

Université de Montréal

Étude de l'interaction entre le champignon mycorhizien *Glomus irregulare*
et les bactéries du sol

Par

Julie Lecomte

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des lettres

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en sciences biologiques

Juillet 2010

© Julie Lecomte, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'interaction entre le champignon mycorhizien
Glomus irregulare et les bactéries du sol

présenté par :
Julie Lecomte

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

David Morse, président-rapporteur
Mohamed Hijri, directeur de recherche
Marc St-Arnaud, co-directeur
Anja Geitmann, membre du jury

RÉSUMÉ

Dans cette étude, nous avons isolé et cultivé des bactéries intimement liées aux spores du champignon mycorhizien *Glomus irregulare* prélevées dans la rhizosphère de plants d'*Agrostis stolonifera* L. récoltés dans un sol naturel. Le séquençage des 29 morphotypes isolés a révélé la présence de seulement sept taxons bactériens (*Variovorax paradoxus*, *Microbacterium ginsengiosoli*, *Sphingomonas* sp., *Bacillus megaterium*, *B. simplex*, *B. cereus* et *Kocuria rhizophila*). Des isolats de chacun de ces sept taxons ont ensuite été cultivés *in vitro* sur le mycélium de *G. irregulare* afin d'observer par microscopie leur capacité à croître et à s'attacher au mycélium en absence d'éléments nutritifs autres que ceux fournis par le champignon. Tous les isolats, sauf *B. cereus*, ont été capables de bien croître dans le système expérimental et de s'attacher au mycélium en formant des structures ressemblant à des biofilms sur la surface du champignon. Toutefois, *B. simplex* formait ces structures plus rapidement, soit en 15 jours, alors que les autres isolats les ont formés après 30 jours (*K. rhizophila* et *B. megaterium*) ou 45 jours (*V. paradoxus*, *M. ginsengiosoli* et *Sphingomonas* sp.). D'autre part, la technique PCR-DGGE a permis d'analyser la diversité bactérienne associée aux spores. La diversité des taxons associés aux spores de *G. irregulare* qu'il a été possible d'isoler et de cultiver *in vitro* a été nettement moindre que celle qui était présente sur la surface des spores,

alors que la biodiversité bactérienne totale du sol a été encore beaucoup plus élevée. Les bactéries associées aux champignons mycorhiziens jouent probablement un rôle important dans la capacité des plantes à résister aux stress biotiques et abiotiques auxquels elles sont soumises.

MOTS-CLÉS :

Champignons mycorhiziens à arbuscule (AMF), bactéries, biodiversité, biofilm, microscopie.

ABSTRACT

In this study, we isolated and cultivated bacterial cells intimately associated with *Glomus irregulare* spores in a natural soil *Agrostis stolonifera* rhizosphere. Sequencing of the 29 morphotypes isolated revealed the presence of only seven bacterial taxa (*Variovorax paradoxus*, *Microbacterium ginsengiosoli*, *Sphingomonas* sp., *Bacillus megaterium*, *B. simplex*, *B. cereus* and *Kocuria rhizophila*). These seven isolates were cultivated *in vitro* on the mycelium of *G. irregulare* to allow microscopic observation of growth and attachment to the mycelium in absence of nutritive sources other than those derived from the fungal mycelium. All isolates but *B. cereus* were able to grow on the experimental system and to attach to the mycelium to form biofilm-like structures on their surface. However, *B. simplex* formed these structures more quickly, in 15 days, than the remaining isolates that have formed them only after 30 days (*K. rhizophila* and *B. megaterium*) or 45 days (*V. paradoxus*, *M. ginsengiosoli* and *Sphingomonas* sp.). In addition, PCR-DGGE was used to compare bacterial diversity. The bacterial biodiversity associated with spores of *G. irregulare* that were isolated and cultured *in vitro* was significantly lower than that present on the spore surface, while total soil bacterial diversity was much higher. The bacteria associated with mycorrhizal fungi probably have an

important role in the ability of plants to withstand biotic and abiotic stresses to which they are submitted.

KEYWORDS :

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), bacteria, biodiversity, biofilm, microscopy.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Mots-clés :	ii
Abstract.....	iii
Keywords :	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xviii
Avant-propos.....	xx
Chapitre 1. Introduction.....	1
Symbioses mycorhiziennes	1
Champignons mycorhiziens à arbuscules	6
Bactéries associées aux champignons mycorhiziens.....	9

Biofilms bactériens	10
Observations microscopiques	12
Analyse et comparaison de la biodiversité microbienne.....	14
Hypothèses	15
Objectifs	16
Chapitre 2. Spatio-temporal interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi	17
Abstract	17
Introduction	19
Material & Method	22
Sampling.....	22
Assessment of root mycorrhizal colonisation.....	23
Isolation and identification of <i>Glomus irregulare</i> spores harvested from soil.....	23
Isolation of bacteria from spore surface	24
Identification of isolated bacteria	25
Bacterial biodiversity associated with <i>G. irregulare</i> spores	26
Assessment of interactions between <i>G. irregulare</i> and bacteria	27
Results.....	28
Isolation of bacteria from <i>Glomus irregulare</i> spores.....	28

Assessment of bacterial biodiversity.....	32
Interactions between bacteria and <i>G. irregulare</i> mycelium.....	34
Discussion	38
Acknowledgments	44
Chapitre 3. Discussion et conclusion générale.....	45
Références	50
Annexe 1	67
Observation des interactions entre bactéries et mycélium de champignon mycorhizien à arbuscules par microscopie confocale.....	67
Matériel et méthode	70
Transformation des bactéries avec des gènes codant pour des protéines fluorescentes	70
Mise en interaction des bactéries transformées avec le mycélium de <i>Glomus irregulare</i>	73
Observation des bactéries transformées au microscope confocal.....	74
Résultats	76
Discussion.....	87
Annexe 2	90
Analyse de la biodiversité	90

	viii
Matériel et méthode	91
Biodiversité et identification des bactéries	91
Résultats	93
Discussion.....	100
Annexe 3 - Milieux de culture.....	102
Milieu M.....	102
Milieu Eau	106
Milieu de congélation des bactéries.....	107
Annexe 4 - Marqueur utilisé pour le DGGE	108
Annexe 5 - Photos du lieu d'échantillonnage.....	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Les différents types de symbioses mycorhiziennes, les champignons impliqués, leurs plantes hôtes, les structures formées et leurs impacts physiologiques.....4
Table II	Bacterial taxa to which belong the 29 bacterial isolates recovered from <i>Glomus irregulare</i> spores isolated from natural soil and identified by sequencing of a 16S rRNA gene fragment.....29
Table III	Growth and attachment onto <i>Glomus irregulare</i> mycelium of bacteria isolated from field-harvested AM fungus spores, on a water media at 25 °C after 15, 30 and 45 days of incubation.....35

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Classification phylogénétique du règne des Mycota (Fungi) basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques du gène 18S de l'ARNr.....5
Figure 2	Classification phylogénétique du phylum <i>Glomeromycota</i>7
Figure 3	A- Morphology of spores isolated from soil. B and C - Patterns of mixed bacterial colonies growing from washed <i>Glomus irregulare</i> spores extracted from natural soil and incubated 1 month on <i>G. irregulare</i> . isolate DAOM 197198 hyphae growing <i>in vitro</i> on a gellan gum medium without nutrients.....30
Figure 4	DGGE pattern of V9 portion of 16S rRNA gene.....33
Figure 5	Bacterial growth patterns on <i>Glomus irregulare</i> hyphae cultivated <i>in vitro</i> observed on DIC microscope using 63X objective. Panel A, <i>Bacillus simplex</i> ; B, <i>Kocuria rhizophila</i> ; C, <i>Bacillus megaterium</i> ; D, <i>Variovorax paradoxus</i> ; E, <i>Sphingomonas</i> sp; F, <i>Microbacterium ginsengisoli</i> ; G, <i>Pseudomonas</i> sp.; and H, <i>E. coli</i>35

Figure 6	Plasmides utilisés pour les transformations des bactéries par électroporation.....	72
Figure 7	Schéma du système expérimental utilisé pour la croissance des bactéries transformées avec les protéines fluorescentes sur les hyphes du champignon mycorhizien <i>G. irregulare</i>	74
Figure 8	A. Bactéries <i>B. cereus</i> exprimant la protéine «DsRed». B et C. Bactéries <i>Sphingomonas</i> sp. exprimant les protéines «enhance cyan» et «enhance green» respectivement. D. Bactérie <i>Pseudomonas</i> sp. exprimant la protéine «enhance yellow»...	77
Figure 9	Photographie de <i>B. simplex</i> poussant sur <i>G. irregulare</i>	79
Figure 10	Photographie de <i>B. megaterium</i> poussant sur <i>G. irregulare</i> ..	80
Figure 11	Photographie de <i>Sphingomonas</i> sp. poussant sur <i>G. irregulare</i>	81
Figure 12	Photographie de <i>Microbacterium ginsengiosoli</i> . poussant sur <i>G. irregulare</i>	82
Figure 13A	Photographie de <i>Variovorax paradoxus</i> poussant sur <i>G. irregulare</i>	83

Figure 13B	Photographie de <i>Variovorax paradoxus</i> poussant sur <i>G. irregulare</i>	84
Figure 14	Photographie de <i>Kocuria rhizophila</i> poussant sur <i>G. irregulare</i>	85
Figure 15	Photographie d' <i>E. coli</i> poussant sur <i>G. irregulare</i>	86
Figure 16	Photographie d'un gel d'électrophorèse des produits de PCR du gène de l'ARNr 16S montrant une bande d'environ 1500 pb.....	94
Figure 17	Photographie d'un gel d'électrophorèse des produits de PCR correspondant à la portion V3 du gène de l'ARNr 16S montrant une bande d'environ 200 pb.....	95
Figure 18	Photographie d'un gel DGGE des produits PCR correspondant à la portion V3 du gène de l'ARNr 16S montrant des bandes d'environ 200 pb.....	98
Figure 19	Photographie d'un gel DGGE des produits PCR correspondant à la portion V3 du gène de l'ARNr 16S montrant des bandes d'environ 200 pb.	99

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
AMF	Champignon mycorhizien à arbuscule
BLASTn	Nucleotide blast (Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	Bovine serum albumine
CFU	Colony-forming unit
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DO	Densité optique
DIC	Differential interference contrast (microscopy)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate / désoxyribonucléotide triphosphate

FBSB	Fonds de bourses en sciences biologiques, Université de Montréal
g	Force de gravité
<i>GI</i>	<i>Glomus irregulare (intraradices)</i>
GPS	Global Positioning System
INVAM	International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi
kb	Kilobase
kV	Kilovolts
LB	Milieu Luria Bertani/ Luria Bertani Media
mL	Mililiter / millilitre
N	North
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre

Pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction / Amplification en chaîne par polymérase
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
Ri	Root inducing
RPM	Rotation par minute
<i>Taq</i>	Thermostable DNA polymerase named after the thermophilic bacterium <i>Thermus aquaticus</i>
TSA	Tryptone soy Agar media / milieu tryptone soya agar
TSB	Tryptone soy broth / bouillon tryptone soya
T-DNA	Transferred DNA of the root-inducing (Ri) plasmid
U	Unit
W	West
w/v	Weight/ volume
μF	Microfarad (unité internationale de capacité électrique)

l	Microlitre
g	Microgramme
m	Micromètre
M	Micromolaire
°C	Degré Celsius

Le microbe n'a pas le temps d'examiner le biologiste.

[Henri Michaux]

La science, comme l'amour, est aveugle. Voilà pourquoi elle se plaît à procéder
par tâtonnements.

[Jean O'Neil]

La science progresse en indiquant l'immensité de l'ignoré.

[Louis Pauwels]

REMERCIEMENTS

Je veux d'abord remercier mes directeurs de recherche, Mohamed Hijri et Marc St-Arnaud, pour m'avoir confié cet intéressant projet ainsi que le support nécessaire pour le mener à bien. Ce travail a été possible grâce aux fonds CRSNG octroyés à M. Hijri et M. St-Arnaud. Un support financier a aussi été obtenu par la bourse du département de sciences biologiques de l'Université de Montréal (FBSB).

Je tiens aussi à remercier particulièrement Hugo Germain pour sa patience, ses explications en réponse à mes nombreuses questions et son aide avec la technique d'électroporation. Un merci tout spécial aussi à Marie-Soleil Beaugard pour l'aide avec la technique DGGE et le support moral. Merci à Marie-Pierre Gauthier et Sugir Selliah pour l'aide avec l'optimisation de la PCR, à Maureen Marie-Joseph, stagiaire française à l'été 2007, pour l'aide précieuse avec l'extraction des spores du sol et à Éric Chevalier pour ses conseils sur l'utilisation du microscope. Merci à Éric Claeysen pour son écoute, ses conseils et son support moral. Je n'oublie pas non plus tous les autres membres de notre laboratoire et de l'IRBV sans qui mon séjour n'aurait pas été aussi agréable.

Pour terminer, je ne peux passer sous silence l'appui et les encouragements constants de mon amoureux Frédéric et la joie de vivre que nous procure notre merveilleuse petite Béatrice. Merci aussi à la famille Lecomte, particulièrement mon père Pierre, ma mère Jeannette et mes tantes Lorraine et Michèle, ainsi qu'à mes amis qui ont su me soutenir dans les moments les plus difficiles pour que je persévère dans ce projet.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire a été rédigé par articles. Les résultats présentés dans le deuxième chapitre ont donc été rédigés en anglais sous forme d'article scientifique. Le projet a été entamé à l'été 2006 avec l'échantillonnage de sol sur le terrain. Les manipulations de laboratoire et la recherche bibliographique ont aussitôt suivi. Mon directeur, Mohamed Hijri, et mon codirecteur, Marc St-Arnaud, ont su me guider à travers ce processus complexe, tout en me laissant libre dans mes choix. L'élaboration des dispositifs expérimentaux, toutes les manipulations de laboratoire et la rédaction de l'article ont été effectuées par moi en tant qu'auteure principale, avec les conseils avisés de messieurs St-Arnaud et Hijri en plus de leur soutien financier (CRSNG) au projet.

Le premier chapitre du mémoire inclut l'introduction avec la revue de littérature et la présentation des hypothèses de recherche. Le second chapitre est l'article comme tel. Il traite de la visualisation individuelle de chacune des bactéries du sol isolées lorsqu'associées à la surface du champignon mycorhizien *G. irregulare* par microscopie visible. Le troisième chapitre est une conclusion générale qui termine le mémoire.

Les annexes contiennent deux chapitres qui concernent les expériences qui ont été faites, mais qui n'ont pas donné de résultats publiables. L'annexe 1

traite donc de la tentative d'observation des interactions spatio-temporelles entre plusieurs de ces bactéries et le champignon mycorhizien *G. irregulare* par la microscopie confocale. L'annexe 2 tente de comparer la biodiversité microbienne totale du sol étudié, celle associée au champignon *G. irregulare* ainsi que les taxons bactériens qui ont été isolés à partir des spores de celui-ci, par biologie moléculaire. L'annexe 3 contient les recettes des milieux de croissance utilisés. L'annexe 4 donne l'identité des bandes d'ADN du marqueur utilisé pour le DGGE au chapitre 2. Finalement, l'annexe 4 termine le mémoire avec quelques photographies du lieu d'échantillonnage.

Veillez noter que les références bibliographiques se trouvent toutes à la fin du présent mémoire juste avant les différentes annexes.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

SYMBIOSES MYCORHIZIENNES

Il existe une multitude d'interactions entre les plantes et leur environnement biotique et abiotique depuis l'émergence de celles-ci. Leur survie et leur évolution en dépendent grandement. Plus de 80 % des plantes forment des symbioses avec des champignons du sol, des associations appelées mycorhizes. Il s'agit de symbioses omniprésentes dans la presque totalité des écosystèmes terrestres, des forêts tropicales et tempérées jusqu'aux déserts en passant par l'Arctique jusqu'aux sommets montagneux. La plupart des mycorhizes sont des associations mutualistes et la symbiose mycorhizienne à arbuscules existerait depuis l'émergence des premières bryophytes au Dévonien, il y a 400 millions d'années (Simon, *et al.*, 1993, Brundrett, 2002).

L'impact bénéfique des associations mycorhiziennes sur la survie et la santé des plantes est considérable et largement documenté (Gianinazzi-Pearson, 1996, Brundrett, 2002, St-Arnaud & Vujanovic, 2007, Smith & Read, 2008). Celles-ci bénéficient de leur association avec les champignons mycorhiziens par une meilleure acquisition d'eau et des minéraux du sol (Tawaraya, *et al.*, 2006). Les réseaux

d'hyphes extraradiculaires des champignons s'étendent bien au-delà de la zone du sol qui est explorée par les racines des plantes. Ces hyphes possèdent une grande capacité d'absorption des éléments nutritifs qui sont alors transportés jusqu'aux racines. En échange, la plante fournit au champignon des composés carbonés qu'elle synthétise par la photosynthèse, principalement des sucres (Gianinazzi-Pearson, 1996). Les plantes retirent d'autres bénéfices de telles associations, par exemple une résistance accrue aux stress abiotiques et biotiques (St-Arnaud & Vujanovic, 2007). Il a aussi été démontré que la présence de champignons mycorhiziens a une influence sur la structure physique (aération, formation d'agrégats, etc.) et biologique (populations microbiennes) du sol (Marschner & Baumann, 2003).

Il existe différentes sortes d'associations mycorhiziennes. Les principales sont classifiées dans le Tableau 1 (Fortin, *et al.*, 2008). Ces associations mycorhiziennes varient dans leurs formes et leurs fonctions, mais plusieurs sont similaires (Brundrett, 2002). La symbiose ectomycorhizienne se forme principalement avec les racines de plantes ligneuses. Il s'agit de champignons macrophytes principalement des Basidiomycètes, mais aussi de quelques membres des Ascomycètes. La Figure 1 montre la classification phylogénétique du règne des Mycota (Fungi) basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques 18S de l'ARNr (Schüler, *et al.*, 2001). Les champignons ectomycorhiziens forment un manteau fongique dense entourant les racines, un réseau intercellulaire (réseau d'Hartig) entre les cellules corticales des racines et un réseau de mycélium externe qui explore le sol. Certaines racines, les racines courtes, sont aussi recouvertes d'un manchon de mycélium. Les plantes des

familles des Éricacées et des Orchidées forment, quant à elles, des associations mycorhiziennes qui leur sont typiques. Il existe aussi des formes d'ectendomycorhizes chez quelques conifères et arbres (Smith & Read, 2008). Contrairement à la plupart des plantes, certains taxa, par exemple les membres de la famille des Brassicaceae, ne forment pas de symbioses mycorhiziennes reconnaissables et ont même développé des mécanismes pour éviter d'être colonisées (Tester, *et al.*, 1987).

Tableau 1. Les différents types de symbioses mycorhiziennes, les champignons impliqués, leurs plantes hôtes, les structures formées et les impacts physiologiques (Fortin, *et al.*, 2008).

TYPES DE MYCORHIZES	CHAMPIGNONS IMPLIQUÉS	PLANTES HÔTES	STRUCTURES FONGIQUES	STRUCTURES DE L'HÔTE	IMPACTS PHYSIOLOGIQUES
Arbusculaires	Champignons microscopiques glomérormycètes ~200 espèces	Bryophytes et plantes vasculaires : 70 % des espèces actuelles	Arbuscules et vésicules intracellulaires, mycélium et spores extraracinaires	Peu de changements, coloration jaune	Accès à l'eau et aux minéraux peu mobiles accru, résistance aux maladies, phytophagie et phénologie modifiées
Ectomycorhizes	Champignons supérieurs : basidiomycètes ascomycètes : milliers d'espèces	Arbres gymnospermes et angiospermes : 5 % des espèces actuelles	Manchon, mycélium intercellulaire, rhizomorphes, sclérotés, ascromata, basidiomata. Absence de pénétration intracellulaire	Hypertrophie corticale, ramifications dichotomiques ou racémeuses	Accès accru aux minéraux, utilisation de l'azote organique, résistance aux maladies et nématodes, tolérance aux pH acides et aux métaux lourds
Ectendomycorhizes	Deutéromycètes : quelques espèces	Pins, rares	Manchon mince, mycélium intercellulaire, pénétration intracellulaire, ascromata	Hypertrophie corticale, ramifications	<i>idem</i>
Arbutoides	Basidiomycètes : quelques espèces	Éricacées, rares	Manchon mince, pénétration intracellulaire, basidiomata	Hypertrophie corticale	<i>idem</i>
Éricoïdes	Ascomycètes : quelques dizaines d'espèces	Éricacées : 5 % des espèces actuelles	Mycélium intracellulaire, ascromata	Peu de modifications	<i>idem</i>
Orchidoïdes	Basidiomycètes et mycéliums stériles peu connus	Orchidées : 10 % des espèces actuelles	Mycélium intracellulaire pelotonné; basidiomycètes	Peu de modifications	Souvent essentiel à la morphogénèse, nutrition saprophytique de la plante, protection contre les pathogènes
Sebacioïdes	Piriformospora ; basidiomycètes : quelques espèces	Variées	Mycélium intracellulaire	Peu de modifications	Peu connus

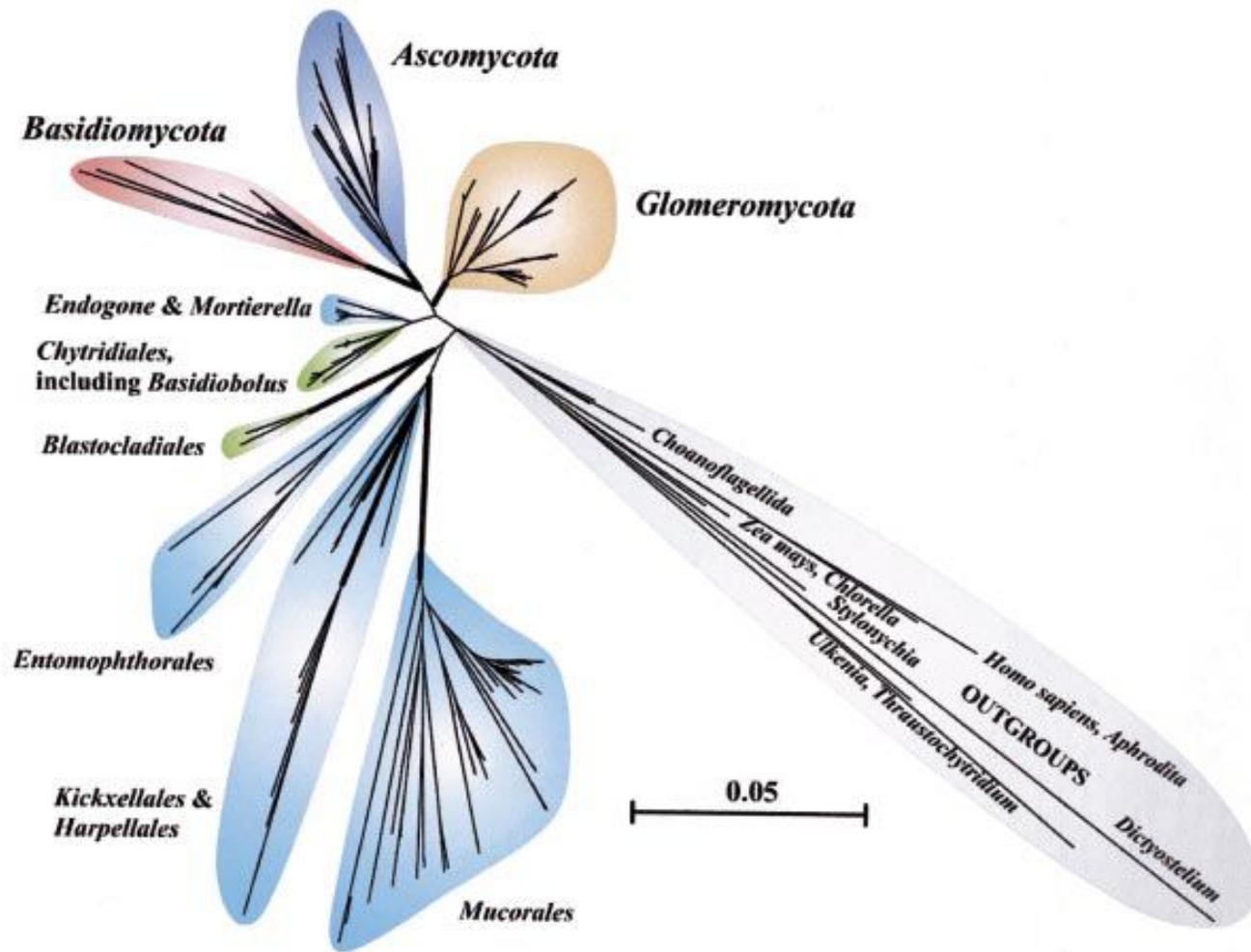


Figure 1. Classification phylogénétique du règne des Mycota (Fungi) basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques du gène 18S de l'ARNr. (Schüler, *et al.*, 2001).

CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS À ARBUSCULES

La symbiose mycorhizienne à arbuscules est la plus commune puisqu'elle concerne environ 80% des plantes terrestres. Ces champignons mycorhiziens sont microscopiques et biotrophes obligatoires. Ils sont classés dans le phylum *Glomeromycota*. La Figure 2, préparée et fournie gracieusement par Yolande Dalpé en janvier 2010, montre la classification phylogénétique récente de ce phylum. Les *Glomeromycota* forment des structures spécialisées intracellulaires appelées arbuscules dans les cellules corticales des racines. Les vésicules sont des structures fongiques de réserves intercellulaires formées dans le cortex racinaire, et qui contiennent des lipides et des noyaux. Elles n'existent pas chez toutes les espèces de champignons endomycorhiziens arbusculaires, par exemple, les genres *Gigaspora* et *Scutellospora* n'en forment pas. Les arbuscules sont des structures fugaces considérablement ramifiées qui augmentent la surface d'échange entre le champignon et la plante. Une fois la colonisation racinaire mise en place, un large réseau de mycélium extraracinaire se met en place pour explorer le sol environnant et infecter de nouvelles racines (Smith & Read, 2008). Les espèces de ce groupe forment les associations mycorhiziennes les plus répandues et fondamentaux dans la productivité des écosystèmes (Harrier, 2001).

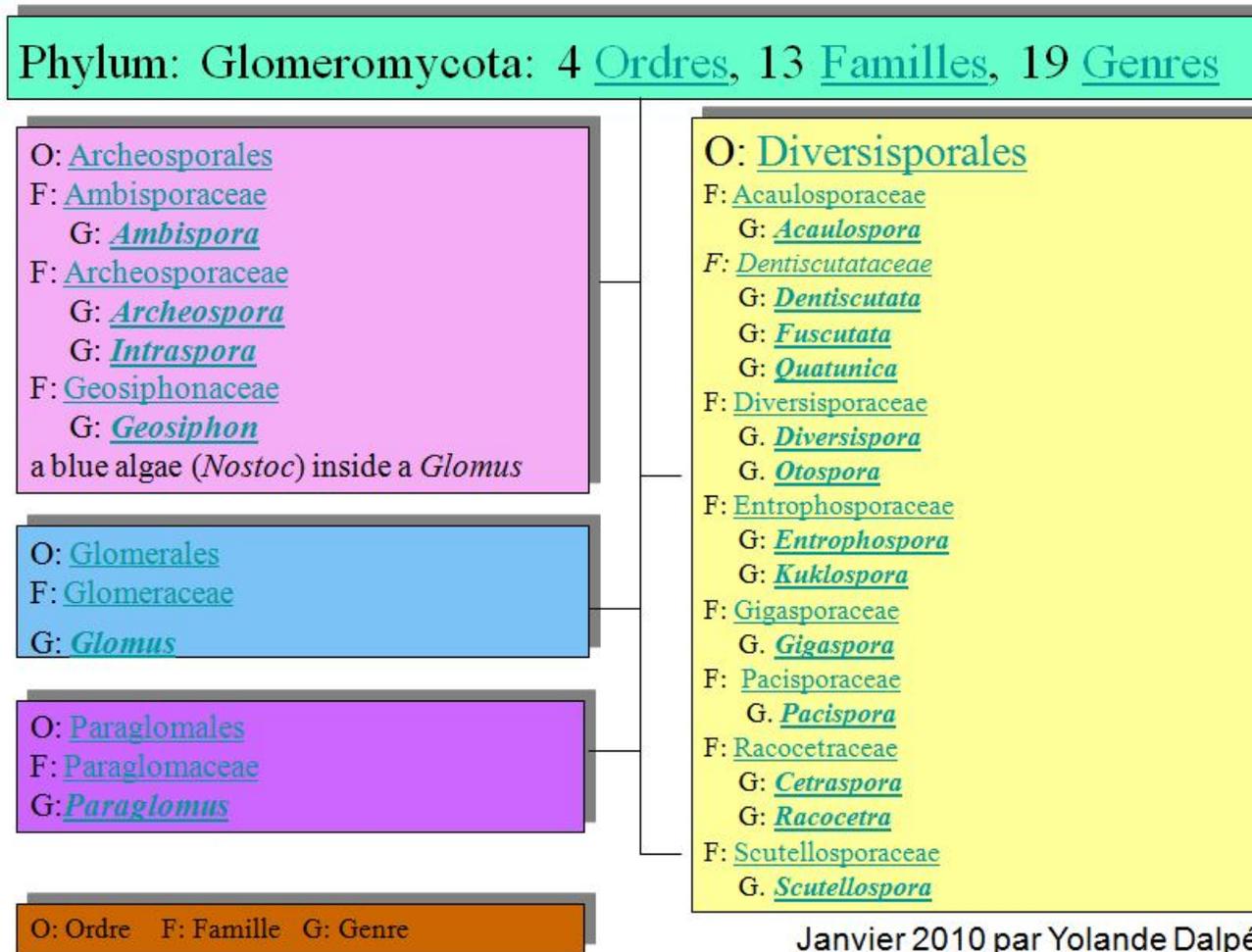


Figure 2. Classification phylogénétique du phylum *Glomeromycota*. Figure fournie par Yolande Dalpé (Janvier 2010)

Le *Glomus irregulare* est une espèce modèle très bien étudiée. Il était auparavant nommé *Glomus intraradices*, mais des recherches récentes en phylogénie moléculaire ont mis au jour que l'isolat utilisé (DAOM197198) fait plutôt partie de l'espèce récemment décrite *Glomus irregulare* (Stockinger, *et al.*, 2009). Sa croissance est rapide et il est facilement cultivable *in vitro* avec les racines de carotte transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. Il est omniprésent et abondant dans toutes sortes d'écosystèmes. Cette espèce biotrophe obligatoire s'associe à la plupart des plantes. Pour ces raisons, elle a été choisie pour ce projet de recherche.

L'objectif principal de ce projet de recherche étant d'isoler et d'identifier les bactéries intimement associées au champignon mycorhizien *Glomus irregulare* afin de pouvoir les étudier dans leurs interactions avec le champignon. Donc, les bactéries qui ont été étudiées dans ce travail de recherche ont été isolées sur des spores de *G. irregulare* prélevées dans des échantillons de sol naturel. Ces bactéries ont ensuite été mises en croissance sur du mycélium *in vitro* de *G. irregulare* pour que nous puissions étudier, par microscopie et par des méthodes de biologie moléculaires, les interactions qu'elles entretiennent avec les hyphes du champignon.

BACTÉRIES ASSOCIÉES AUX CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS

De nombreuses études ont montré que les mycorhizes jouent un rôle important dans la protection des plantes contre certains agents pathogènes, notamment des bactéries, des champignons, des protistes et des nématodes. L'article de synthèse de St-Arnaud et Vujanovic (2007) dans le manuel *Mycorrhizae in Crop Production* résume bien les différents effets des champignons mycorhiziens à arbuscules sur les maladies des plantes et les organismes pathogènes.

Dans le sol, les champignons mycorhiziens eux-mêmes sont associés avec des bactéries qui pourraient être impliquées dans des processus de biocontrôle (ou lutte biologique) et dans la mobilisation de nutriments. La biodiversité microbienne est très importante pour l'équilibre entre les végétaux et leur milieu. Un rôle central dans cet équilibre est joué par les symbioses mycorhiziennes qui permettent aux plantes de mieux s'adapter à leur milieu et d'améliorer leur croissance. De nombreuses études ont mis en évidence des associations entre les bactéries du sol et les champignons mycorhiziens associés aux racines des plantes (Bianciotto, *et al.*, 1996, Andrade, *et al.*, 1997, Andrade, *et al.*, 1998, Filion, *et al.*, 1999, Whipps, 2001, Barea, *et al.*, 2005, Marschner & Timonen, 2005, Artursson, *et al.*, 2006, Hildebrandt, *et al.*, 2006, Toljander,

et al., 2006). La notion de symbiose dans les sols est beaucoup plus complexe qu'on le croyait jusqu'alors. Ces associations symbiotiques complexes très importantes dans l'écologie des sols sont encore très mal connues et encore moins bien comprises (Barea, *et al.*, 2005).

BIOFILMS BACTÉRIENS

Un biofilm est formé de microorganismes établis en population sessile et emprisonnés dans une matrice de polysaccharides (Sutherland, 2001, Sutherland, 2001, Fujishige, *et al.*, 2006). Les bactéries capables de s'organiser en biofilm adhèrent à un support solide et ont une meilleure capacité d'adaptation et de résistance aux conditions du milieu (Espinosa-Urgel, 2004). La plupart des bactéries du sol s'organisent en biofilm sur les racines et les particules du sol (Costerton, *et al.*, 1987). Toutefois, l'étude de ces structures est compliquée par la difficulté à cultiver une grande partie des espèces présentes (Burmolle, *et al.*, 2006). Des méthodes physiologiques, biochimique et moléculaires peuvent être utilisées pour contourner ces problèmes (Amann, *et al.*, 1995, Aoi, 2002, Singh, *et al.*, 2006). Les structures bactériennes formant des biofilms autour des hyphes des champignons mycorhiziens ont probablement un rôle important dans la capacité accrue que certaines plantes

ont à faire face aux agents pathogènes dans le sol (Whipps, 2001, Timmusk, *et al.*, 2005).

La grande majorité des études faites sur les biofilms portent sur la plaque dentaire ou les biofilms qui se forment en surface des équipements de dentisterie, en industrie alimentaire, en médecine et dans les usines de traitement des eaux (Watnick & Kolter, 2000, Sutherland, 2001, Aoi, 2002, Rickard, *et al.*, 2003, Beyenal, *et al.*, 2004). La formation des biofilms sur les surfaces biotiques (ici les hyphes de *G. irregulare*) est relativement peu connue jusqu'à maintenant. Quelques équipes de recherche ont néanmoins étudié des biofilms se formant sur les racines de plantes (Timmusk, *et al.*, 2005 , Fujishige, *et al.*, 2006 , Rudrappa, *et al.*, 2008). Des recherches récentes s'intéressent maintenant à la formation des biofilms bactérien associés aux surfaces de champignons du sol et leurs éventuelles applications technologiques (González-Chávez, *et al.*, 2008, Seneviratne, *et al.*, 2008). Certaines études sur les biofilms se font avec des bactéries qui proviennent de collections de cultures (Timmusk, *et al.*, 2005, Li, *et al.*, 2007, Paramonova, *et al.*, 2007, Wijman, *et al.*, 2007), d'autre se font avec des bactéries isolées directement d'échantillons environnementaux (Burmolle, *et al.*, 2006, Burmolle, *et al.*, 2007).

OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Plusieurs techniques de microscopie peuvent être utilisées pour étudier les champignons mycorhiziens, la formation de structures ressemblant à des biofilms et les associations bactériennes sur différentes surfaces. Les techniques de microscopie optique (confocale) et électronique ont été utilisées avec succès à cette fin (Bianciotto, *et al.*, 1996, Bloemberg, *et al.*, 2000, Vierheilig, *et al.*, 2005, Bloemberg, 2007, González-Chávez, *et al.*, 2008). L'article de synthèse de l'équipe de Vierheilig (2005) donne un aperçu des différentes méthodes de visualisation des champignons mycorhiziens dans les racines des plantes. La microscopie confocale avec fluorescence a été utilisée pour observer l'attachement de souches bactériennes choisies cultivées en laboratoires sur la surface des champignons mycorhiziens à arbuscule (Bianciotto, *et al.*, 1996). Des bactéries endosymbiotiques ont aussi pu être observées par microscopie électronique à transmission à l'intérieur des spores du champignon mycorhizien *Gigaspora margarita* (Bianciotto, *et al.*, 1996). L'équipe de Bloemberg a, quant à elle, étudié la capacité du *Pseudomonas fluorescent* à exprimer différentes couleurs de fluorescence lorsqu'il colonisait des racines de tomate et la possibilité d'observer par microscopie confocale à balayage laser plusieurs couleurs de fluorescence simultanément (Bloemberg, *et al.*, 2000). Plus récemment, l'équipe de González-Chávez (2008) a utilisé la microscopie à

fluorescence et la microscopie électronique à transmission pour observer la présence de bactéries sur la surface des hyphes du champignon mycorhizien *Glomus claroideum* dans du sol pollué avec des métaux lourds sans toutefois s'intéresser à l'identification de celles-ci (González-Chávez, *et al.*, 2008).

Ce qui diffère dans notre projet de recherche, c'est que nous avons isolé, identifié et utilisé des bactéries présentes sur la surface des spores de champignons mycorhiziens prélevées dans un sol naturel non pollué, contrairement aux autres projets de recherche qui utilisaient généralement des souches bactériennes choisies et élevées en laboratoire. De plus, ces bactéries «sauvages» ont été utilisées pour tenter d'observer la formation de structures ressemblant à des biofilms sur la surface des hyphes de champignons mycorhiziens, des structures vivantes et relativement fugaces. La majorité des études de ce genre portent sur des supports inertes, ou du moins plus résistants, telles les racines des plantes. Très peu d'études relatent d'observations de bactéries poussant sur les hyphes de champignons mycorhiziens.

ANALYSE ET COMPARAISON DE LA BIODIVERSITE MICROBIENNE

Seule une très petite proportion des bactéries du sol est cultivable *in vitro* (Amann, *et al.*, 1995, Burmolle, *et al.*, 2006). Il en est probablement de même avec les bactéries associées aux hyphes des champignons mycorhiziens. Cette situation est attribuable aux besoins nutritifs complexes et à la biotrophie obligatoire de plusieurs d'entre elles. Des techniques de biologie moléculaire permettent d'avoir une vision globale de cette diversité microbienne sans avoir à passer par les étapes d'isolation et de culture *in vitro*. L'amplification par PCR suivie d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (PCR-DGGE) de la région V3 du gène 16s de l'ARNr est une technique qui est déjà utilisée avec succès dans ce but (Roesti, *et al.*, 2005).

HYPOTHÈSES

Selon les informations retrouvées dans la littérature sur le sujet, les hypothèses recherche suivantes ont été formulées :

- 1- Les bactéries intimement associées aux spores des champignons mycorhiziens à arbuscules peuvent être isolées et peuvent pousser *in vitro* sur les hyphes de ces champignons (mycosphère) même en l'absence d'éléments nutritifs autres que les exsudats libérés par les hyphes dans le milieu environnant.
- 2- Ces bactéries associées aux champignons mycorhiziens s'organisent en structures ressemblant à des biofilms sur la surface du mycélium fongique.
- 3- La biodiversité microbienne intimement associée aux champignons mycorhiziens est nettement moins grande que celle de la rhizosphère d'où celle-ci est isolée.

OBJECTIFS

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était d'isoler, de cultiver et d'identifier les bactéries intimement associées au champignon mycorhizien *Glomus irregulare*. Il s'agissait alors de vérifier par microscopie leur capacité à former des structures ressemblant à des biofilms en interaction avec le mycélium de ce même champignon mycorhizien (chapitre 2 et annexe 1). Il était aussi prévu de faire une comparaison par biologie moléculaire de la biodiversité microbienne totale du sol étudié et de celle associée au champignon *G. irregulare* (annexe 2), ainsi que d'identifier les taxons bactériens qui ont été isolés à partir des spores de celui-ci (chapitre 2).

CHAPITRE 2. SPATIO-TEMPORAL INTERACTIONS BETWEEN SOIL BACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ¹

ABSTRACT

Soil-microbe symbioses are of fundamental importance for plant adaptation to their environment. Research in microbial ecology has revealed that some soil bacteria are associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). However, these interactions may be much more complex than originally thought. To assess the type of bacteria associated with AMF, we initially isolated spores of *Glomus irregulare* from an *Agrostis stolonifera* rhizosphere. The spores were washed with sterile water and plated onto *G. irregulare* mycelium growing *in vitro* in a root free compartment of bi-compartmented

¹ Julie Lecomte, Marc St-Arnaud and Mohamed Hjiri, *Institut de recherche en biologie végétale, Département de sciences biologiques, Université de Montréal, 4101 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, H1X 2B2, Canada.* Ce manuscrit sera prochainement soumis pour publication.

Petri dishes. We hypothesized that this system should select for bacteria closely associated with the fungus since the only nutrients available to the bacteria were those derived from the hyphae. Twenty-nine bacterial colonies growing on the AMF hyphae were subcultured, and identified using 16S rRNA gene sequences. All bacterial isolates showed high sequence identity to *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *Kocuria rhizophila*, *Microbacterium ginsengisoli*, *Sphingomonas* sp. and *Variovorax paradoxus*. We also assessed bacterial diversity on the surface of spores by PCR-DGGE. We used live cellular imaging to show that bacteria are able to grow on the surface of hyphae with different growing patterns and formed biofilm-like structures in contrast to *E. coli* as a control.

Keywords : Arbuscular Mycorrhizal Fungi, symbiosis, bacteria, soil, DGGE, rDNA.

INTRODUCTION

Soil microorganisms constitute an important source of biodiversity in soil and are an integral part of terrestrial ecosystems. They contribute to major biological functions such as nutrient and gas cycling, biogeochemical processes and the decomposition and transformation of organic matter. Fungi are also very abundant in the soil and may represent up to 80% of soil microbial biomass (Kirk, *et al.*, 2004). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are plant-root symbionts, and are the most abundant and widely distributed fungi in the soil (Smith & Read, 2008). They act as a root extension via their extensive mycelial network, which can explore a much larger soil volume than roots themselves, and can therefore increase the plant's uptake of essential minerals and water. These fungi also play an important role in plant growth and protection against soil-borne pathogens (Hamel, 2004, St-Arnaud & Vujanovic, 2007).

Rhizosphere bacterial communities can be affected by mycorrhizal root colonization (Mansfeld-Giese, *et al.*, 2002, Marschner & Baumann, 2003, Marschner & Timonen, 2005, Marschner & Timonen, 2006). Many researchers have reported that some soil bacteria are specifically associated with AMF; for example, Bianciotto *et al.* (1996) showed that soil microorganisms can directly

or indirectly interact with AMF via the exudates the latter released in soil. AMF exudates were also shown to influence the vitality of soil bacteria (Toljander, *et al.*, 2007). Microbial interactions in rhizosphere are much more complex than was originally believed (St-Arnaud, *et al.*, 1995, Filion, *et al.*, 1999). Recently, AMF root colonization was shown to modify the bacterial community structure of tomato rhizosphere through mechanisms unrelated to root exudation by the host plant (Lioussanne, *et al.*, 2010).

The dominant bacterial organization in nature is a biofilm, a population of bacteria embedded in an exopolysaccharide secreted matrix on a surface (Fujishige, *et al.*, 2006). This organization has several advantages for bacteria since it promotes higher resistance to environmental and biological stresses than for planktonic cells (Burmolle, *et al.*, 2006). In natural ecosystems, it has been shown that up to 99% of all bacterial activities are associated with biofilms attached to solid surfaces (Costerton, *et al.*, 1987, Potera, 1996). However, biofilms are generally more complex than a single population, involving different bacterial taxa and other microorganisms living in a community (Watnick & Kolter, 2000). Standard microbiological techniques may allow the culture of as few as 1% of the soil bacterial taxa, and this 1% may not represent the bacterial community in a biofilm (Kirk, *et al.*, 2004). However, other authors have suggested that the majority of bacterial strains present in some soil-biofilms are cultivable (Burmolle, *et al.*, 2007). One could speculate that bacteria which are capable of biofilm formation on the surface of

AMF mycelia may play an important role in certain functions associated with AMF such as nutrient mobilization and protection against pathogens.

The objective of this study was to analyze the spatio-temporal interactions between soil bacteria and the mycelium of the AMF *Glomus irregulare* isolate DAOM 197198 previously known as *Glomus intraradices* (Stockinger, *et al.*, 2009). Bacterial strains were isolated from *G. irregulare* spores harvested from the rhizosphere of *Agrostis stolonifera* growing in a natural stand. Bacteria were inoculated on mycelium of *G. irregulare*, grown *in vitro* on a water media without host roots, and were analyzed microscopically after 15, 30 and 45 days. We hypothesized that the bacteria closely associated with fungus spores would be able to grow on the surface of AMF hyphae, which constitute the sole source of energy in this system. *E. coli* (non-soil bacteria) and *Pseudomonas* sp. (soil bacteria not isolated from AMF spores) were used as controls to compare the bacterial growth and attachment on fungal mycelium.

