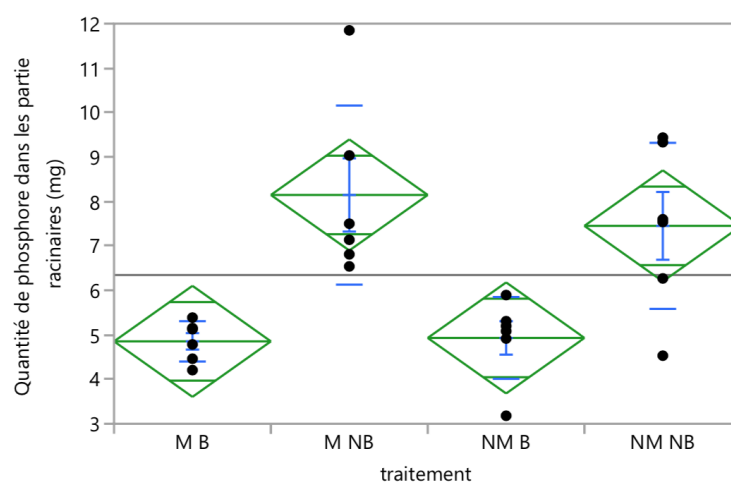


Figure 42. Quantité en phosphore dans les parties racinaires des plantes inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de *Zymnoseptoria Tritici*, estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).

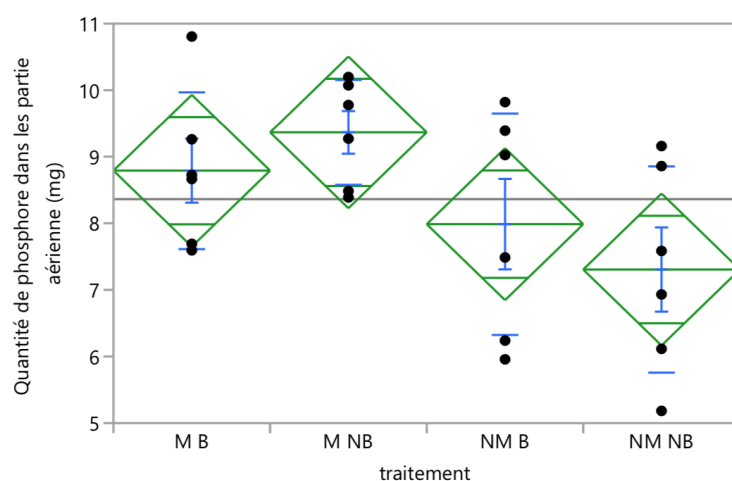


Figure 43. Quantité en phosphore dans les parties aériennes des plantes inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (MB) ou non (M NB) avec *Bacillus velezensis* GA1 et plantes non inoculées avec *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 et inoculées (NM B) ou non (NM NB) avec *Bacillus velezensis* GA1, toutes inoculées avec la souche MUCL45408 de *Zymoseptoria Tritici*, estimée à la récolte (82 jours après la germination ou 67 jours après le transfert en pot). les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Effets du champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis* et de la bactérie *Bacillus velezensis*, seuls ou combinés, sur le développement et le prélèvement de phosphore par le blé infecté ou non par *Zymoseptoria tritici* en conditions semi-hydroponiques

Présenté par Pauline Van Gansberghe

Résumé

L'agriculture est indispensable à la société actuelle pour subvenir aux besoins nutritifs de la population mondiale, mais est malheureusement soumise à l'attaque grandissante des pathogènes et au changement climatique. Le blé, deuxième céréale cultivée mondialement, est sujet à plusieurs maladies fongiques comme la septoriose causée par *Zymoseptoria tritici*. La septoriose du blé fait partie des maladies les plus nuisibles sur la culture et peut causer des pertes de rendements conséquentes. Cependant l'utilisation des pesticides synthétiques pour contrôler les maladies des plantes comme la septoriose peut avoir des conséquences néfastes pour l'Homme et son environnement. Le monde agricole doit donc s'adapter et mettre en place des alternatives plus en adéquation avec le développement durable pour maintenir une production suffisante, tout en réduisant l'impact anthropique sur l'environnement.

Parmi les méthodes alternatives, l'association de microorganismes bénéfiques aux plantes a montré de nombreux avantages pour la tolérance à des stress, notamment biotiques, sur le développement du blé. Parmi eux, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) et les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) peuvent être considérés comme une solution pour limiter l'utilisation des produits phytosanitaires de synthèse utilisés actuellement.

Le projet MicroSoilSystem s'inscrit dans cet objectif de recherche d'un moyen de bio-contrôle et bio-stimulation basé sur l'utilisation de microorganismes. Le mémoire présenté ici prend part à ce projet. Le mémoire a pour objectif : d'une part d'évaluer l'effet d'un CMA, *Rhizophagus irregularis* MUCL41833, d'une PGPR, *Bacillus velezensis* GA1 et la combinaison des deux sur la dynamique de prélèvement de phosphore inorganique (Pi) par le froment *T. aestivum* et son développement avant et après l'attaque du pathogène *Z. tritici*. Un système de culture semi-hydroponique à circulation continue en conditions de serre a été mise en place pour répondre à cet objectif.

Un effet « CMA » positif a été observé sur la surface foliaire, le prélèvement du Pi à certains stades du cycle de vie du blé et sur la concentration de P dans les parties aériennes. L'inoculation de *B. velezensis* a induit un poids sec racinaire plus élevé. Cependant aucun effet synergique, ni délétère de la combinaison des deux microorganismes sur les plants de blé de cette variété a été identifié.

Les résultats de ce mémoire démontrent bien de la complexité de l'interaction entre microorganismes de la rhizosphère bénéfiques pour les plantes, et de l'intérêt d'étudier chaque combinaison sur chaque variété de plantes cultivées pour une potentielle utilisation au champ.