

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES SPÉCIFIQUES POUR
L'IDENTIFICATION ET LA QUANTIFICATION DE DEUX ESPÈCES DE
CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ARBUSCULAIRES EN UTILISANT LA PCR
EN TEMPS RÉEL

PAR

STÉPHANIE BERTHIAUME

M.SC EN SCIENCES BIOLOGIQUES

FACULTÉ DES ARTS ET DES SCIENCES

DANS LE CADRE DU COURS BIO6902

MÉMOIRE DE MAÎTRISE

OCTOBRE 2014

TABLE DES MATIÈRES

1.	Liste des figures	p. 3
2.	Liste des tableaux	p. 7
3.	Résumé	p. 8
4.	Introduction	p. 11
	a. Définition et écologie des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA)	p. 11
	b. La symbiose mycorhizienne et son action sur l'hôte	p. 12
	c. Les concepts d'espèce et d'isolat chez les CMA	p. 13
	d. Identification et quantification basées sur la morphologie des CMA	p. 14
	e. Identification et quantification biochimique des CMA	p. 16
	f. Identification et quantification moléculaire des CMA	p. 17
	g. Problématique	p. 23
	h. Objectifs	p. 24
5.	Matériel et méthodes	p. 25-43
	a. Culture <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> des CMA	p. 25
	b. Récolte et conservation des échantillons de spores <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	p. 26
	c. Coloration MTT	p. 27
	d. Préparation des échantillons à partir du sol et des racines des essais en serre	p. 28
	e. Extraction d'ADN	p. 28
	f. Alignement des gènes et intergènes mitochondriaux	p. 30
	g. Conception d'amorces et de marqueur Taqman spécifique à DAOM220722	p. 31
	h. Clonage du fragment d'ADN spécifique à DAOM220722	p. 32
	i. Préparation de la courbe standard	p. 34
	j. Réaction de PCR et de qPCR	p. 35
	k. Dispositifs expérimentaux et analyses statistiques	p. 36
6.	Résultats et discussion	p. 44-94
	a. Objectif 1	p. 44
	b. Objectifs 2	p. 54
	i. Objectif 2.1	p. 54
	ii. Objectif 2.2	p. 63
	iii. Objectif 2.3	p. 71
	c. Objectifs 3	p. 77
	i. Objectif 3.1	p. 77
	ii. Objectif 3.2	p. 80

7. Conclusion	p. 95
8. Perspectives	p. 98
9. Remerciements	p. 99
10. Bibliographie	p. 100
11. Annexe	p. 111

Liste des figures

- **Figure 1. Alignement de l'intergène *cox3-rnl* des espèces présentant cet ordre de gènes.** En rouge est encerclée l'insertion spécifique à *G. irregulare* DAOM197198. p. 31
- **Figure 2. Dispositif expérimental de détermination du nombre de copies de marqueur par spore** p. 38
- **Figure 3. Dispositif expérimental de détermination de la méthode optimale de préparation des échantillons de spores** p. 40
- **Figure 4. Dispositif expérimental du test de l'application du marqueur spécifique à DAOM220722 sur des échantillons de sol de cultures in vivo de soya et de pomme de terre inoculés avec les traitements 6 et 10.** p. 42
- **Figure 5. Test de spécificité des amorces CerebF et CerebR en PCR régulière sur une gamme d'espèces et d'isolats de CMA.** Certains CMA proviennent de la collection de l'Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV) alors que d'autres proviennent de Premier Tech Biotechnologies (PTB, et la provenance de chaque échantillon est indiquée sur la figure. De plus, certains CMA proviennent de deux extractions différentes sur deux pétris différents. Ceux-ci sont indiqués par les numéros 1 et 2. p. 45
- **Figure 6. Validation de la courbe standard du marqueur spécifique à DAOM220722 jour 1.** En haut : les courbes d'amplification de chaque point de la courbe. Au milieu : la courbe indiquant le cycle d'amplification selon le nombre de copies de marqueurs. En bas : les données de l'équation de la courbe standard. p. 47
- **Figure 7. Validation de la courbe standard du marqueur spécifique à DAOM220722 jour 2.** En haut : les courbes d'amplification de chaque point de la courbe. Au milieu : la courbe indiquant le cycle d'amplification selon le nombre de copies de marqueurs. En bas : les données de l'équation de la courbe standard. p. 48
- **Figure 8. Validation de la courbe standard du marqueur spécifique à DAOM220722 jour 3.** En haut : les courbes d'amplification de chaque point de la courbe. Au milieu : la courbe indiquant le cycle d'amplification selon le nombre de copies de marqueurs. En bas : les données de l'équation de la courbe standard. p. 49
- **Figure 9. Détermination d'un nombre de copies/spore, jour 1.** p. 58
- **Figure 10. Détermination d'un nombre de copies/spore, jour 2.** p. 59
- **Figure 11. Détermination d'un nombre de copies/spore, jour 3.** p. 60
- **Figure 12. Comparaison de deux méthodes de préparation des échantillons de spores.** p. 65
- **Figure 13. Comparaison de deux méthode de préparation des spores: relation de linéarité entre le nombre de spores dans un échantillon et le nombre de copies de marqueur retrouvées.** p. 66