MATERIALS & METHODS

Sampling

Sampling was conducted in the Mirabel-Lachute area (Quebec, Canada) on June 2006 in a natural stand colonized with herbaceous and deciduous shrubs growing on a sandy soil. The sampling site was chosen because a *G. irregulare* strain has been previously identified from AM fungal spores harvested from *Agrostis stolonifera* L. roots collected from the same site in 1991 (Y. Dalpé, personal communication). Six *A. stolonifera* plants with roots and approximately 1 L of the surrounding soil were collected. GPS coordinates of the six sampling site were between 45°41'36.35''N 74°08'33.32''W and 45°41'33.52''N 74°08'31.50''W. There was about 10 m between each plant collected. Samples were kept at 4° C and processed in a few days after sampling.

Assessment of root mycorrhizal colonisation

The percentage of root length bearing mycorrhizal colonisation was assessed prior selecting the samples for isolation of *Glomus irregulare* spores. Roots of *Agrostis stolonifera* were washed, cut into 1 cm sections and mixed in water. Ink and vinegar (Vierheilig, *et al.*, 1998) were used to stain fungal structures in the roots. Assessment of the colonization extent was done using a dissection microscope using the gridline intercept method (Giovannetti & Mosse, 1980).

Isolation and identification of *Glomus irregulare* spores harvested from soil

To reduce the bias due to variation in local composition of the soil, a composite sample was prepared by mixing six 100 g rhizosphere soil samples from each sampling point. This composite soil sample was used for spore extraction. AM fungal spores were isolated by wet soil sieving (45 μ m pore size) and sucrose density gradient centrifugation (Vilarino & Arines, 1990). Collected spores were kept in sterile water at 4°C until use. The identity of

collected spores was determined by PCR amplification and sequencing of 18S rRNA genes, as described in Kowalchuk *et al.* (2002) and modified by Yergeau *et al.* (2006).

Isolation of bacteria from spore surface

Glomus irregulare isolate DAOM 197198 (previously known as *G. intraradices* Schenck & Smith) was grown on root inducing (Ri T-DNA) transformed carrot (*Daucus carota* L.) roots in two-compartment 100 × 15 mm Petri dishes, as described in St-Arnaud *et al.* (1996). The first compartment containing the transformed carrot roots was filled with 20 mL M medium, while the second compartment received 20 ml sterile water solidified with 0.4 % (w/v) gellan gum (Sigma), containing 0.74 g L⁻¹ MgSO₄ but lacking nutrients. Plates were incubated for approximately 6 weeks at 25°C in the dark until hypha crossed the central wall and colonized the second compartment. *Glomus irregulare* spores harvested from the field were cleaned with autoclaved MilliQ water and placed directly in contact with hyphae growing in the second compartment. An additional incubation period of 4 weeks at 25°C in darkness was required to allow bacterial growth. Mixed bacterial colonies growing around hyphae were isolated and purified by successive inoculations on 10% Tryptic-Soy Agar medium (TSA, QueLab Laboratories, Canada).

Identification of isolated bacteria

The complete 16S rRNA gene was used to identify bacterial isolates. Bacterial cells (1 μ L of 20-fold dilution of overnight bacterial cultures) were directly used as a template in PCR reactions. All reactions were conducted in 50 μ L volume containing PCR buffer with 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 M each of primers pA (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and pH (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) designed by Edwards et al. (1989), 0.6 μ L of DMSO and 1.25 U of *Taq* polymerase (Qiagen TAQ PCR Core Kit). PCR was performed using a Mastercycler ep S gradient thermocycler (Eppendorf, Canada) with the following conditions: 5 min at 94°C, followed by 29 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C and 1 min at 72°C, and finally one cycle of 7 min at 72°C. PCR amplicons were sequenced at Genome Quebec Innovation Center (Montreal, Canada). *E. coli* cells and sterile water were respectively used as positive and negative controls. Sequences were identified by BLASTn searches in the NCBI nucleotides database, and the seven different sequences obtained were deposited in the EMBL database under accession numbers: FN668006 to FN668012.

Bacterial biodiversity associated with *G. irregulare* spores

A single washed *G. irregulare* spore isolated from soil was directly put in a PCR tube and crushed with pipette tip, and the 16S rRNA gene was amplified using a nested-PCR protocol. The first round was performed with pA and pH primers (Edwards, *et al.*, 1989) and the second round using primers 968-GC/1378 (Heuer, *et al.*, 1997) to amplify approximately a 500 bp fragment corresponding to the hypervariable regions V6 to V9. Bacterial biodiversity was assessed by running the amplicons through denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), as described in Yergeau *et al.* (2006) modified from Heuer *et al.* (1997) with a 45-65% denaturant gradient using a DCode Universal Mutation Detection System (BioRad).

DGGE is a molecular fingerprinting electrophoresis-based method that separates PCR products. Its principal is based on separation of DNA fragment in a denaturing gradient in an acrylamide gel. A G-C clamp is added to one to the primer used in PCR. This pairing insures stability of double strand DNA allowing separation of fragment that differs in their sequence. This method is commonly used to assess microbial diversity.

Assessment of interactions between *G. irregulare* and bacteria

Two-compartment Petri dishes were prepared as described above (St-Arnaud, *et al.*, 1995) except that after solidification of the gel, sterile 22 × 22 microscope cover glasses were placed along the central wall, and a further 3 mL of gellified sterile water was poured over the edge of cover glasses to form a bridge helping the fungus to cross (see Figure 7, annexe 1 p. 74). Plates received transformed carrot roots inoculated with *Glomus irregulare* in compartment filled with M medium and the roots were regularly trimmed to avoid any crossing into the second compartment where only the hyphae were allowed to grow. When hyphae grew over the coverslip, they were inoculated with various bacterial isolates from cultures grown in liquid TSB medium for 24 H. All bacterial cells were rinsed and the concentrations were adjusted to 10⁶ CFU mL⁻¹ with sterile 0.9% NaCl solution before use. A 150 µL aliquot of each bacterial suspension was deposited directly on the top of the coverslip where hyphae were growing. Each bacterial isolate was replicated five times and the controls included *E. coli* JM101 strain as a non-soil bacteria, *Pseudomonas* sp. strain B129 as a soil bacteria not isolated from AM fungi spores, and sterile water, with or without fungi, as a negative control. *Pseudomonas* sp. (B129) was previously isolated from the rhizosphere of black spruce [*P. mariana* (Mill.) B.S.P.] grown at the St-Modeste Forest Nursery (Québec, Canada)

(Filion, *et al.*, 2004). Cultures were incubated in the dark at 25°C for 15, 30 and 45 days prior to observations with a Axio Imager M1 microscope equipped with DIC (Zeiss).

RESULTS

Isolation of bacteria from *Glomus irregulare* spores

AM fungal spores were collected from the soil samples (Figure 3A). Morphological features such as color, size and shape were typical to *Glomus irregulare*. We confirmed the identity of these spores by sequencing of the 18S rRNA gene amplified by PCR from single spores. The obtained sequences showed 100% homology with *G. irregulare* isolate DAOM197198 (accession number AJ852526). After one month of incubation of these spores on the *G. irregulare* hyphae growing *in vitro* on water/gellan gum medium, bacterial growth was clearly visible around hyphae as shown in Figure 3B and C. These colonies were re-inoculated repeatedly until single morphotypes were obtained on TSA medium. In total, 29 morphotypes were recovered. PCR amplification

and sequencing of the 16S rRNA gene allowed grouping these 29 morphotypes into seven different bacterial taxa (Table II). BLASTn searches of 16S rRNA gene showed sequence homologies higher than 99% for all isolates except *B. simplex* (98.8%).

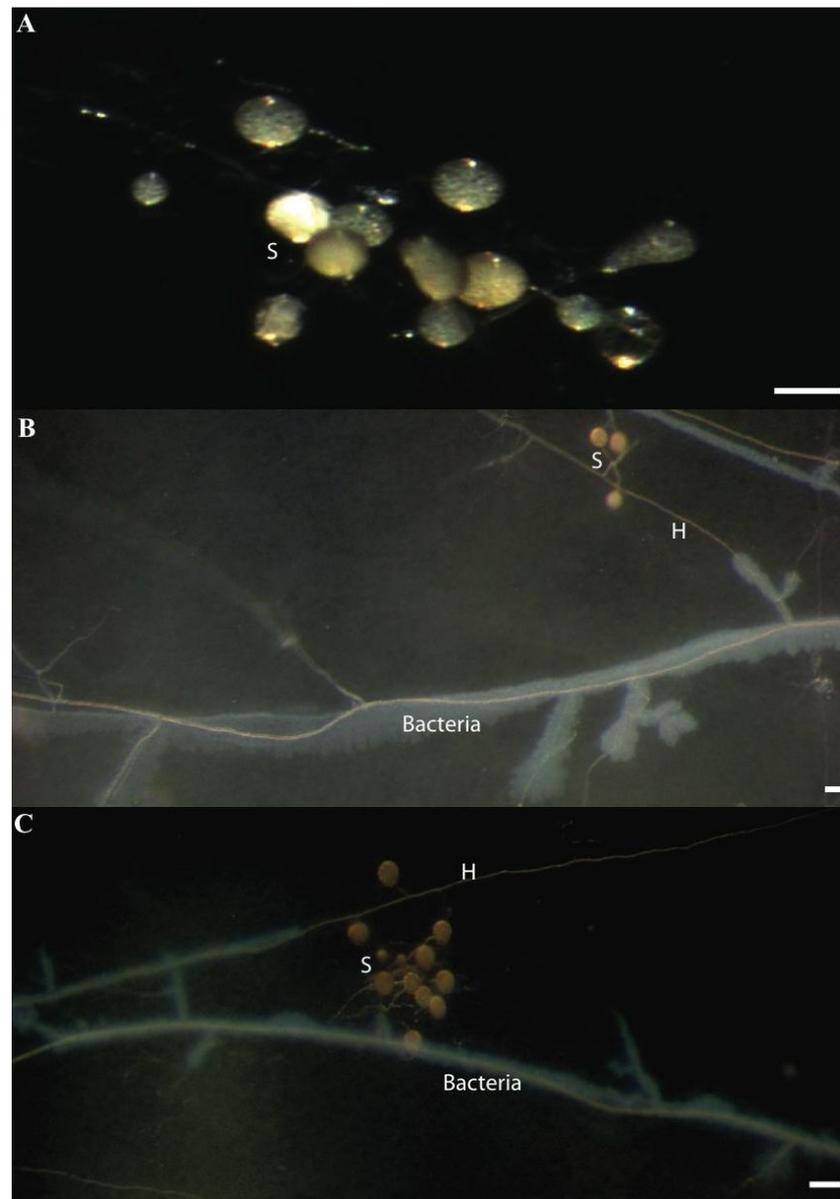


Figure 3. **A-** Morphology of spores (S) isolated from soil. **B** and **C** - Patterns of mixed bacterial colonies growing from washed *Glomus irregulare* spores extracted from natural soil and incubated 1 month on *G. irregulare*. isolate DAOM 197198 hyphae (H) growing *in vitro* on a gellan gum medium without nutrients. Scale bars represent 200 μm in panel A; 100 μm in panels B and C.

Table II. Bacterial taxa to which belong the 29 bacterial isolates recovered from *Glomus irregulare* spores isolated from natural soil and identified by sequencing of a 16S rRNA gene fragment.

Isolate	Number of morphotypes	Phylogenetic affiliation (strain, accession number)	% Identity (sequence length)
SE712	1	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579, AE016877)	99.1 (1438 bp)
SE342	2	<i>B. megaterium</i> (SB 3112, GU191918)	99.7 (1445 bp)
SE713B	3	<i>B. simplex</i> (N25, GU086427)	98.8 (874 bp)
SE713J	2	<i>Kocuria rhizophila</i> (TA68, NR026452)	99.9 (1424 bp)
SE33c	5	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> (unknown, AB271048)	99.9 (1412 bp)
SE31c	3	<i>Sphingomonas</i> sp. (MUELAK1, EF628247)	99.8 (1386 bp)
SE1342c	13	<i>Variovorax paradoxus</i> (rif200835, FJ527675)	99.8 (1430 bp)

Assessment of bacterial biodiversity

DGGE patterns of 16S bacterial gene fragments amplified from field-collected *Glomus irregulare* spores showed a total of 37 migration positions, with 17 to 24 bands per sample (Figure 4, lanes 1 to 3). The three individual spores showed fairly different banding patterns with only seven bands common to all spores and between five to nine bands unique to each spore, indicating that bacterial communities varied markedly among spores. The positive control *E. coli* showed one very bright band (Figure 4, lane 5) and few very faint bands that are probably contamination of the lane 5 by marker of the lane 4 that occurred when charging the gel. However, the negative control did not show any band (Figure 4, lane 6).

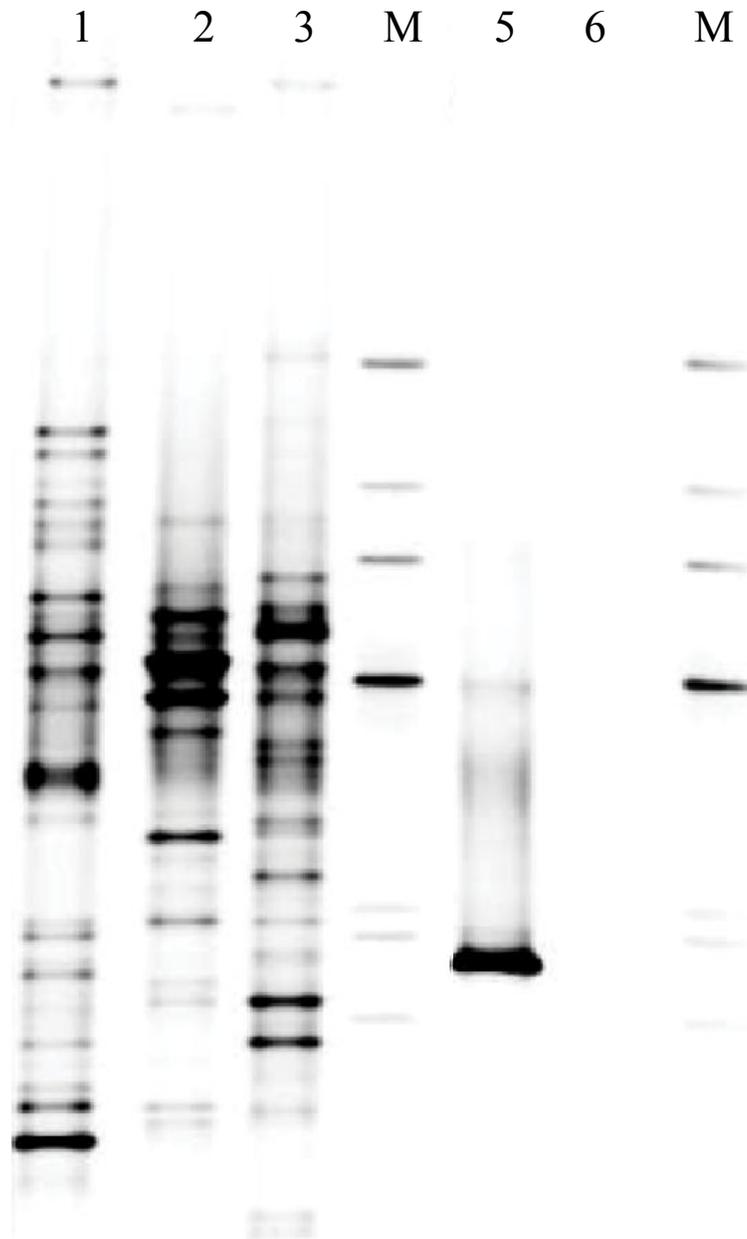
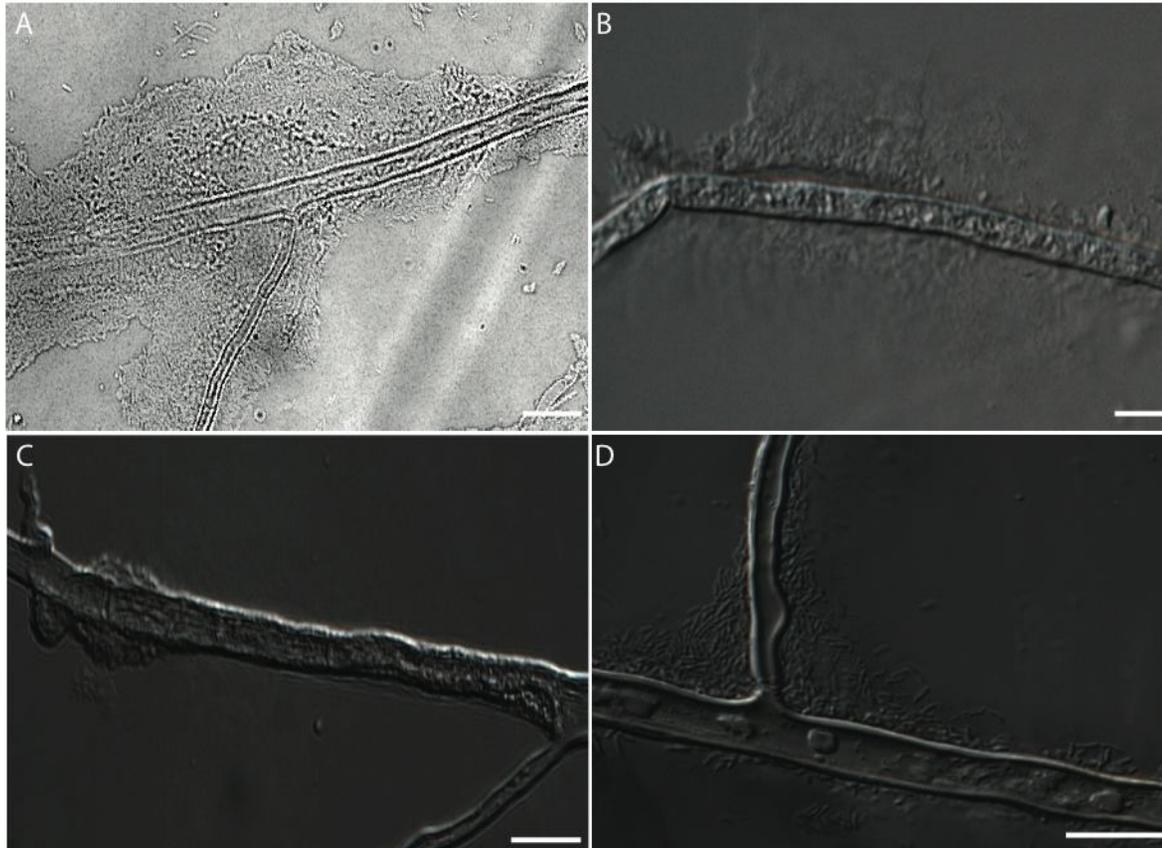


Figure 4. DGGE pattern of V9 portion of 16S rRNA gene. Lanes 1 to 3 are bacterial DNA from one individual *G. irregulare* spore taken in natural soil. Lane 5 is positive control (*E. coli*) and lane 6 is negative control (sterile water). Lanes M are markers (see annexe 4).

Interactions between bacteria and *G. irregulare* mycelium.

When inoculated on *G. irregulare* mycelium grown *in vitro*, bacterial isolates grew exclusively along hyphae and around spores and showed different growth speed and patterns. Some bacterial isolates, such as *Bacillus simplex* and *Pseudomonas* sp. (Figure 5A and G), showed profuse development around hyphae after 15-30 days of incubation. Other isolates, as *K. rhizophila*, *V. paradoxus* and *Microbacterium ginsengisoli* (Figure 5B, D and F) showed very little growth after 30 days but significant growth and attachment after 45 days of incubation. On the other hand, *B. cereus* showed little if any growth on the fungal surface (data not shown). Contrary to the spore-collected bacteria, the non-soil control bacteria *E. coli* showed no growth on the water media and little affinity to the fungal surface (Figure 5H). The negatives controls, sterile water inoculated on the mycelium and sterile water inoculated on the media without mycelium, showed no growth (data not shown). The growth and attachment of the bacterial isolates on the hyphal surface are summarized in the Table III.



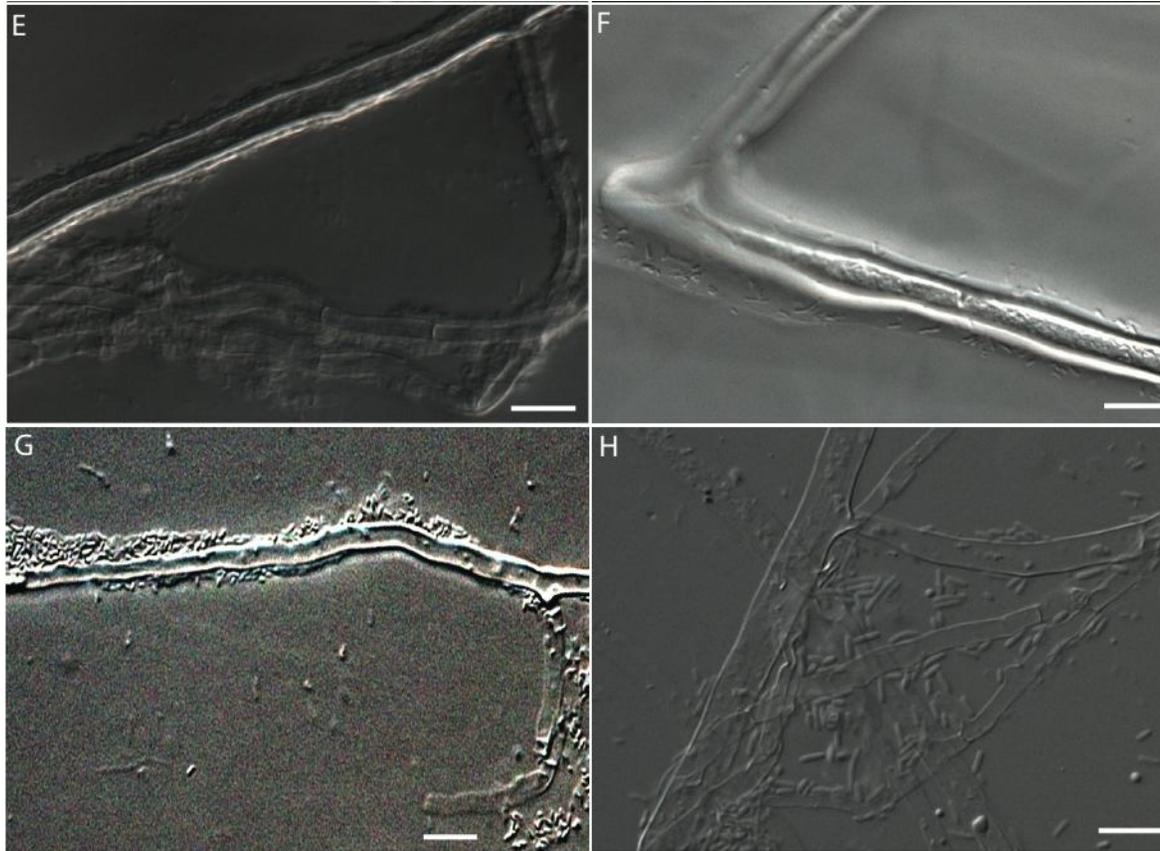


Figure 5. Bacterial growth patterns on *G. irregulare* hyphae cultivated *in vitro* observed with a DIC microscope using a 63X objective. Panel **A**, *Bacillus simplex*; **B**, *Kocuria rhizophila*; **C**, *Bacillus megaterium*; **D**, *Variovorax paradoxus*; **E**, *Sphingomonas* sp; **F**, *Microbacterium ginsengisoli*; **G**, *Pseudomonas* sp.; and **H**, *E. coli*. A and G bacteria have 15 days of growth; B and C - 30 days of growth and D, F, E and H - 45 days of growth. Scale bars represent 10 μm.

Table III. Growth and attachment on *G. irregulare* (GI) mycelium of bacteria isolated from field-harvested AM fungus spores, on a water media at 25 °C after 15, 30 and 45 days of incubation.

Most similar bacterial taxa	15 days Incubation		30 days Incubation		45 days Incubation	
	Bacterial Growth	Bacterial Attachment to GI	Bacterial Growth	Bacterial Attachment to GI	Bacterial Growth	Bacterial Attachment to GI
<i>Variovorax paradoxus</i>	+	-	+	-	++	++
<i>Sphingomonas</i> sp.	+	-	+	-	+	+
<i>Microbacterium</i> sp.	+	-	+	-	+	+
<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	++	+	++	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus simplex</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Kocuria rhizophila</i>	+	-	++	++	++	++
<i>E. coli</i> (non-soil bacterial control)	++	-	++	+ / -	++	+ / -
<i>Pseudomonas</i> sp. (soil bacterial control)	++	++	+++	+++	+++	+++
Sterile water (no bacteria inoculated)	-	-	-	-	-	-

DISCUSSION

Twenty-nine bacterial morphotypes associated with *G. irregulare* spores were successfully recovered in the present work. 16S rRNA gene sequencing showed that they belong to only seven different bacterial taxa: *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *Kocuria rhizophila*, *Microbacterium ginsengisoli*, *Sphingomonas* sp. and *Variovorax paradoxus* (Table II), which was the most frequent bacterial taxa isolated (13/29 morphotypes). All these bacterial taxa are commonly found in soil. The results supported the hypothesis that bacteria adhering onto the spore surface and likely living on AMF mycelium surface, were able to grow *in vitro* with AMF hyphae as the sole energy source. It is likely that the bacterial taxa having grown around *Glomus irregulare* hyphae *in vitro* were mostly taxa adapted to metabolize the molecules released by the hypha since no other nutrients were available. However, it is also likely that this method would isolate only the most competitive and fast-growing taxa whose portion of the total bacterial biodiversity is unknown. Kirk *et al.* (2004) estimated that standard microbiological techniques may allow the growth of only about 1% of the soil bacterial taxa from environmental samples. Some bacterial taxa possibly present in the samples could have been obligatory biotrophs since such associations have been previously found in AMF spores (Bianciotto, *et al.*, 2000). However, the bacteria used as a soil control

(*Pseudomonas* sp.) but which had not been detected in bacterial isolates from field collected spores was also able to grow on the experimental system and to form biofilm-like structures on mycelia surface (Figure 5G). This could be explained by the low number of field collected spores used for bacterial inoculation. A higher number of replicates could have allowed isolation of numerous other bacterial taxa as suggested by DGGE that explored biodiversity of bacterial communities present on AM field collected spores and in total soil bacterial DNA. Moreover, Lioussanne, *et al.* (2010) have found different bacteria (*Pseudomonas* spp., *Herbaspirillum* sp., *Acidobacterium* sp., *Bacillus* spp., *Verrucomicrobium* sp.) specifically associated with *Glomus irregulare* (*intraradices*) or *G. mosseae* (Lioussanne, *et al.*, 2010). Of these bacteria, only *B. simplex* was found in our isolates thus supporting the hypothesis that using a higher number of samples would have permit to isolate more and probably very different bacterial taxa.

In addition, the non soil bacterial control (*E. coli*) grew on the experimental system without nutrient inputs other than AM exudates, but did not form biofilm-like structures. This suggests that the AM exudates contain, among other things, sugars (Hooker, *et al.*, 2007, Toljander, *et al.*, 2007) and organic acids such as citric acid (Tawaraya, *et al.*, 2006) that are sufficient to support a large variety of bacterial taxa. It was also demonstrated that AM exudates changes vitality and bacterial soil community in *in vitro* conditions (Toljander, *et al.*, 2006, Toljander, *et al.*, 2007) and among the same bacterial

species, nutritive needs could change substantially as shown with different strains of *Bacillus simplex* and their carbon source utilisation (Sikorski, *et al.*, 2008). However, we must not forget that the *in vitro* experimental conditions do not fully reflect the environmental soil conditions, where biotic and abiotic conditions are highly variable in space and time. AM spore-associated bacteria themselves have been found to change the mycorrhizal colonisation, plant growth and also pathogen relationship in potato plants (Bharadwaj, *et al.*, 2008, Bharadwaj, *et al.*, 2008).

Using DGGE, we assessed bacterial biodiversity of washed spores of *G. irregulare* isolated from soil and of total bacterial DNA extracted from soil samples (Figure 4). DGGE patterns from three field-collected spores were markedly different in the number of bands formed but mainly on their migration position, indicating a widely different community structure between spores. The number of bands ranged from 17 to 24, and although 29-41% of band positions were common to all spores, 28-38% were unique to each one. The markedly variable banding pattern seen on the DGGE clearly shows that a much higher number of bacterial taxa were associated with the spores than the number suggested by isolation. Soils may contain non-cultivable taxa or taxa with specific nutritional needs that were not met with the isolation protocol used in this study. Certain of the bacterial isolates recovered from the spores were also analyzed in DGGE. However, our DGGE analyses confirmed that we isolated only a very small proportion of bacterial taxa living on the surface of

AMF spores. In addition, bacterial community structure greatly varies among spores. It should be remembered that we cannot tell for certain if these spores originate from the same location because we mixed 6 samples taken from 6 sites to reduce the bias due to variation in local composition of the soil. Soil biotic and abiotic conditions where each AM spore used were taken could be very different and change bacterial pattern associated with AM fungal spores.

Spatio-temporal interactions between the isolated bacteria and the mycelium of *Glomus irregulare* isolate DAOM-197198 were assessed *in vitro* in absence of nutrients other than those derived from the mycelium. The seven bacterial taxa were inoculated at similar concentrations on the mycelium and incubated for 15, 30 or 45 days prior to observation. All bacterial taxa except for *Bacillus cereus* grew on the surface of hyphae and spores (Table III and Figure 5). Growth rates and patterns were however different between taxa. For example, *B. cereus* was rarely detected and very slow growing. In contrast, *B. simplex* was a fast grower on the hyphal surface and formed morphological structures analogous to a biofilm. Bacterial species of genus *Bacillus* are ubiquitous in soil. Most taxa are not known as pathogens for plants or fungi, but *B. cereus* can produce an enterotoxin and be a source of food-related illness for animals including humans (McKillip, 2000). This isolate might be opportunistic, contaminating the bacterial community growing on mycelium at the isolation step. In this study, *B. megaterium* shows important growth and little ability to form biofilm-like structure on the *G. irregulare* mycelium. *B.*

megaterium has been reported as improving plant growth when inoculated with *Glomus irregulare (intraradices)* (Marulanda-Aguirre, *et al.*, 2008). *Variovorax paradoxus* was fast growing, formed a dense colony around hyphae yet only after 45 days of incubation, and was the most frequently isolated species in the present study. This *Proteobacteria* was also previously reported as a frequently isolated species in the *G. irregulare (intraradices)* hyphosphere (Mansfeld-Giese, *et al.*, 2002) and was also recovered from the hyphosphere of *Glomus mosseae* (Andrade, *et al.*, 1997). The taxon was shown to promote plant growth (Belimov, *et al.*, 2001, Schmalenberger, *et al.*, 2008). Leadbetter and Greenberg (Leadbetter & Greenberg, 2000) showed that *Variovorax* spp. have the ability to survive with acyl-homoserine lactone as their only source of nitrogen and energy. These types of molecules are quorum sensing signals dedicated to gene-regulation in response to the population density (Parsek, *et al.*, 1999). Interestingly, acyl-homoserine lactone has been more frequently reported to be synthesised by plant associated *Pseudomonas* spp. than from soilborn isolates (Elasri, *et al.*, 2001). Members of genus *Variovorax* have a high ecological importance and biotechnological application potential because they are involved in many types of biodegradation (Abou-Shanab, *et al.*, 2007, Schmalenberger, *et al.*, 2008). The second most often isolated species was *Microbacterium ginsengisoli*. Two other species from the same genus, *M. esteraromaticum* and *M. liquefaciens* were previously isolated from *G. irregulare (intraradices)* hyphosphere (Mansfeld-Giese, *et al.*, 2002). This

strain showed evidence of biofilm-like structure after 45 days of incubation. *Kocuria rhizophila*, a soil actinomycete (Kovacs, *et al.*, 1999), also showed abundant growth and evidence of formation of biofilm-like structure after 30 days of incubation. On the other hand, the *Sphingomonas* sp. isolate showed a slow growth and only low evidence of biofilm-like structure formation. *Microbacterium* genus were shown to have a potential for bioremediation by degrading hydrocarbon (Harwati, *et al.*, 2007) and *Sphingomonas* was also shown to have potential in bioremediation (Ni'matuzahroh, *et al.*, 1999). The *Pseudomonas* isolate used here as a control soil bacteria was not isolated from AMF spores but was rather recovered from black spruce rhizosphere, an ectomycorrhizal tree species not forming association with AMF (Filion, *et al.*, 2004). *Pseudomonas* is a widely distributed bacterial genus in various environments including soil, plant rhizospheres and fungal hyphospheres (Andrade, *et al.*, 1997). In the present study, this isolate formed biofilm-like structure in association with the *Glomus* mycelium which indicates that this feature would not be specific to taxa showing specificity for the AMF mycelium, but would rather depend on the bacterial taxa and the surface of the mycelium being a favourable substrate for biofilm formation. The ability of certain *Pseudomonas* strains to form attachments with the fungal surface was reported previously (Bianciotto, *et al.*, 1996). An *E. coli* strain was used as non-soil bacterial control. It showed abundant growth on the water media but no affinity to the fungal surface or any evidence of biofilm-like structure

formation, such as observed with most of the isolates collected from *Glomus* spores. The bacterial isolates growing in close to loose association with the AMF mycelium may play important roles in association with the mycorrhizal symbiosis. For example, certain bacterial strains could improve mineral availability for AMF and the plant or could be antagonistic to certain opportunistic pathogenic organisms and improve stability of the plant-AMF association (Xavier & Germida, 2003, Rillig, *et al.*, 2005, Marulanda-Aguirre, *et al.*, 2008).

Understanding interactions between AMF and bacteria and their biodiversity will advance our knowledge on microbial ecology in soil and therefore could have the potential to sustain modern agriculture systems by the use of AMF and associated bacterial as biofertilizers or in bioremediation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the NSERC discovery grant to Marc St-Arnaud and Mohamed Hijri. We thank the Canada Foundation for Innovation (CFI) for microscopy facility support to MH. We also thank Maureen Marie-Joseph for technical assistance.

CHAPITRE 3. DISCUSSION ET CONCLUSION

GÉNÉRALE

À partir du champignon mycorhizien *Glomus irregulare*, les expériences mises de l'avant dans ce projet de recherche ont permis d'isoler, de cultiver et d'étudier certaines bactéries. Les hypothèses mises de l'avant pour lancer cette recherche ne sont toutefois que partiellement confirmées par les expériences effectuées.

Il avait été supposé que les bactéries intimement associées aux spores du champignon mycorhizien *Glomus irregulare* pourraient être isolées et pourraient pousser sur le mycélium de ce même champignon *in vitro* sans aucune autre source nutritive que les exsudats relâchés dans le milieu environnant par celui-ci et seraient isolables. En effet, il a été possible d'isoler sept taxons bactériens à partir des spores de *G. irregulare* prélevées dans un sol naturel et de les cultiver sur du milieu TSA. Toutefois, un de ces morphotypes cultivé s'est avéré être un isolat de *Bacillus cereus*. Les bactéries de type *B. cereus* sont omniprésentes dans l'environnement et cet isolat n'est donc probablement pas spécifiquement associé aux champignons mycorhiziens. Il s'agit plutôt d'une bactérie opportuniste qui colonise le sol et ce qui s'y trouve, y compris les hyphes de champignons mycorhiziens. Cette espèce n'a pas poussé sur les hyphes du champignon *in vitro*. Deux bactéries ont été utilisées

comme témoins, soit *Escherichia coli*, une bactérie de la flore intestinale des mammifères, et *Pseudomonas* sp., une bactérie largement répandue dans l'environnement notamment dans le sol, mais qui n'avait pas été détectée sur la surface des spores de *G. irregulare*. Ces dernières ont pu pousser dans les mêmes conditions expérimentales où l'apport en éléments nutritifs était réduit dans le milieu environnant au seul apport en exsudats du champignon lui-même. Pour ce qui est de *E. coli*, celle-ci a pu pousser, mais sans particulièrement s'attacher à la surface du mycélium de *G. irregulare*. Toutefois, dans le cas de *Pseudomonas* sp., celle-ci a non seulement pu pousser sur le système expérimental, mais a formé de grandes structures ressemblant à des biofilms en surface du mycélium mycorhizien. Cela suggère que d'autres bactéries que seules celles intimement associées au champignon mycorhizien sont capable de pousser en surface du mycélium en absence d'autres éléments nutritifs. Nos résultats montrent cependant que la moitié des bactéries que nous avons isolées sur les spores de *G. irregulare*, particulièrement *Bacillus simplex*, *B. megaterium*, *Kocuria rhizophila* et *Variovorax paradoxus*, ont une très bonne ou même une excellente capacité de croître en présence du mycélium, à l'instar de certaines autres espèces, notamment la souche de *Pseudomonas* sp. utilisée comme espèce témoin représentant des bactéries du sol.

De plus, il avait été supposé que les bactéries associées aux champignons mycorhiziens s'organisent en structures ressemblant à des biofilms sur le mycélium de ceux-ci. Cette hypothèse avait été formulée parce

que le mode de croissance en biofilm est le plus courant sous lequel les bactéries du sol croissent sur les racines et les particules de sol (Costerton, *et al.*, 1987). Cette hypothèse n'a pas pu être convenablement vérifiée. En effet, six des sept isolats étudiés a pu être mis en culture sur le mycélium en conditions de culture *in vitro*. Toutefois, malgré que six des sept isolats aient formé des structures ressemblant à des biofilms, nous n'avons pas vérifié la présence des polysaccharides caractéristiques des structures élaborées par les bactéries organisées en biofilm. Des problèmes de contamination par des champignons dans l'incubateur utilisé ont considérablement réduit la quantité de matériel biologique utilisable et il n'a pas été possible d'obtenir le nombre suffisant de spécimens dans des délais raisonnables pour faire le nombre de répétitions nécessaire à une étude concluante. Aussi, la technique préconisée pour l'observation de ces structures devait être la microscopie confocale. Chacun des isolats a été transformé avec succès par électroporation avec quatre plasmides codant pour quatre protéines fluorescentes (cyan, jaune, rouge et vert). Malheureusement, seulement deux des quatre fluorophores s'avéraient donner un signal suffisamment fort pour être utilisés (vert et cyan) avec le microscope confocal ce qui diminuait d'autant les combinaisons de bactéries possible à observer simultanément. Les bactéries transformées perdaient aussi rapidement leurs nouvelles capacités fluorescentes au fil du temps et des repiquages, et ce, malgré le fait que les plasmides utilisés avaient été testés précédemment pour leur stabilité dans la rhizosphère sur *Pseudomonas* sp.

(Bloemberg, *et al.*, 2000). Le champignon mycorhizien lui-même donnant un très fort signal auto-fluorescent, il a donc été impossible de faire des observations avec le microscope confocal. Les observations ont alors été faites avec un microscope en contraste interférentiel différentiel (DIC), ce qui nous enlevait la capacité d'obtenir des images tridimensionnelles. Toutefois, de très belles structures ressemblant à des biofilms ont pu être observées sur le mycélium de *G. irregulare in vitro* pour six des sept taxons bactériens étudiés (*Bacillus simplex*, *Kocuria rhizophila*; *Bacillus megaterium*; *Variovorax paradoxus*; *Microbacterium ginsengisoli* et *Sphingomonas* sp) (voir Table III et Figure 5 au chapitre 2).

La dernière hypothèse formulée voulait que la diversité microbienne intimement associée aux champignons mycorhiziens serait nettement moins grande que celle de la rhizosphère d'où celle-ci est isolée. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par les analyses de biologie moléculaires effectuées par DGGE, car de graves problèmes d'optimisation de la méthode ont empêché d'obtenir de belles images avec des bandes assez visibles pour une analyse valable. C'est pour cette raison que les bandes correspondant aux échantillons d'ADN de sol n'ont pas été montrées dans la Figure 4 au chapitre 2. Toutefois, malgré que les bandes étaient à peine visibles sur les gels, les images obtenues suggéraient un nombre de bandes correspondant aux bactéries présentes dans l'ADN total du sol de mycosphère beaucoup plus grand que celui associées aux spores du champignon mycorhizien qui était tout de même beaucoup plus

important que les sept taxons bactériens isolés (voir Figures 18 et 19 à l'annexe 2). Il est dommage que des difficultés techniques et un manque de ressources (temps, expertise, matériel biologique) ait empêché la poursuite de cette étude jusqu'au bout.

À long terme, la poursuite de cette recherche permettra de mieux comprendre l'écologie microbienne du sol et plus particulièrement le rôle des bactéries qui s'associent aux hyphes des champignons mycorhiziens. Il sera ainsi possible, par exemple, de sélectionner des souches bactériennes qui pourraient servir au biocontrôle des agents pathogènes du sol ou ayant des aptitudes pour la phytoremédiation ou la promotion de la croissance des plantes. Les connaissances acquises favoriseront aussi le développement de pratiques de gestion durable des écosystèmes, permettant en outre la diminution ou le remplacement de l'usage de pesticides et fertilisants chimiques et diminuant ainsi les perturbations de l'écologie des milieux.

RÉFÉRENCES

- Abou-Shanab RAI, van Berkum P & Angle JS (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* **68**: 360-367.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review* **59**: 143–169.
- Andrade G, Linderman RG & Bethlenfalvai GJ (1998) Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant and Soil* **202**: 79-87.
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG & Bethlenfalvai GJ (1997) Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **192**: 71-79.
- Aoi Y (2002) *In situ* identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**: 552-556.

- Artursson V, Finlay RD & Jansson JK (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* **8**: 1-10.
- Barea J-M, Pozo MJ, Azcón R & Azcón-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere *Journal of Experimental Botany* **56**: 1761-1778.
- Bécard G & Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza on Ri T-DNA transformed roots. *The New Phytologist* **108**: 211-218.
- Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, *et al.* (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 642-652.
- Beyenal H, Donovan C, Lewandowski Z & Harkin G (2004) Three-dimensional biofilm structure quantification. *Journal of Microbiological Methods* **59**: 395-413.
- Bharadwaj DP, Lundquist P-O & Alström S (2008) Arbuscular mycorrhizal fungal spore-associated bacteria affect mycorrhizal colonization, plant growth and potato pathogens. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 2494-2250.

- Bharadwaj DP, Lundquist P-O, Persson P & Alström S (2008) Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 310-322.
- Bianciotto V, Minerdi D, Perotto S & Bonfante P (1996) Cellular Interactions between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizosphere Bacteria. *Protoplasma* **193**: 123-131.
- Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, Sironi M, Tichy HV & Bonfante P (1996) An Obligately Endosymbiotic Mycorrhizal Fungus Itself Harbors Obligately Intracellular Bacteria. *Applied & Environmental Microbiology* **62**: 3005-3010.
- Bianciotto V, Lumini E, Lanfranco L, Minerdi D, Bonfante P & Perotto S (2000) Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family gigasporaceae. *Applied & Environmental Microbiology* **66**: 4503-4509.
- Bloemberg GV (2007) Microscopic analysis of plant-bacterium interactions using auto fluorescent proteins. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 301-309.

- Bloemberg GV, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Stuurman N & Lugtenberg BJJ (2000) Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: New perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1170-1176.
- Borowicz VA (2001) Do Arbuscular Mycorrhizal Fungi Alter Plant-Pathogen Relations? *Ecology* **82**: 3057-3068.
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**: 275-304.
- Burmolle M, Hansen LH & Sorensen SJ (2007) Establishment and Early Succession of a Multispecies Biofilm Composed of Soil Bacteria. *Microbial Ecology* **54**: 352–362.
- Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ & Kjelleberg S (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied & Environmental Microbiology* **72**: 3916-3923.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M & Marrie TJ (1987) Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* **41**: 435-464.

- Dar SA, Kuenen JG & Muyzer G (2005) Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied & Environmental Microbiology* **71**: 2325-2330.
- Davies J, F. T. , Potter JR & Linderman RG (1993) Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration - response in gas exchange and water relations. *Physiologia Plantarum* **87**: 45-53.
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M & Bottger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17**: 7843-7853.
- Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, *et al.* (2001) Acyl-Homoserine Lactone Production Is More Common among Plant-Associated *Pseudomonas* spp. than among Soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied & Environmental Microbiology* **67**: 1198-1209.
- Espinosa-Urgel M (2004) Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid* **52**: 139-150.

- Filion M, St-Arnaud M & Fortin JA (1999) Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist* **141**: 525-533.
- Filion M, Hamelin RC, Bernier L & St-Arnaud M (2004) Molecular Profiling of Rhizosphere Microbial Communities Associated with Healthy and Diseased Black Spruce (*Picea mariana*) Seedlings Grown in a Nursery. *Applied & Environmental Microbiology* **70**: 3541-3551.
- Fortin J-A, Plenchette C & Piché Y (2008) *Les mycorhizes - La nouvelle révolution verte*. Quæ et Multimondes, Québec, 148 p.
- Fujishige NA, Kapadia NN & Hirsch AM (2006) A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Botanical Journal of the Linnean Society* **150**: 79-88.
- Gianinazzi-Pearson V (1996) Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *Plant Cell* **8**: 1871-1883.
- Giovannetti M & Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **84**: 489-500.

- González-Chávez MdCA, Newsam R, Linderman R, Dodd J & Valdez-Carrasco JM (2008) Bacteria associated with the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus in an As/Cu polluted soil *Agrociencia* **42**: 1-10.
- Hamel C (2004) Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on N and P cycling in the root zone. *Canadian journal of soil science* **84**: 383-395.
- Harrier LA (2001) The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. *Journal of Experimental Botany* **52**: 469-478.
- Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D & Watanabe K (2007) Characterization of Diverse Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Indonesian Seawater. *Microbes and Environments* **22**: 412-415.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K & Wellington EMH (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied & Environmental Microbiology* **63**: 3233-3241.
- Hildebrandt U, Ouziad F, Marner FJ & Bothe H (2006) The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiology Letters* **254**: 258-267.

- Hooker JE, Piatti P, Cheshire MV & Watson CA (2007) Polysaccharides and monosaccharides in the hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus* E3 and *Glomus tenue*. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 680-683.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H & Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **58**: 169-188.
- Kovacs G, Burghardt J, Pradella S, Schumann P, Stackebrandt E & Marialigeti K (1999) *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 167-173.
- Kowalchuk GA, De Souza FA & Van Veen JA (2002) Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* **11**: 571-581.
- Leadbetter JR & Greenberg EP (2000) Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* **182**: 6921-6926.

- Li X, Hauer B & Rosche B (2007) Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 1255-1262.
- Lioussanne L, Perreault F, Jolicoeur M & St-Arnaud M (2010) The bacterial community of tomato rhizosphere is modified by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi but unaffected by soil enrichment with mycorrhizal root exudates or inoculation with *Phytophthora nicotianae*. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 473-483.
- Mansfeld-Giese K, Larsen J & Bodker L (2002) Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiology Ecology* **41**: 133-140.
- Marschner P & Baumann K (2003) Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. *Plant and Soil* **251**: 279.
- Marschner P & Timonen S (2005) Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology* **28**: 23-36.

- Marschner P & Timonen S (2006) Bacterial community composition and activity in rhizospheres of Roots colonised by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial Activity in the Rhizosphere*, Vol. 7 (Mukerji K, Manoharachary C & J. S, eds.), Springer Verlag, Berlin, 349 p.
- Marulanda-Aguirre A, Azcon R, Ruiz-Lozano JM & Aroca R (2008) Differential effects of a *Bacillus megaterium* strain on *Lactuca sativa* plant growth depending on the origin of the arbuscular mycorrhizal fungus coinoculated: Physiologic and biochemical traits. *Journal of Plant Growth Regulation* **27**: 10-18.
- McKillip JL (2000) Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**: 393-399.
- Muyzer G & Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 127-141.
- Muyzer G, Dewaal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Applied & Environmental Microbiology* **59**: 695-700.

- Ni'matuzahroh, Gilewicz M, Guiliano M & Bertrand JC (1999) *In-vitro* study of interaction between photooxidation and biodegradation of 2-methylphenanthrene by *Sphingomonas* sp. *Chemosphere* **38**: 2501-2507.
- Paramonova E, De Jong ED, Krom BP, Van der Mei HC, Busscher HJ & Sharma PK (2007) Low-Load Compression Testing: a Novel Way of Measuring Biofilm Thickness. *Applied & Environmental Microbiology* **73**: 7023-7028.
- Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE & Greenberg EP (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4360-4365.
- Potera C (1996) Biofilms Invade Microbiology. *Science* **273**: 1795-1797.
- Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE & Handley PS (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *TRENDS in Microbiology* **11**: 94-100.
- Rillig MC, Lutgen ER, Ramsey PW, Klironomos JN & Gannon JE (2005) Microbiota accompanying different arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation. *Pedobiologia* **49**: 251-259.

- Roesti D, Ineichen K, Braissant O, Redecker D, Wiemken A & Aragno M (2005) Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Applied & Environmental Microbiology* **71**: 6673-6679.
- Rudrappa T, Biedrzycki ML & Bais HP (2008) Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 153-166.
- Scheublin TR, Sanders IR, Keel C & Van der Meer JR (2010) Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME Journal* **4**: 752-763.
- Schmalenberger A, Hodge S, Bryant A, Hawkesford MJ, Singh BK & Kertesz MA (2008) The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. *Environmental Microbiology* **10**: 1486-1500.
- Schüler A, Schwarzott D & Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.

- Seneviratne G, Zavahir J, Bandara W & Weerasekara M (2008) Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**: 739-743.
- Sikorski J, Pukall R & Stackebrandt E (2008) Carbon source utilization patterns of *Bacillus simplex* ecotypes do not reflect their adaptation to ecologically divergent slopes in 'Evolution Canyon', Israel. *FEMS Microbiology Ecology* **66**: 38-44.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC & Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Singh BK, Munro S, Reid E, Ord B, Potts JM, Paterson E & Millard P (2006) Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science* **57**: 72-82.
- Smith SE & Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd edition, Academic Press, Amsterdam, 787 p.

- St-Arnaud M & Vujanovic V (2007) Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plant Diseases and Pests. *Mycorrhizae in Crop Production: Applying knowledge*, (Hamel C & Plenchette C, eds.), Haworth Press, Binghampton, pp. 67-122.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M & Fortin JA (1995) Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza* **5**: 413-438.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M & Fortin JA (1996) Enhanced hyphal and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological research* **100**: 328-332.
- Stockinger H, Walker C & Schüßler A (2009) *Glomus intraradices* DAOM197198, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **183**: 1176-1187.
- Sutherland IW (2001) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS in Microbiology* **9**: 222-227.
- Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3-9.

- Tawaraya K, Naito M & Wagatsuma T (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 657 - 665.
- Temmerman R, Masco L, Vanhoutte T, Huys G & Swings J (2003) Development and validation of a Nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Applied & Environmental Microbiology* **69**: 6380-6385.
- Tester M, Smith SE & Smith FA (1987) The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Canadian Journal of Botany* **65**: 419-413.
- Timmusk S, Grantcharova N, Gerhart E & Wagner H (2005) *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied & Environmental Microbiology* **71**: 7292-7300.
- Toljander JF, Santos-González JC, Tehler A & Finlay RD (2008) Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 323-338.

Toljander JF, Artursson V, Paul LR, Jansson JK & Finlay RD (2006)

Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters* **254**: 34-40.

Toljander JF, Lindahl BD, Paul LR, Elfstrand M & Finlay RD (2007) Influence

of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology* **61**: 295-304.

Vierheilig H, Schweiger P & Brundrett M (2005) An overview of methods for

the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum* **125**: 393-404.

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U & Piche Y (1998) Ink and vinegar, a

simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied & Environmental Microbiology* **64**: 5004-5007.

Vilarino A & Arines J (1990) An instrumental modification of Gerdemann and

Nicolson's method for extracting VAM fungal spores from soil samples. *Plant and Soil* **121**: 211-215.

Watnick P & Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of*

Bacteriology **182**: 2675-2679.

- Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**: 487-511.
- Wijman JGE, de Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH & Abee T (2007) Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Applied & Environmental Microbiology* **73**: 1481-1488.
- Xavier LJC & Germida JJ (2003) Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 471-478.
- Yergeau É, Vujanovic V & St-Arnaud M (2006) Changes in communities of Fusarium and arbuscular mycorrhizal fungi as related to different asparagus cultural factors. *Microbial Ecology* **52**: 104-113.

ANNEXE 1

OBSERVATION DES INTERACTIONS ENTRE BACTÉRIES ET MYCÉLIUM DE CHAMPIGNON MYCORHIZIEN À ARBUSCULES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE

Il est clairement admis que les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) jouent un rôle important dans la réduction de certains stress abiotiques auxquels sont exposés les plantes, tel la sécheresse (Davies, *et al.*, 1993) et biotiques, tel que l'infection par des bactéries, des champignons, des protistes et des nématodes phytopathogènes (Borowicz, 2001, St-Arnaud & Vujanovic, 2007). Les AMF favorisent aussi l'absorption des nutriments peu disponibles dans le sol, tel le phosphore, en raison du développement d'un réseau extensif d'hyphes extra-racinaires qui peut prospecter le sol plus efficacement que les racines (Smith & Read, 2008). La biodiversité microbienne est d'une importance fondamentale pour le maintien de l'équilibre entre les végétaux et leur environnement. De nombreuses recherches ont montré qu'il existe aussi des associations entre les bactéries du sol et les champignons mycorhiziens associés aux racines des plantes (Bianciotto, *et al.*, 1996, Andrade, *et al.*, 1997, Andrade, *et al.*, 1998, Fillion, *et al.*, 1999, Whipps, 2001, Barea, *et al.*, 2005,

Marschner & Timonen, 2005, Hildebrandt, *et al.*, 2006, Marschner & Timonen, 2006, Toljander, *et al.*, 2006, Toljander, *et al.*, 2007, Toljander, *et al.*, 2008).

La plupart des bactéries du sol vont s'organiser en biofilm sur les racines et les particules du sol (Costerton, *et al.*, 1987). Les bactéries s'organisant en biofilm en adhérant à un leur support solide ont une capacité accrue de s'adapter et de résister aux conditions environnementales (Espinosa-Urgel, 2004). Nous avons donc supposé que ce serait le cas sur les hyphes des champignons mycorhiziens à arbuscules qui s'associent aux racines des plantes. Ces biofilms bactériens autour des hyphes des champignons mycorhiziens pourraient contribuer à la meilleure aptitude qu'ont certaines plantes à faire face aux agents pathogènes dans le sol lorsqu'elles sont en symbiose mycorhizienne (Whipps, 2001, Timmusk, *et al.*, 2005). Relativement peu d'études sont faites sur les biofilms bactériens sur des supports biotiques, comme ici sur les hyphes de *G. irregulare*. Certaines études de ce genre ont toutefois été faites à sur des racines de plantes (Timmusk, *et al.*, 2005, Fujishige, *et al.*, 2006, Rudrappa, *et al.*, 2008). Des recherches plus récentes se sont intéressées à la formation des biofilms bactériens associés à la surfaces de structures de champignons du sol ainsi qu'à leurs applications technologiques éventuelles (González-Chávez, *et al.*, 2008, Seneviratne, *et al.*, 2008). La plupart des recherches sur les biofilms ont été faites avec des bactéries de collections de cultures (Timmusk, *et al.*, 2005, Li, *et al.*, 2007, Paramonova, *et al.*, 2007, Wijman, *et al.*, 2007), mais d'autres ont été faites avec des bactéries isolées directement d'échantillons

environnementaux (Burmolle, *et al.*, 2006, Burmolle, *et al.*, 2007), comme c'est le cas avec notre étude.

Puisque la notion de symbiose dans les sols est beaucoup plus complexe qu'on le croyait jusqu'alors, que ces associations symbiotiques complexes semblent très importantes dans l'écologie des sols et sont encore mal comprises (Barea, *et al.*, 2005), il nous semblait important d'étudier ce phénomène. De très nombreuses techniques microscopiques sont utilisées pour étudier la formation des biofilms et des associations bactériennes sur des surfaces solides. La microscopie optique (confocale) et électronique ont été utilisées avec succès à cette fin (Bianciotto, *et al.*, 1996, Bloemberg, *et al.*, 2000, Vierheilig, *et al.*, 2005, Bloemberg, 2007, González-Chávez, *et al.*, 2008). Dans notre cas, il semblait intéressant d'utiliser la microscopie confocale, car celle-ci nous permettrait d'observer jusqu'à quatre espèces bactériennes différentes simultanément dans le temps et l'espace. Ceci donnerait un portrait plus juste des interactions microbiennes réelles ayant lieu sur les hyphes des champignons mycorhiziens à arbuscules dans le sol.

Matériel et méthode

Transformation des bactéries avec des gènes codant pour des protéines fluorescentes

Afin d'obtenir des cellules compétentes pour la transformation, sept isolats bactériens obtenus des spores du *Glomus irregulare*, ainsi que le *E. coli* et le *Pseudomonas* sp. (utilisés comme témoins) ont été cultivées et lavées pour enlever toutes les molécules qui pourraient interférer avec l'électroporation. Les bactéries ont été cultivées dans 50 ml de milieu 1/10 TSB à 25°C avec 250 rpm d'agitation dans des erlenmeyers de 250 ml pour 12 à 24h selon les souches. Les cultures utilisées avaient atteint une DO_{600} situées entre 0,5 et 0,9, ce qui constitue la phase de croissance exponentielle de la plupart des espèces. Ces cultures ont ensuite été refroidies sur glace et ont subi cinq lavages avec du glycérol 10% stérile glacial. Les centrifugations pour décanter les cellules ont été faites à 5000g durant 12 minutes à 4°C. Les culots obtenus au dernier lavage ont été resuspendus dans 500 μ l à 1 ml de glycérol 10% stérile et froid. La DO_{600} d'une dilution 1% de cette solution devait atteindre une valeur située entre 0,25 et 3 pour être suffisamment concentrée afin de subir l'électroporation subséquente.

Chaque réaction a été effectuée en duplicata. Les cellules étaient toujours gardées sur glace et tout le matériel d'électroporation a aussi été préalablement refroidi sur glace. Les manipulations ont été effectuées dans la hotte stérile. Dans les tubes refroidis, 50 μ l de chaque culture de cellules compétentes froides ont été mélangés avec 5 μ l (environ 200 ng; concentration de 40 ng/ μ l vérifiée sur gel d'électrophorèse) d'ADN plasmidique (Figure 6) et conservés sur glace. Stérilement, chaque goutte de culture avec les plasmides a été prélevée et mise délicatement entre les électrodes de chaque cuvette. Les cuvettes (0,2 cm Cell porator Life Tech) ont ensuite été installées dans la cellule de la machine à électroporation (Cell porator Life Tech). Le choc a été fait entre 2 à 2,5 kV avec une capacité électrique de 330 μ F. Immédiatement après l'électroporation, les cultures ont été transférées stérilement dans 950 μ l de bouillon 10% TSB pré-réchauffé à T°pièce et mises à incuber à 25°C avec agitation à 150 rpm pour 2 heures. Ceci permet la récupération des cellules après le choc. Différents volumes de ces cultures transformées ont ensuite été étalés sur gélose 10% TSA sélectif (50 μ g/ ml de Tétracycline) pour obtenir des colonies isolées après 2 à 4 jours d'incubation à 25°C. Les colonies isolées ont ensuite été sélectionnées et repiquées sur gélose 10% TSA sélectif et remises à l'incubation. Après 48 heures de culture, la présence de fluorescence a été vérifiée au microscope confocal. Les cultures positives (bon signal fluorescent) ont alors été sélectionnées et cultivées à plus grande échelle pour être ensuite être utilisées pour l'étude sur l'interaction avec les hyphes de *G. irregulare in*

vitro. Chacune des bactéries transformée avec les quatre plasmides a été conservée à -80°C dans une solution de 30% de glycérol faite avec du TSB 10%.

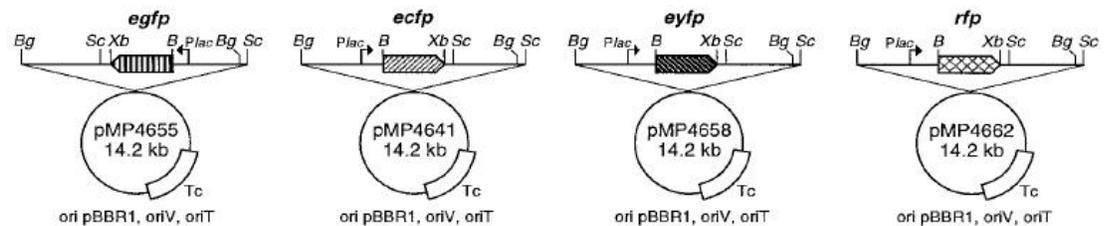


Figure 6. Plasmides utilisés pour les transformations des bactéries par électroporation. Le gène de résistance présent est celui contre la tétracycline (Tc). *Egfp*, *ecfp*, *eyfp* *eyfp* et *rfp* correspondent respectivement aux gènes des protéines fluorescentes «enhance green», «enhance cyan», «enhance yellow» et «DSred» (Bloemberg, *et al.*, 2000).

Mise en interaction des bactéries transformées avec le mycélium de *Glomus irregulare*

Le système expérimental de Pétri compartimenté précédemment développé (voir chapitre 2, pp. 24 et 27) a été utilisé (Figure 7). Une colonie de chacune des neuf taxons bactériens (sept isolés sur *GI* et les témoins *E. coli* et *Pseudomonas* sp.) préalablement transformées avec chacun des quatre plasmides ont été prélevées stérilement puis diluées dans 1 ml d'eau saline stérile (0,9% NaCl). Un volume de 150 et de 300 μ l de chacune de ces solutions de bactéries a été déposé directement sur le mycélium (observation au binoculaire) qui croissait sur la surface de la lame de microscope posée en surface du compartiment ne contenant que du mycélium sans racines (voir Figure 7). Les bactéries croissant dans ce système n'avaient comme seul nutriments disponibles pour leur croissance (gélose eau) que les exudats libérés par le mycélium. Quatre Pétris de chaque bactérie ont été ainsi inoculés et mis à incuber à 25°C pour 1 à 4 semaines dans la noirceur.

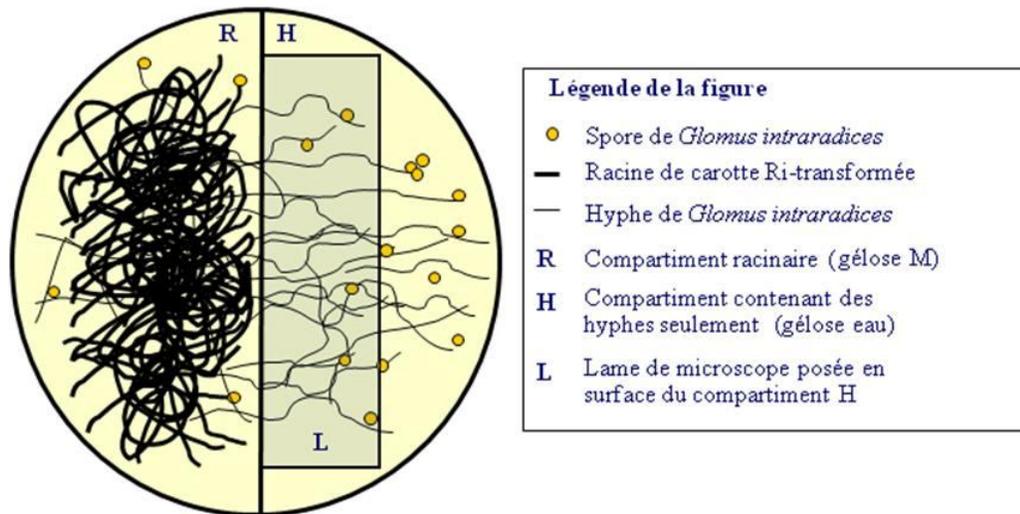


Figure 7. Schéma du système expérimental utilisé pour la croissance des bactéries transformées avec les protéines fluorescentes sur les hyphes du champignon mycorhizien *G. irregulare* (*intraradices*).

Observation des bactéries transformées au microscope confocal

Pour vérifier si leur transformation par électroporation a été efficace, les bactéries transformées ont été étalées sur une lame de microscope dans une goutte de glycérol pour être observées au microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM Meta 510). Les plasmides utilisés ont été fournis gracieusement par le Dr. Guido V. Bloemberg. Ces plasmides ont été choisis, car ils devaient être stables dans la rhizosphère (Bloemberg, *et al.*, 2000). Chacune des bactéries

isolées a été transformée par électroporation avec les plasmides portant les gènes des quatre couleurs de fluorescence (Ecfp, Egfp, Eyfp, rfp). Les observations ont été faites avec l'objectif 100X (NA 1.4 avec huile à immersion).

Pour le fluorophore cyan (Ecfp), le laser diode (405 nm) à 25% de puissance, le filtre HFT 405 nm pour l'excitation et le filtre LP 475 nm pour l'émission ont été utilisés. Pour le fluorophore vert (Egfp), le laser Argon/2 (488 nm) à 25% de puissance, le filtre HFT 488 nm pour l'excitation et le filtre LP 505 nm pour l'émission ont été utilisés. Pour le fluorophore jaune (Eyfp), le laser Argon/2 (514 nm) à 25% de puissance, le filtre HFT 514 nm puis NFT 515 nm pour l'excitation et le filtre LP 530 pour l'émission ont été utilisés. Pour le fluorophore rouge (rfp), le laser DPSS (561 nm) à 25% de puissance, les filtres HFT 561 nm puis NFT 565 nm pour l'excitation et le filtre LP 575 nm pour l'émission ont été utilisés.

Les mêmes paramètres de configuration du microscope confocal ont été utilisés pour l'observation des bactéries en interaction avec le mycélium de *G. irregulare* sur le système expérimental. Chacune des bactéries individuellement, ainsi que chacune des combinaisons de deux espèces possibles (protéines fluorescentes verte et cyan) ont alors été inoculées directement sur le mycélium sur le système expérimental. Une incubation à la noirceur à 25°C était ensuite faite pour une durée de une à 4 semaine afin de

lasser le temps aux bactéries de croître. La lame de microscope était ensuite prélevée du système et observée au microscope confocal.

Résultats

Toutes les bactéries ont été transformées avec succès avec chacun de 4 plasmides utilisés (Figure 8). Malheureusement, seuls les fluorophores cyan et vert ont donné un signal de fluorescence suffisamment fort pour être utilisable. Les filtres disponibles sur notre microscope confocal n'étaient pas exactement de la bonne longueur d'onde nécessaire à chacun des fluorophores utilisés.

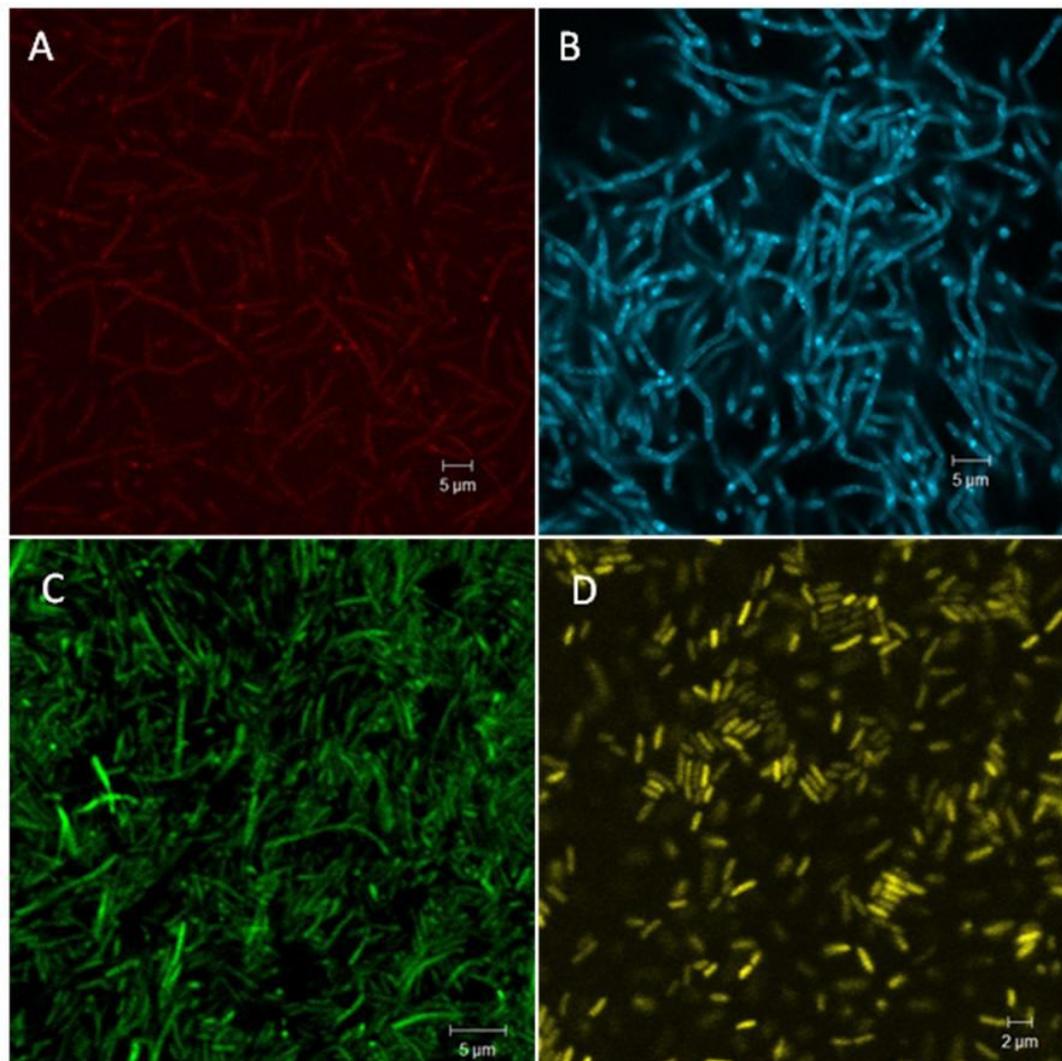


Figure 8. A. Bactéries *B. cereus* exprimant la protéine «DsRed»; B et C. Bactéries *Sphingomonas* sp. exprimant les protéines «enhance cyan» et «enhance green» respectivement; D. Bactéries *Pseudomonas* sp. exprimant la protéine «enhance yellow». Photographies au microscope confocal à l'objectif 100x. La barre correspond à 5 μm pour A, B et C et à 2 μm pour D.

Après incubation des bactéries sur le mycélium de *G. irregulare*, d'intéressantes structures bactériennes étaient visibles en microscopie confocale avec fluorescence pour toutes les bactéries sauf *Bacillus cereus* (Figures 9 à 15). Toutefois, le signal fluorescent était très faible ou carrément inexistant. Un autre problème était celui de la forte autofluorescence produite par le champignon lui-même. Ce phénomène masquait, parfois complètement, la fluorescence exprimée par les bactéries à proximité des hyphes puisque celle-ci exprimaient un signal fluorescent beaucoup plus faible. De plus, lorsque les bactéries exprimaient un signal fluorescent, celui-ci s'estompait rapidement, probablement par «photobleaching» ou encore parce que la chaleur du laser tuait les bactéries sur l'échantillon. Des tests supplémentaires ont montré que les bactéries transformées perdaient leurs capacités fluorescentes au fil du temps et des repiquages malgré la présence du facteur de sélection (tétracycline) dans le milieu de croissance. Il était donc impossible d'obtenir des photos utilisables avec le microscope confocal. Pour le manuscrit que nous espérons publier (chapitre 2), il a été décidé d'utiliser plutôt la microscopie champs clair en contraste interférentiel différentiel (DIC) pour photographier les structures bactériennes croissant et s'attachant sur les hyphes fongiques. Toutefois, cette méthode ne permettait d'observer qu'un seul isolat bactérien à la fois. Il n'était plus possible d'observer l'interaction entre plusieurs espèces ou isolats dans le temps et l'espace, tel que nous l'aurions voulu au départ.

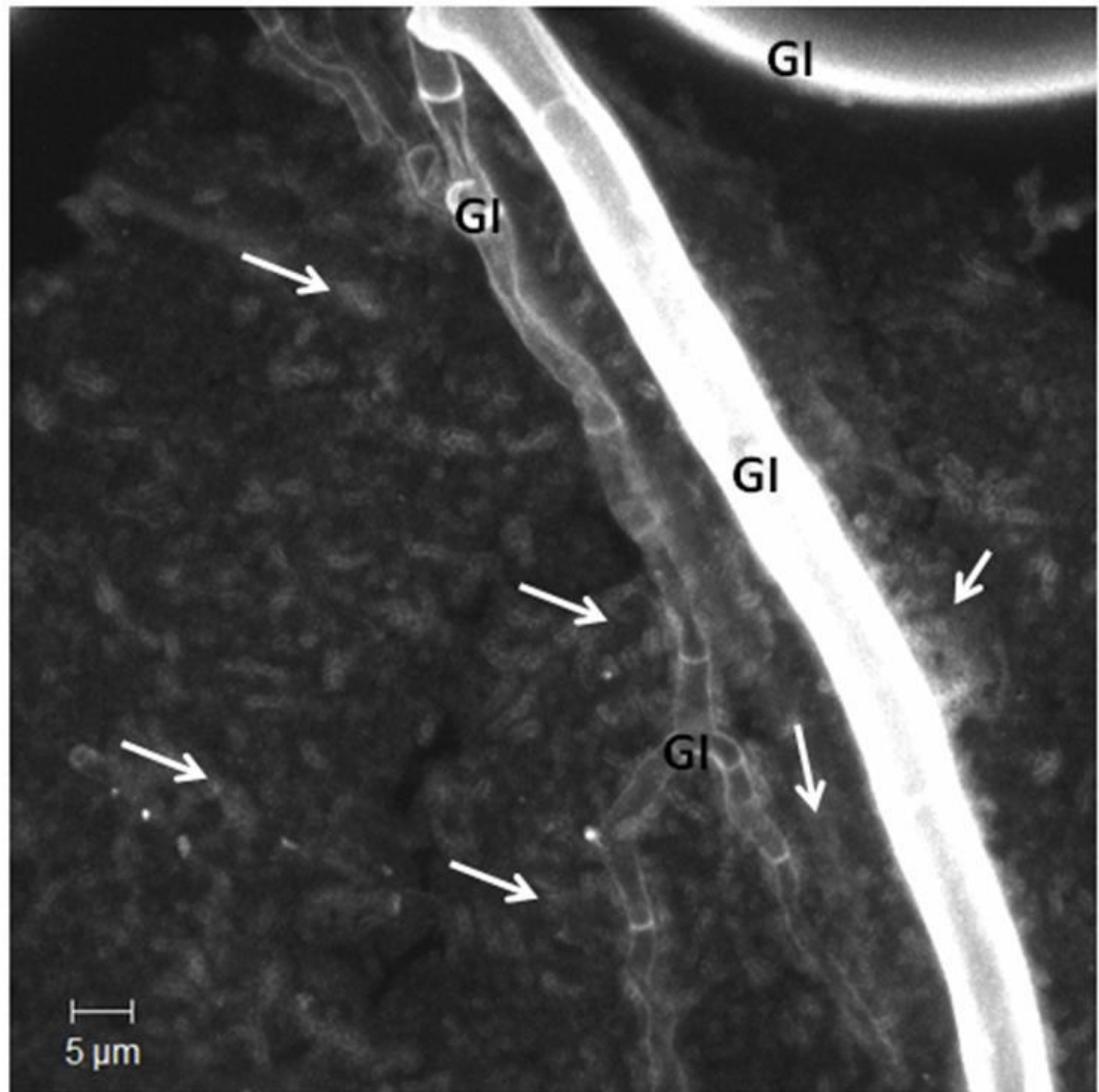


Figure 9. Photographie de *B. simplex* (flèches) poussant sur *Glomus irregulare* (GI). Image prise au microscope confocal à l'objectif 100X. La barre correspond à 5 μm.

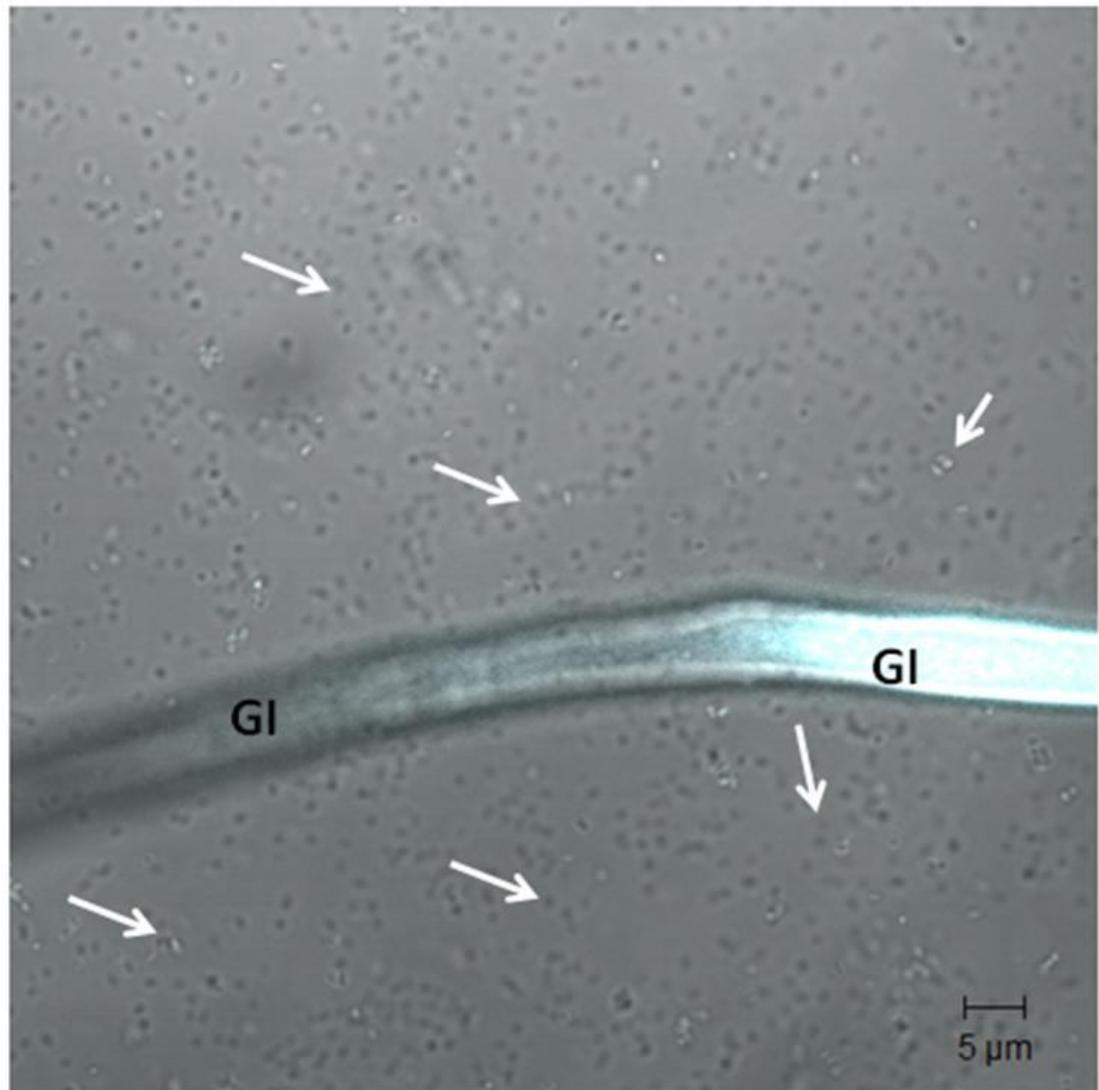


Figure 10. Photographie de *B. megaterium* (flèches) poussant sur *Glomus irregulare* (GI). Image superposant le champ clair et la fluorescence prise au microscope confocal à l'objectif 100X. La barre correspond à 5 μm.

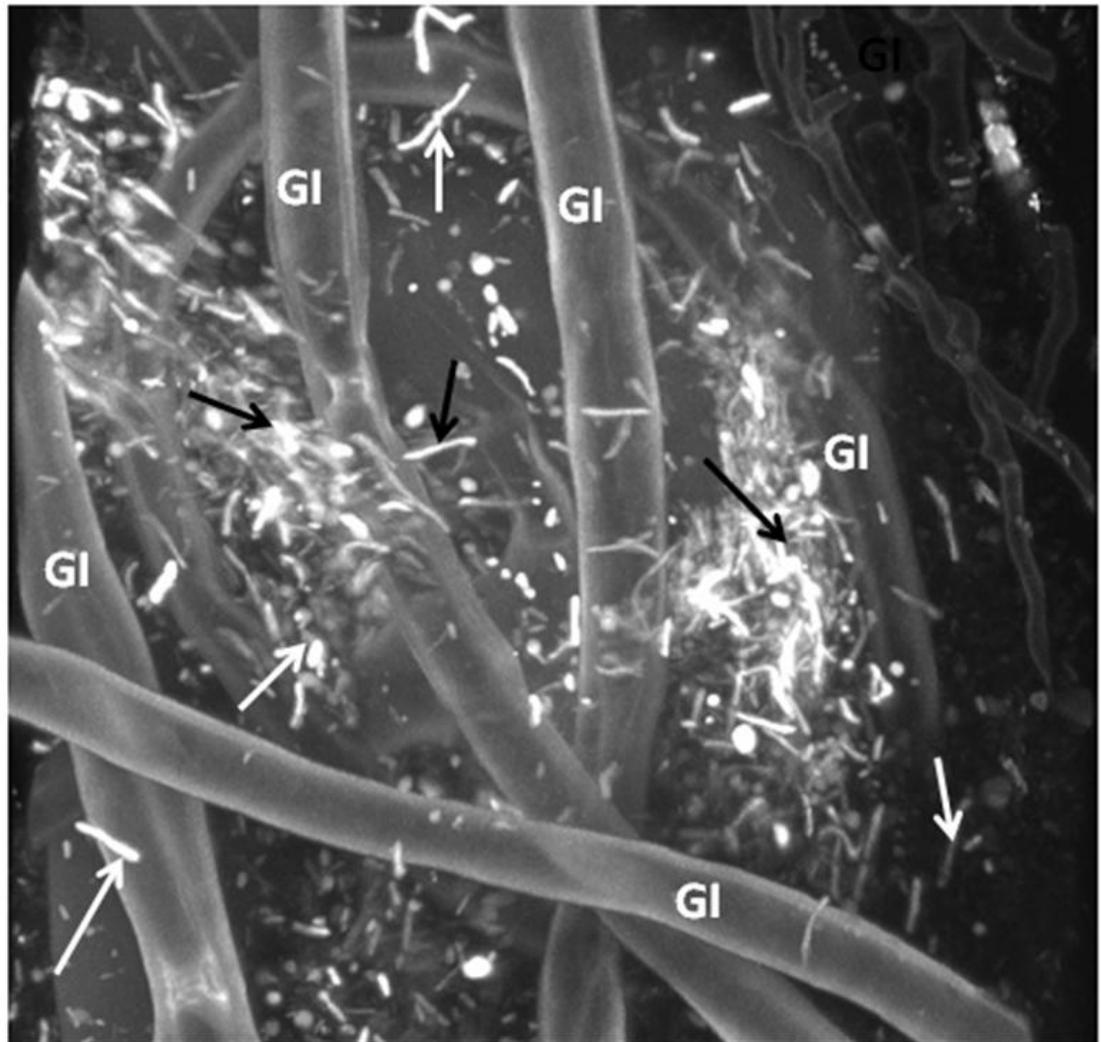


Figure 11. Photographie de *Sphingomonas* sp. (flèches) poussant sur *G. irregulare* (GI). Superposition d'images prises à 0,1 μm de distance dans l'axe Z. Images prises au microscope confocal à l'objectif 100X. La barre correspond à 5 μm .

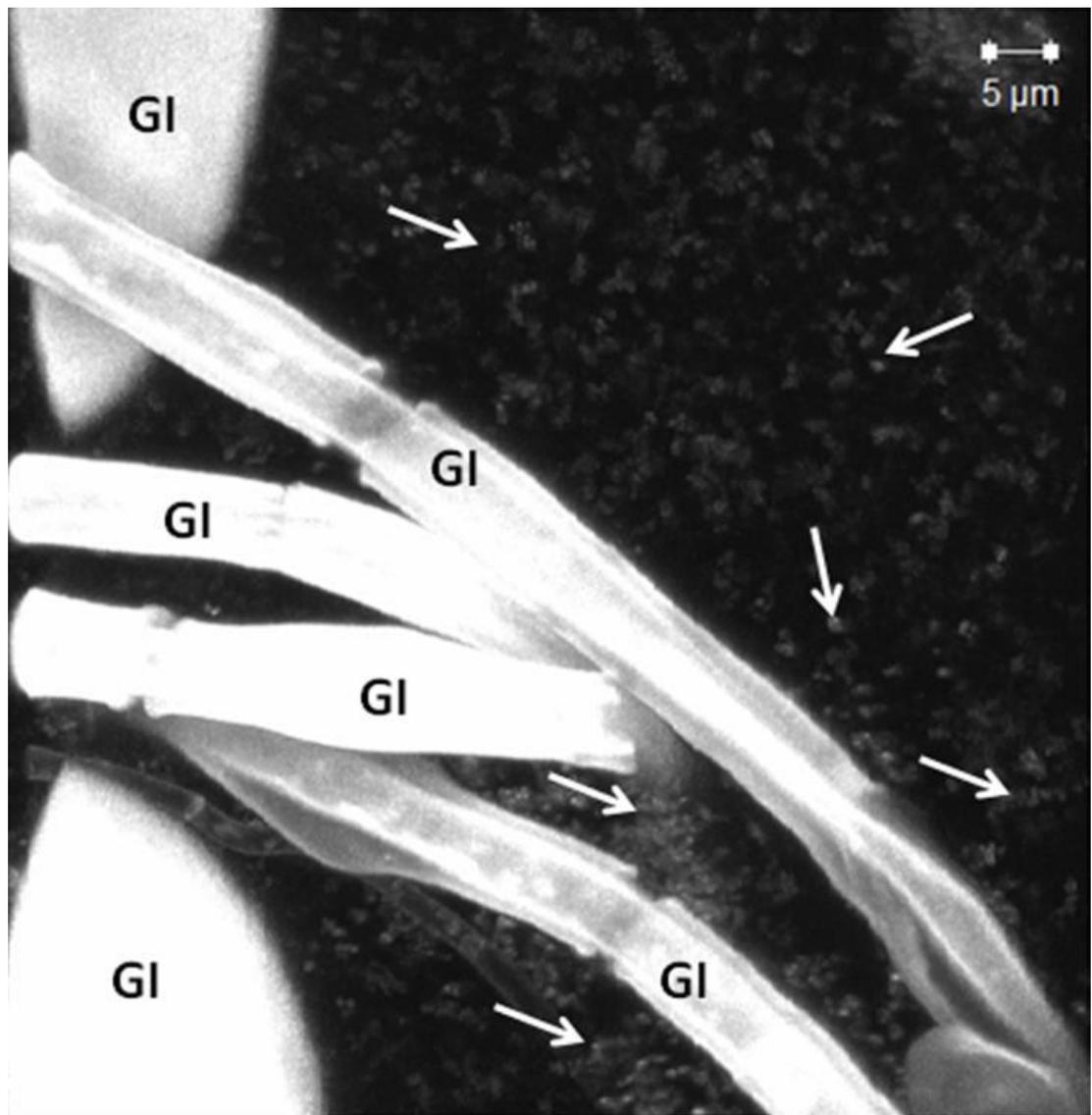


Figure 12. Photographie de *Microbacterium ginsengiosoli* (flèches) poussant sur *G. irregulare* (GI). Image prise au microscope confocal à l'objectif 100X.

La barre correspond à 5 μm.

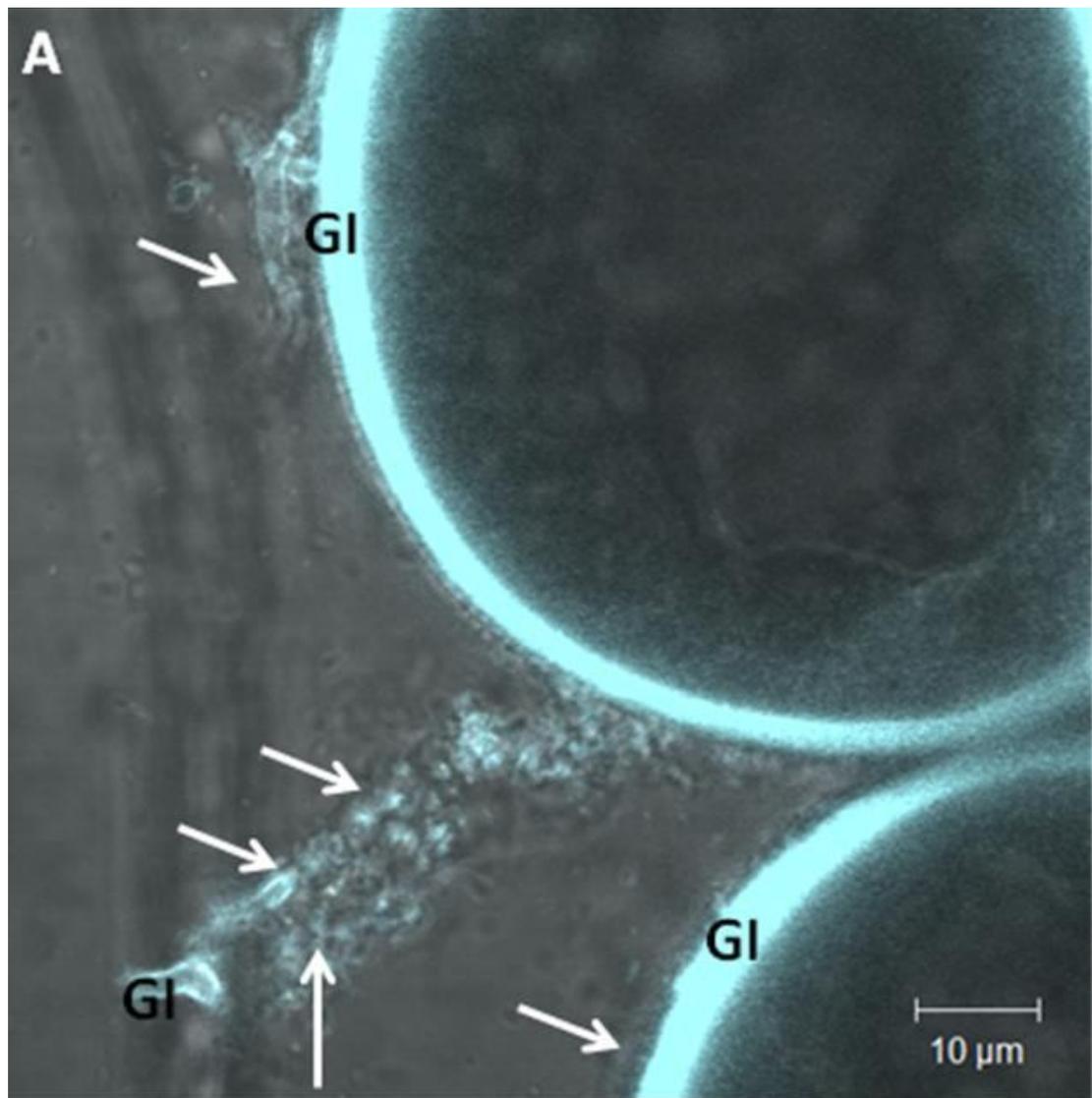


Figure 13.A Photographie de *Variovorax paradoxus* (flèches) poussant sur *G. irregulare* (GI). Image prise au microscope confocal à l'objectif 100X. La barre correspond à 10 µm.

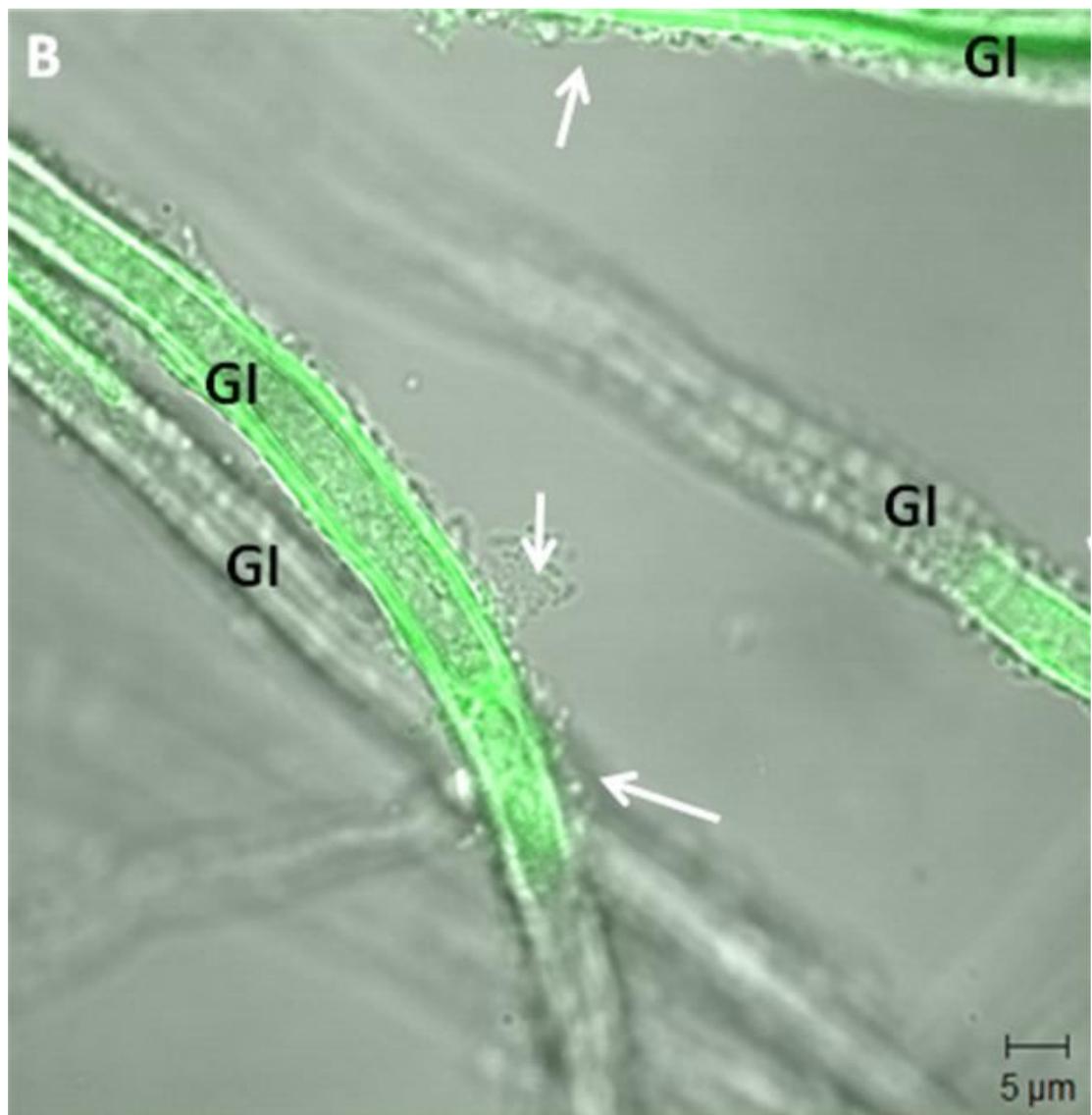


Figure 13.B Photographie de *Variovorax paradoxus* (flèches) poussant sur *G. irregulare* (GI). Image superposant le champ clair et la fluorescence prise au microscope confocal à l'objectif 100X. La barre correspond à 5 μm.

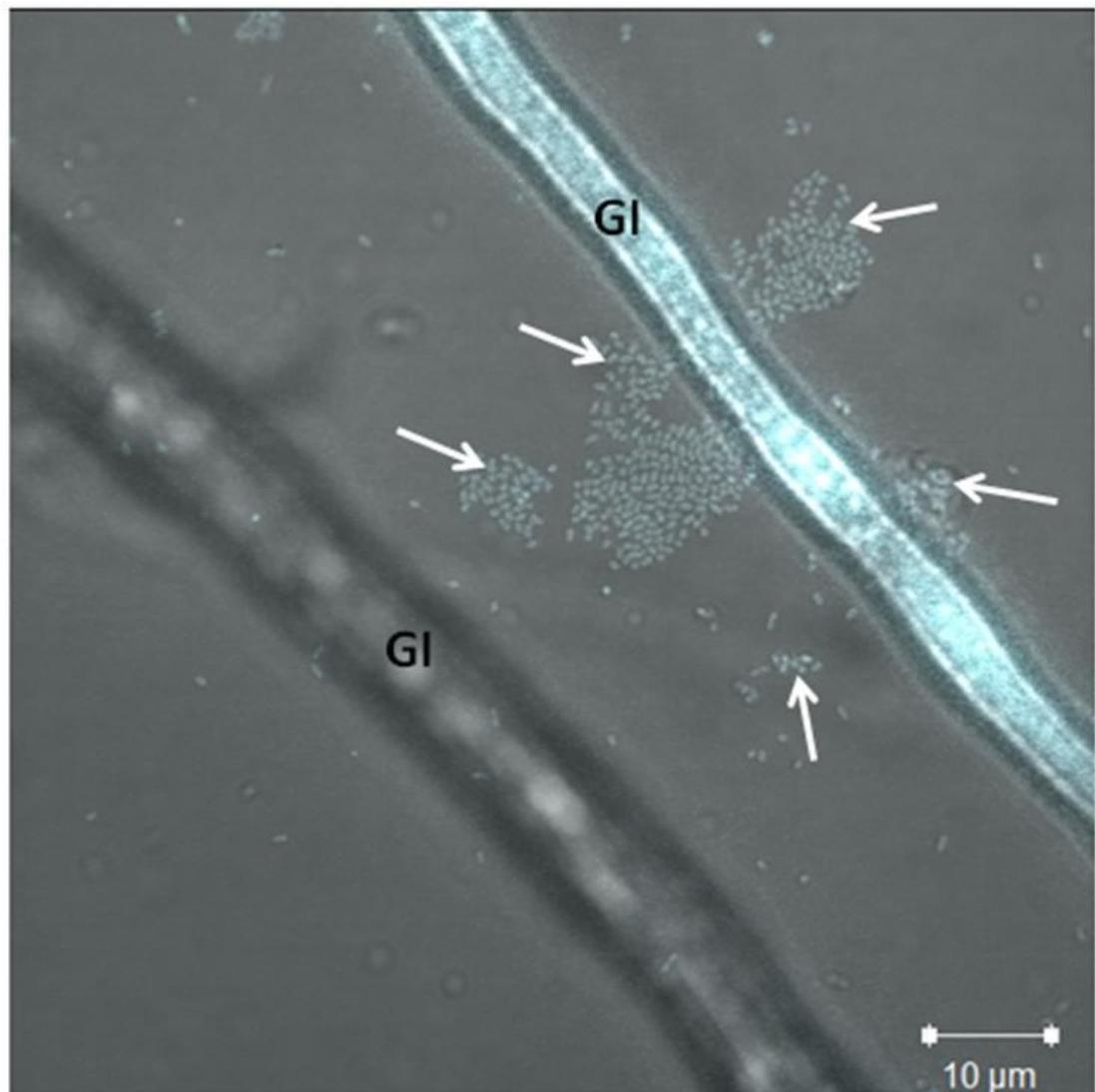


Figure 14. Photographie de *Kocuria rhizophila* (flèches) poussant sur *G. irregulare* (GI). Image prise au microscope confocal à l'objectif 100X. La barre correspond à 10 μm.

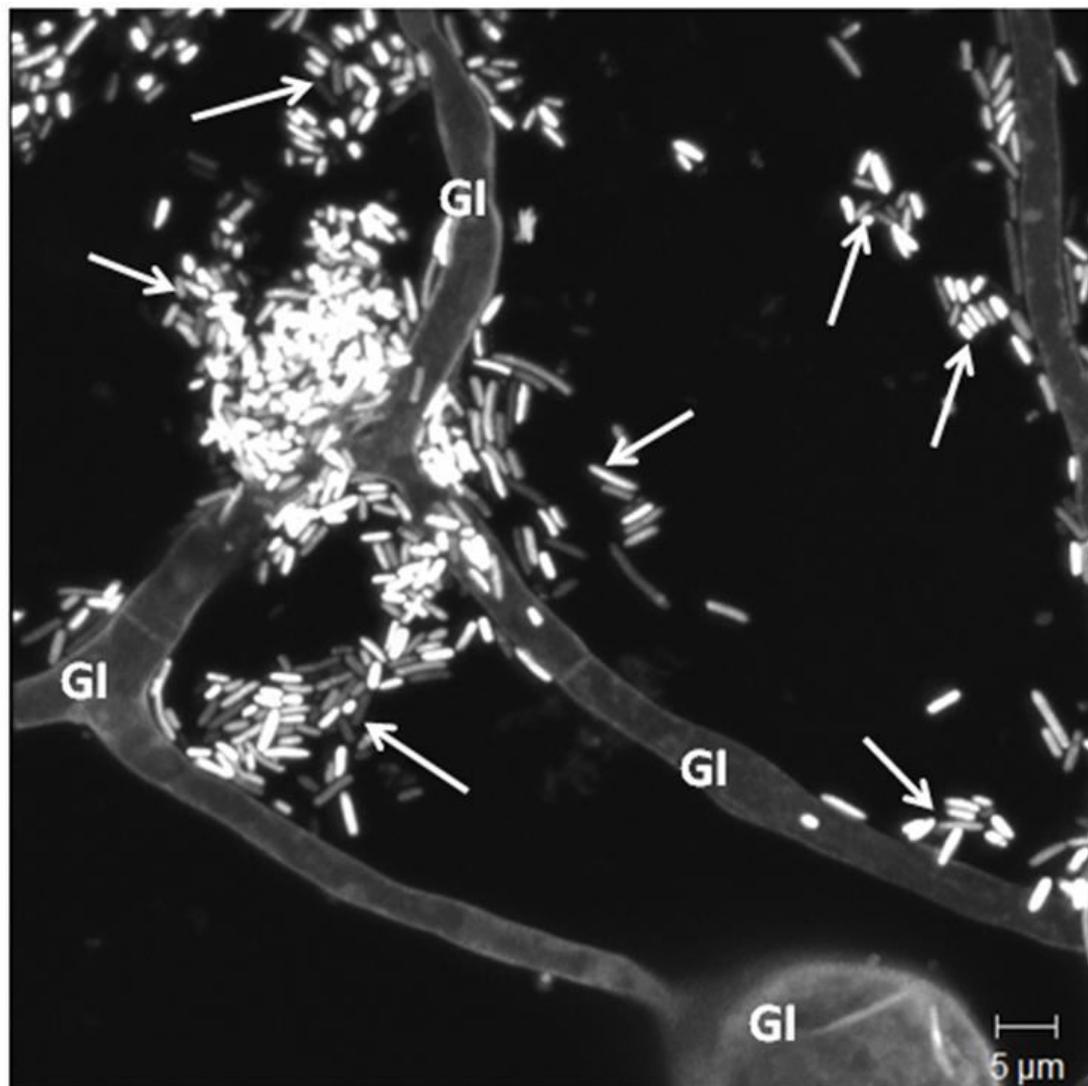


Figure 15. Photographie d'*E. coli* (flèches) exprimant la protéine fluorescente verte poussant sur *G. irregulare* (GI). Image prise au microscope confocal à l'objectif 100X. La barre correspond à 5 μm.

Discussion

Comme les expériences préliminaires ont montré qu'il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir des images claires et constantes en microscopie confocale, les images de l'expérience ont plutôt été faites par microscopie visible en contraste interférentiel différentiel (voir chapitre 2). Auparavant, la concentration de chaque culture bactérienne a été standardisée à 10^6 UFC/ml et des quantités fixes de 150 μ l et 300 μ l de chacune de ces cultures ont été inoculées sur les hyphes afin de pouvoir comparer la croissance et l'attachement de chacun des isolats.

Il est donc très difficile de comparer la croissance des différentes espèces photographiées par microscopie confocale puisque la concentration bactérienne inoculée sur les hyphes du système expérimental n'a pas été standardisée préalablement. Les espèces qui semblaient avoir une meilleure croissance et une meilleure capacité de s'attacher aux hyphes étaient peut-être les échantillons qui avaient eu une charge d'inoculum qui étaient au départ plus importante. Par exemple, *E. coli* (Figure 15), qui était la bactérie témoin ne provenant pas du sol, a montré une excellente croissance, un certain attachement sur les hyphes et surtout un bon signal fluorescent si on compare avec les autres isolats testés. Toutefois, cette espèce bactérienne n'a pas été transformée par électroporation comme les autres; il s'agissait plutôt des

bactéries contenant les différents plasmides qui nous avaient été envoyées gracieusement par le laboratoire du Dr Guido V. Bloemberg. De plus, cette bactérie montrait une croissance très importante dans le milieu de croissance utilisé (10% TSA). L'inoculum de départ déposé directement sur les hyphes était probablement beaucoup plus important que pour les autres isolats.

De plus, les plasmides utilisés étaient optimisés pour des bactéries gram négatif (Bloemberg, *et al.*, 2000). Cinq des sept isolats utilisés (*Microbacterium ginsengiosoli*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. simplex* et *Kocuria rhizophila*) étaient plutôt des bactéries gram positif. Cela peut peut-être contribuer à expliquer la difficulté à obtenir des plasmides stables dans ces isolats. De ce fait, une des bactéries gram négatif utilisées (*Sphingomonas* sp.) semblait effectivement montrer un signal fluorescent plus fort (Figure 11) que les autres isolats. Toutefois, ce n'était pas le cas de *Variovorax paradoxus* (Figure 13) qui est aussi gram négative. Il faut toutefois prendre en considération que les isolats utilisés sont des bactéries sauvages prélevées dans un échantillon environnemental. Le comportement de celles-ci est inconnu. Elles contiennent peut-être des mécanismes de défense pour contrer les gènes qui leur sont inutiles. Il reste beaucoup à découvrir sur les bactéries du sol qui s'associent aux champignons mycorhiziens.

Les objectifs de cette recherche étaient très intéressants pour la compréhension des phénomènes complexes associés aux symbioses prévalant

dans le sol entre les racines des plantes, les champignons mycorhiziens à arbuscule et les bactéries. Il est regrettable que des difficultés techniques aient empêché l'atteinte des objectifs d'observation de la croissance et de l'attachement en structures de genre «biofilm» de plusieurs bactéries associées au champignon mycorhizien, et ce de façon simultanée dans le temps et l'espace comme nous l'aurait permis l'utilisation du microscope confocal. Pour arriver à atteindre cet objectif, il faudrait travailler à la stabilité des gènes codant pour les fluorophores dans les bactéries sauvages. Peut-être que l'utilisation de plasmides différents auraient permis les observations souhaitées? Il reste encore tellement à découvrir sur les interactions complexes prévalant dans le sol entre les microorganismes et les plantes. Beaucoup d'efforts devront être mis dans ce sens afin d'arriver un jour à des pratiques durables dans les milieux agricoles, forestiers et même pour les terrains résidentiels et municipaux.

ANNEXE 2

ANALYSE DE LA BIODIVERSITÉ

La recherche effectuée n'aurait pas été complète si nous ne nous étions pas employés à vérifier la correspondance entre la diversité bactérienne totale associée aux spores et les taxons isolés sur les spores du champignon mycorhizien *Glomus irregulare* prélevées en sol naturel, ainsi que la biodiversité microbienne totale du sol étudié. Pour ce faire, les méthodes de biologie moléculaire étaient toutes indiquées. Une séparation par DGGE des produits obtenus par PCR nichée a permis l'estimation et la comparaison des communautés bactériennes totales présentes (Muyzer & Smalla, 1998, Temmerman, *et al.*, 2003, Dar, *et al.*, 2005) dans les différentes niches écologiques. L'ADN total a donc été extrait respectivement des échantillons de sol, des spores de *G. irregulare*, ainsi que des différents isolats bactériens qui ont pu être isolés et cultivés *in vitro*.

Matériel et méthode

Biodiversité et identification des bactéries

L'ADN total du sol a été extrait à partir de 1g de chacun des échantillons prélevés sur le terrain, ainsi que d'un échantillon composite de ceux-ci. Le «UltraClean™ Soil DNA Kit» de la compagnie MoBio Laboratories Inc. a été utilisé à cette fin. Pour analyser les bactéries associées aux spores de *G. irregulare*, chaque réaction PCR a été effectuée avec une seule spore préalablement nettoyée et rincée à l'eau stérile cinq fois, puis mise directement dans la solution de réaction PCR. Pour les isolats bactériens, un microlitre d'une dilution à 1:20 d'une suspension de culture âgée de 12 h (overnight) a été utilisé comme source d'ADN pour la réaction PCR.

La première réaction PCR a été effectuée avec les amorces pA et pH (Edwards, *et al.*, 1989) pour amplifier le gène ARNr 16s complet d'une taille d'environ 1500 pb. Ensuite, une seconde PCR a été effectuée, sur 1 µL du produit de la première amplification (pur, dilué 50 fois ou 100 fois), avec les amorces 341F+GC et 534R (Muyzer, *et al.*, 1993). Cela a permis d'amplifier la région variable V3 qui est d'une longueur d'environ 200 pb. Les PCR ont été effectuées dans un volume de 50 µl contenant du tampon PCR avec 1,5 mM

MgCl₂, 0,2 mM de dNTP2, 0,5 M de chaque amorce pA et pH, 0,6 L de DMSO et 1,25 U de *Taq* polymerase (Qiagen TAQ PCR Core Kit). Les PCR ont été faits sur un thermocycleur Mastercycler ep S gradient (Eppendorf, Canada) avec les conditions suivantes: 5 minutes à 94°C, suivi de 29 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C et 1 minute à 72°C et se terminant avec 7 minutes à 72°C. La bactérie *E. coli* et de l'eau stérile ont été utilisés respectivement comme contrôle positif et négatif dans les réactions PCR.

Les bactéries isolées sur les spores de *Glomus irregulare* qu'il a été possible de cultiver *in vitro* par des méthodes de cultures traditionnelles en milieu 10% TSA ont été identifiées en comparant la séquence du 16S avec celles de la base de données de nucléotides de NCBI à l'aide du programme Blastn. Les comparaisons ont été effectuées sur les séquences du gène d'ARNr 16S complètes (amplifiées avec les amorces pA et pH), obtenues du séquençage effectué au Centre d'Innovation de Génome Québec (Montréal, Canada). Ces séquences ont été déposées dans la base de données EMBL sous les numéros d'accèsion FN668006 à FN668012.

Pour la séparation des bandes d'ADN par DGGE, le protocole décrit par Étienne Yergeau, *et al.* (2006) qui est en fait une modification de Heuer, *et al.* (1997) avec un gradient dénaturant de 45 à 65% a été utilisé avec le système DCode Universal Mutation Detection System (BioRad) pendant 18 heures à 60

volts. La coloration du gel a été effectuée à l'aide de 4 µl de Sybergold pendant 10 minutes et les bandes ont été observées avec une lampe UV.

Résultats

La première PCR a permis d'effectuer l'amplification d'une séquence d'environ 1500 pb (gène de l'ARNr 16s complet) pour chacun des échantillons (Figure 16). Ceux-ci étaient l'ADN bactérien total extrait du sol naturel, l'ADN bactérien extrait des spores de *Glomus irregulare* prélevées dans le même sol, ainsi que de l'ADN extrait des isolats bactériens cultivés *in vitro* à partir de la surface des spores de *G. irregulare* prélevées des mêmes échantillons de sol. La seconde PCR (Figure 17) a permis d'effectuer l'amplification d'une séquence d'environ 200 pb (région V3 de l'ARNr 16s) à partir de tous les produits PCR précédemment amplifiés incluant les contrôles. Des échantillons témoins supplémentaires ont été ajoutés pour les témoins positif (*E. coli* et ADN bactérien total de sol) et négatif (eau stérile).

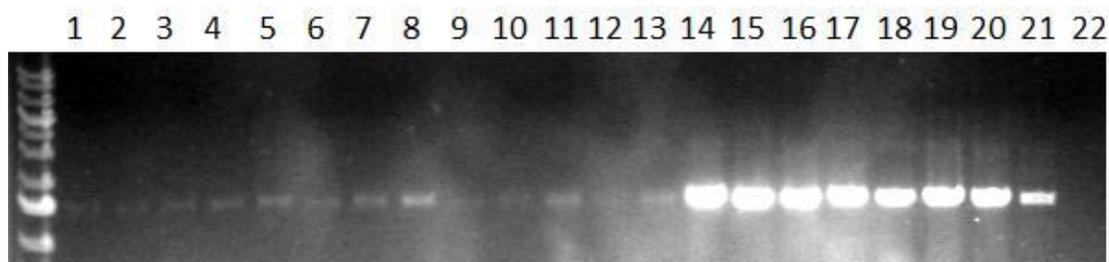


Figure 16. Photographie d'un gel d'électrophorèse des produits de PCR du gène de l'ARNr 16S montrant une bande d'environ 1500 pb. Les puits 1 à 9 correspondent à l'ADN bactérien total du sol. Les puits 10 à 13 correspondent à l'ADN bactérien présent sur une spore unique nettoyée de *Glomus irregulare* prélevée dans l'échantillon de sol naturel et mise dans le tampon PCR. Les puits 14 à 20 correspondent au gène de l'ARNr des bactéries isolées en surface des spores de *G. irregulare* qu'il a été possible de cultiver *in vitro* (14- *Variovorax paradoxus*, 15- *Sphingomonas* sp., 16- *Microbacterium ginsengiosoli*, 17- *Bacillus megaterium*, 18- *B. cereus*, 19- *B. simplex* et 20- *Kocuria rhizophila*). Le puit 21 correspond au contrôle bactérien positif *E. coli* et le puit 22 correspond au contrôle négatif, soit de l'eau stérile.

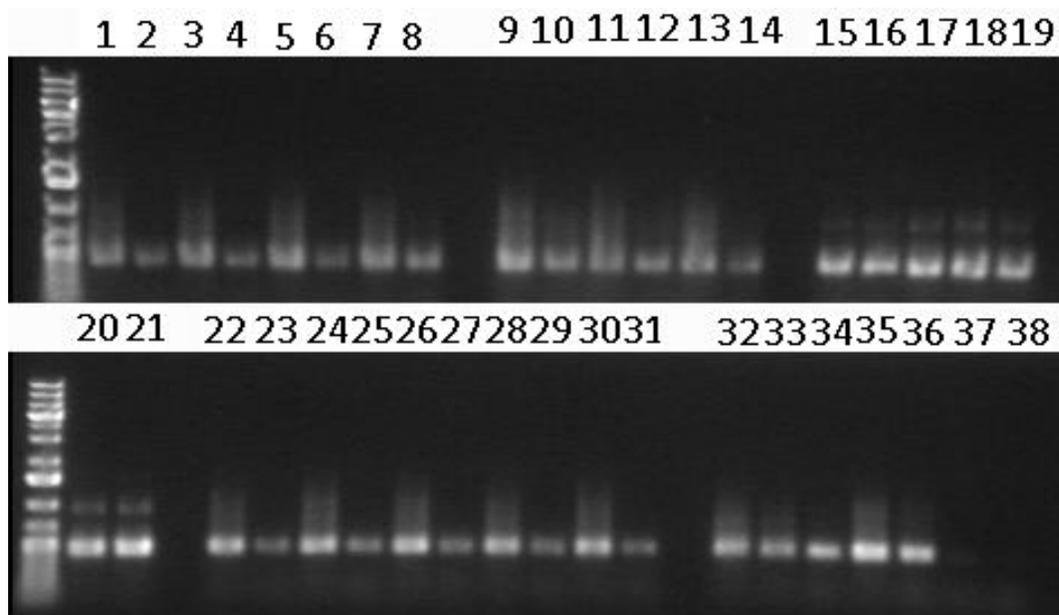


Figure 17. Photographie d'un gel d'électrophorèse des produits de PCR correspondant à la portion V3 du gène de l'ARNr 16S montrant une bande d'environ 200 pb. Les puits 1 à 14 correspondent au produit PCR de l'ADN bactérien total du sol, les puits impairs correspondant à 1 μ l de produit PCR non dilué et les puits pairs correspondant aux mêmes échantillons dilués 50 fois. Les puits 15 à 21 correspondent à l'ADN (1 μ l de produit PCR du gène de l'ARNr 16S dilué 100 fois) des bactéries isolées en surface des spores de *G. irregulare* qu'il a été possible de cultiver *in vitro* (15- *Variovorax paradoxus*, 16- *Sphingomonas* sp., 17- *Microbacterium ginsengiosoli*, 18- *Bacillus megaterium*, 19- *B. cereus*, 20- *Kocuria rhizophila* et 21- *B. simplex*). Les puits 22 à 31 correspondent chacun à l'ADN bactérien amplifié sur une spore unique de *G. irregulare*, les puits pairs correspondant à 1 μ l du produit PCR du gène de l'ARNr 16S non dilué et les puits impairs correspondant aux mêmes échantillons que les puits pairs, mais dilués 50 fois. Les puits 32 à 38 correspondent aux témoins; 32 et 33- témoin de sol, 34- *E. coli*, 35 et 36- témoin du gène de l'ARNr 16S d'*E. coli*, 37- témoin du gène de l'ARNr 16S négatif et 38- témoin négatif (eau stérile).

Pour ce qui est de la séparation des amplicons de la PCR nichée par la technique de DGGE, de graves difficultés avec la technique ont été rencontrées. Les échantillons ne donnaient pas tous la même quantité d'ADN bactérien, donc il devenait difficile d'ajuster les concentrations pour que les bandes soient d'intensité comparable. Par exemple, l'ADN total isolé dans les échantillons de sols contenait probablement de nombreux inhibiteurs de PCR (acides organiques ou autre). Il fallait donc ajouter des substances qui annulaient l'effet de ces inhibiteurs (DMSO, BSA) pour que la réaction PCR arrive à amplifier l'ADN bactérien. Toutefois, cette méthode n'était pas efficace pour tous les échantillons. De plus, l'ADN bactérien isolé sur une seule spore de *G. irregulare* était aussi en très faible concentration étant donné la très petite quantité de matériel biologique surtout si on compare aux isolats bactériens purifiés aussi utilisés dans ces DGGE. De plus, des difficultés importantes lors de la coloration et de la manipulation des gels n'ont pas permis d'obtenir de beaux résultats. Aussi, alors qu'on s'attendait à ce que chaque isolat bactérien ne donne qu'une seule bande, la plupart en ont donné plusieurs (Figure 18). Les méthodes de purification avaient pourtant été suivies à la lettre et de nombreux repiquages de colonies isolées avaient été effectués. Pour tenter de remédier à ce problème, le gène de l'ARNr 16S de chaque isolat a été cloné, mais les résultats obtenus sur gel étaient similaires (Figure 19), il y avait toujours plusieurs bandes visibles pour la plupart des isolats. Cela pourrait être expliqué

par un polymorphisme du gène chez ces isolats bactériens ou encore par de la contamination qui serait survenue à l'une ou l'autre des étapes de la méthode.

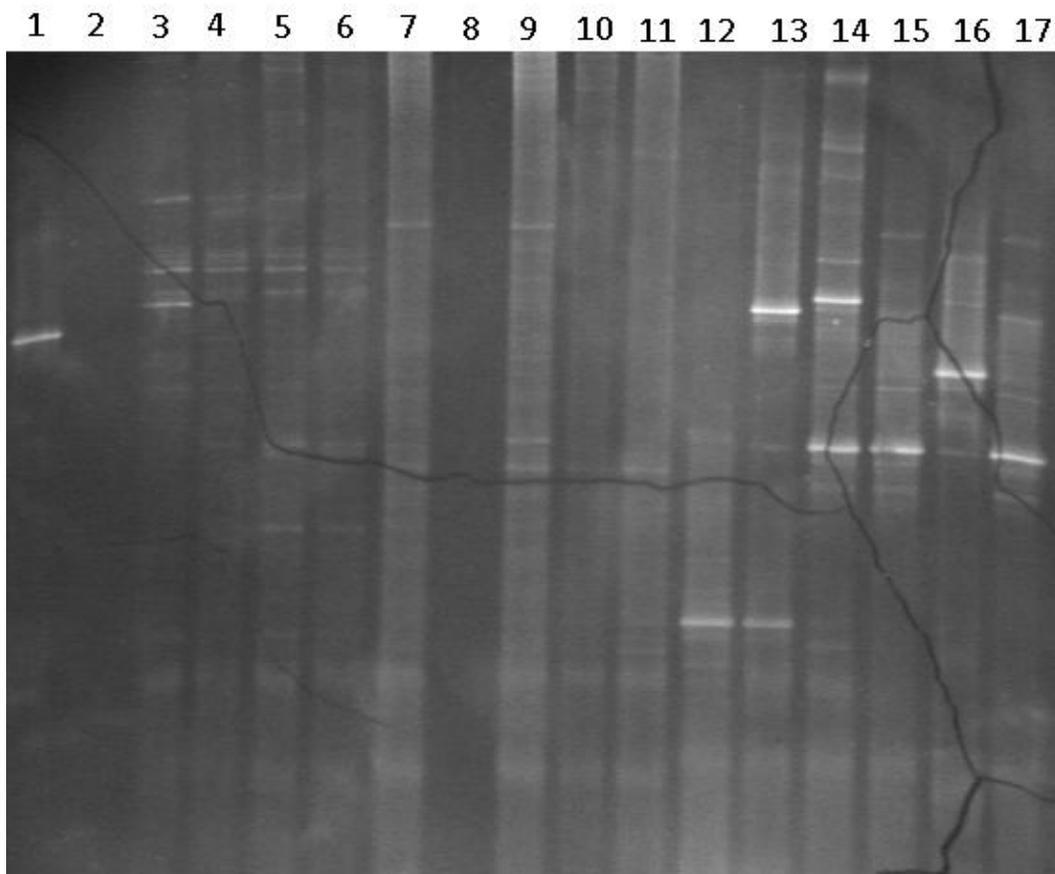


Figure 18. Photographie d'un gel DGGE des produits PCR correspondant à la portion V3 du gène de l'ARNr 16S montrant des bandes d'environ 200 pb. Le puit 1 correspond au contrôle positif *E. coli*. Le puit 2 correspond au contrôle négatif (eau stérile). Les puits 3 à 6 correspondent à l'ADN bactérien amplifié sur une spore unique de *G. irregulare* prélevée dans l'échantillon de sol naturel, nettoyée et mise chacune individuellement dans le tampon PCR. Les puits 7 à 11 correspondent à l'ADN bactérien total du sol. Les puits 12 à 17 correspondent aux bactéries isolées en surface des spores de *G. irregulare* et qu'il a été possible de cultiver *in vitro* (12- *Kocuria rhizophila*, 13- *Bacillus cereus*, 14- *B. megaterium*, 15- *Microbacterium ginsengiosoli*, 16- *Sphingomonas* sp. et 17- *Variovorax paradoxus*).

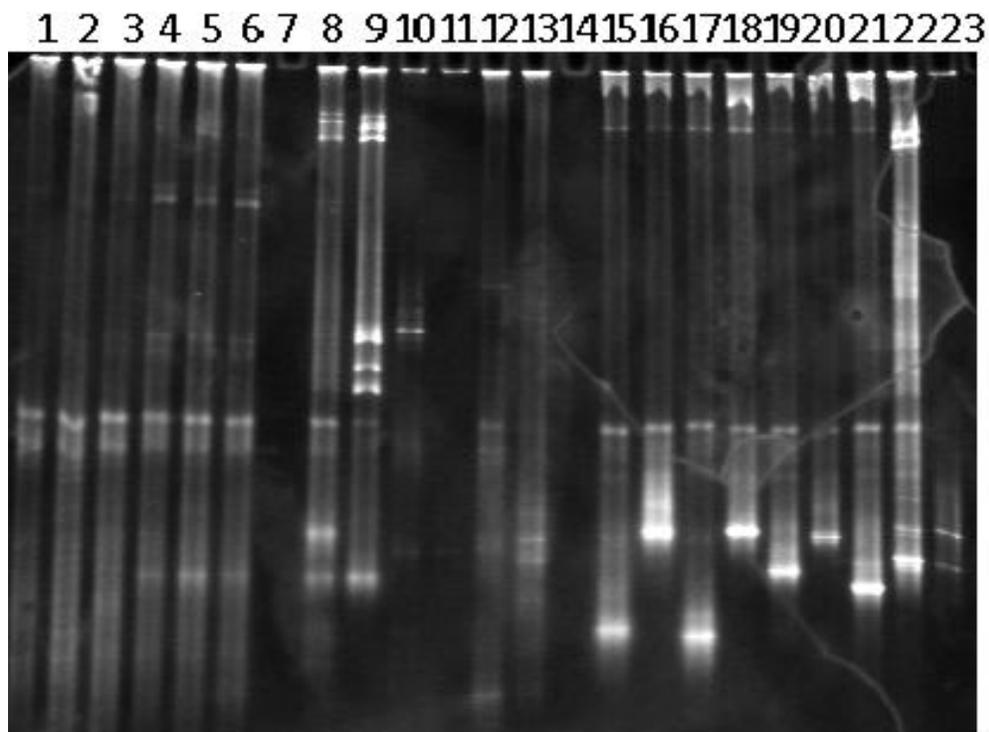


Figure 19. Photographie d'un gel DGGE des produits PCR correspondant à la portion V3 du gène de l'ARNr 16S montrant des bandes d'environ 200 pb. Les puits 1 à 6 correspondent à l'ADN bactérien total du sol. Les puits 8 à 11 correspondent chacun à l'ADN bactérien amplifié sur une spore de *G. irregulare* prélevée dans l'échantillon de sol naturel, nettoyée et mise individuellement dans le tampon PCR de chacune des quatre réactions. Les puits 12 et 13 correspondent à l'ADN bactérien amplifié sur deux et trois, respectivement, spores de *G. irregulare* prélevées dans l'échantillon de sol naturel, nettoyées puis mises dans le tampon PCR. Les puits 15 à 21 correspondent à la portion V3 du gène de l'ARNr 16S cloné à partir des bactéries isolées en surface des spores de *G. irregulare* et qu'il a été possible de cultiver *in vitro* (15- *Sphingomonas* sp., 16- *Bacillus megaterium*, 17- *Kocuria rhizophila*, 18- *Variovorax paradoxus*, 19- *Microbacterium ginsengiosoli*, 20- *B. cereus* et 21- *B. simplex*). Le puit 22 correspond au contrôle positif *E. coli* et le puit 23 au contrôle négatif (eau stérile).

Discussion

Malgré tous ces problèmes avec les techniques utilisées, les résultats partiels obtenus semblent supporter l'hypothèse que la biodiversité associée aux spores est beaucoup plus grande que celle qui a été isolée avec succès par la technique de culture sur mycélium sans autres apports nutritifs que les exsudats provenant du mycélium lui-même. En effet, les motifs de bandes obtenus par DGGE pour l'amplification du gène bactérien codant pour la portion V9 de l'ARNr 16s (Figure 4, chapitre 2, p. 33) montrent une grande quantité de bandes et une variabilité élevée d'une spore à une autre. Ceci démontre qu'il existe un bien plus grand nombre de taxons bactériens associé aux spores de *Glomus irregulare* que le suggère les sept taxons bactériens que nous avons réussi à isoler et cultiver. Plusieurs des taxons bactériens présents en surface des spores de *G. irregulare* devaient avoir des exigences nutritives plus strictes que ce que nos conditions *in vitro* leur offraient, ce qui a nui à la réussite de leur culture en laboratoire.

De plus, la biodiversité totale du sol est encore plus grande que celle associée à *G. irregulare*. Ceci suggère que les bactéries qui s'associent aux champignons mycorhiziens ont des besoins nutritifs spécialisés. On peut faire l'hypothèse que ces bactéries interviennent dans le fonctionnement de la symbiose et contribuent probablement aux bénéfices de cette association pour

chacun de ses acteurs. La population microbienne associée aux mycéliums mycorhiziens peut même faire varier les populations microbiennes présentes dans la mycosphère et même dans la rhizosphère (Scheublin, *et al.*, 2010). Il y a encore beaucoup à apprendre au sujet des interactions complexes qui interviennent dans le sol entre les organismes des différents règnes de la vie. Il est dommage que des contraintes logistiques (temps, expertise et matériel) aient freiné cette recherche. Beaucoup d'efforts devraient être mis pour améliorer les techniques de cultures et la capacité d'amplifier et d'étudier les différents types d'ADN présents dans le sol malgré la présence d'acides organiques et autres inhibiteurs qui interfèrent avec les techniques PCR et DGGE.

ANNEXE 3 - MILIEUX DE CULTURE

MILIEU M

Selon Bécard & Fortin (Bécard & Fortin, 1988)

Préparer les solutions stock suivantes :

I - Macroéléments (100X)

73,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Magnésium Phosphate)

8,0 g KNO_3 (Potassium nitrate)

6,5 g KCl (Potassium chloride)

0,48 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Potassium phosphate)

Compléter le volume jusqu'à 1L avec de l'eau distillée nano pure.

Utiliser 10 ml pour faire 1 litre de milieu M.

II - Solution de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (100X)

28,8 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Calcium Nitrate tetrahydrate)

Compléter jusqu'à 1L avec de l'eau distillée nano pure.

Utiliser 10 ml pour faire 1 litre de milieu M.

III - Solution de KI (1000X)

0,1875 g KI (Potassium Iodide)

Compléter jusqu'à 250 ml avec de l'eau distillée nano pure.

Utiliser 1 ml pour faire 1 litre de milieu M.

IV - Solution de Microéléments KI (1000X)

1- Dissoudre 1,165 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Magnanese sulfate) (ou 1,5 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml d'eau distillée nano pure.

2- Dissoudre 0,6625 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zinc sulfate) dans 100 ml d'eau distillée nano pure.

3- Dissoudre 0,375 g - H_3BO_3 (acide borique) dans 100 ml d'eau distillée nano pure.

4- Mélanger 1-2 et 3

5- Peser 0,65 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et dissoudre dans 50 ml d'eau distillée nano pure. Une fois dissout, ajouter 2,5 ml de cette solution au mélange.

6- Peser 0,12 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ou 0,11 g de $\text{NH}_4(\text{Mo}_7\text{O}_{24})$) et dissoudre dans 100 ml d'eau distillée nano pure. Une fois dissout, ajouter 0,5 ml de cette solution au mélange.

6- Compléter le volume jusqu'à 250 ml avec de l'eau distillée nano pure.

V - Solution de NaFe EDTA 500 ml (200X, utiliser 5 ml)

0,8 g NaFe EDTA dans 500 ml d'eau distillée nano pure

Compléter jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée nano pure.

Utiliser 1 ml pour faire 1 litre de milieu M.

****** Bien mélanger et passer à l'autoclave pour 20 minutes avant l'utilisation. Conserver toutes les solutions stock au réfrigérateur.**

VI – Solution de vitamines

Utiliser Gamborg's Vitamin Solution 1000X de Sigma. Ajouter 1 ml stérilement seulement après avoir passé la préparation à l'autoclave et l'avoir refroidie.

VII – Étapes pour préparer 1L (1X) du milieu M

Mesurer environ 700 ml d'eau distillée nano pure

Ajouter 10 g de sucrose

Pour couler des Pétris, ajouter 4 g de Gellangum (0,4% dans milieu final)

Ajouter 10 ml de la solution de macroéléments (100X)

Ajouter 10 ml de la solution de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (100X)

Ajouter 5 ml de la solution de NaFe EDTA (200X)

Ajouter 1 ml de la solution de microéléments (1000X)

Ajouter 1 ml de la solution de KI (1000X)

Agiter pour dissoudre

Compléter le volume à 1L avec de l'eau distillée nano pure

Ajuster le pH à 5,5

Passer le mélange à l'autoclave pour 20 minutes

Refroidir tout en agitant

Ajouter stérilement 1ml de la solution de vitamines (1000X)

Couler les pétris stérilement avant que le milieu ne polymérise si du Gellangum a été ajouté.

MILIEU EAU

Pour faire 1 litre de milieu eau à couler dans des boîtes Pétris.

- 1- Mesurer environ 700 ml d'eau distillée nano pure
- 2- Ajouter doucement en agitant 4 g de Gellangum (0,4% dans milieu final) et bien mélanger
- 3- Ajouter 0,73 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Magnésium Phosphate)
- 4- Compléter le volume à 1L avec de l'eau distillée nano pure et bien mélanger
- 5- Passer le mélange à l'autoclave pour 20 minutes
- 6- Refroidir tout en agitant
- 7- Couler les pétris stérilement avant que le milieu ne polymérise.

MILIEU DE CONGÉLATION DES BACTÉRIES

- 1- Préparer stérilement une dilution à 60% de glycérol avec du TSA 10%.
- 2- Utiliser des tubes de 2 ml à bouchon qui se vissent. Tout le matériel utilisé doit être stérilisé et les tubes bien identifiés.
- 3- Mettre 250 μ l de culture bactérienne avec 750 μ l de glycérol à 60% et bien mélanger.
- 4- Refroidir sur glace avant de mettre au congélateur à -80°C.

ANNEXE 4 - MARQUEUR UTILISÉ POUR LE DGGE

Identité des bandes du marqueur utilisé pour le DGGE (chapitre 2) fournies par les techniciennes de laboratoire du centre de recherche NIOO-KNAW.

Position in marker from top to bottom	
1	<i>Cellvibrio vulgaris</i> NCIMB 8633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
2	Uncultured bacterium clone LO13.6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
3	Uncultured bacterium clone LO13.6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
4	<i>Pseudomonas</i> sp. Gu5828 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
5	<i>Bacillus</i> sp. TH64 gene for 16S rRNA, partial sequence
6	Uncultured bacterium O18F3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
7	<i>Alteromonadaceae</i> bacterium LA34A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ANNEXE 5 - PHOTOS DU LIEU D'ÉCHANTILLONNAGE

Échantillonnage à Mirabel –Lachute aux coordonnées GPS situées entre 45°41'36.35''N 74°08'33.32''O et 45°41'33.52''N 74°08'31.50''O.