- **Figure 14. Comparaison des efficacités d'extraction d'ADN de 3 trousses commerciales: détection du nombre de copies de marqueurs en rt-PCR.**
p. 73
- **Figure 15. Quantification du marqueur spécifique à DAOM197198 dans les échantillons de sol et de racines de pomme de terre du traitement 2.** p.82
- **Figure 16. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de pomme de terre du 4^e pot du traitement 2 (PS2.4) et du sol de plant de soya du 3^e pot du traitement 2 (SS2.3) dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM220722. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.** p. 84
- **Figure 17. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.4 et SS2.3 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM197198. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.** p. 85
- **Figure 18. Résultats de l'analyse qPCR de l'ADN concentré 20X des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.4 et de SS2.3 à l'aide du marqueur spécifique à DAOM220722. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.** p. 87
- **Figure 19. Résultats de l'analyse qPCR de l'ADN concentré 4X des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.4 et de SS2.3 à l'aide du marqueur spécifique à DAOM197198. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.** p. 88
- **Figure 20. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.6 et SS2.6 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM220722. En gris, les points de la courbe standard, en bleu, les échantillons SS2.6, en rouge, les échantillons PS2.5** p. 90
- **Figure 21. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.6 et SS2.6 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM197198.** p. 91
- **Figure 22. Vérification de la lyse cellulaire à l'aide du kit d'extraction d'ADN de chez Mo Bio. Les flèches bleues indiquent des spores non-lysées; les flèches vertes indiquent des spores partiellement lysées; les flèches grises indiquent des débris cellulaires; la flèche rouge indique un agrégat de spores non-lysées et partiellement lysées.** p. 93
- **Figure 23. Les 4 phases de la réaction de qPCR (*Real-time PCR for mRNA quantitation* par Marisa L. Wong & Juan F. Medrano 2005¹⁵⁷).** p. 113
-

Liste des tableaux

- **Tableau 1. Représentation des traitements de l'expérience en serre de Biopterre.** p. 26
- **Tableau 2. Ordre des gènes mitochondriaux chez diverses espèces et isolats de CMA.** N.B. L'ADN mitochondrial se présente la plupart du temps sous forme d'une molécule circulaire et le premier gène est conventionnellement *rnl*. En rouge est encadrée la série de gène *nad1-cox2*, unique à *G. cerebriforme*. p. 31
- **Tableau 3. Caractéristiques des amorces et des sondes ciblant DAOM220722 et DAOM197198.** p. 32
- **Tableau 4. Collection de l'IRBV (lesquelles proviennent de chez GINCO¹⁴⁵) et collection de Premier Tech.** p. 32
- **Tableau 5. Calcul du détail de chaque dilution de la courbe standard du marqueur moléculaire de *G. cerebriforme*** p. 35
- **Tableau 6. Calcul du détail de chaque dilution de la courbe standard du marqueur moléculaire de DAOM197198** p. 35
- **Tableau 7. Dispositif expérimental de comparaison de l'efficacité de l'extraction d'ADN de trois trousses commerciales.** p. 41
- **Tableau 8. Variation entre les Ct de sortie de chaque répétition de chaque point de la courbe lors de l'expérience de validation de la courbe au jour 1.** p.50
- **Tableau 9. Variation entre les Ct de sortie de chaque répétition de chaque point de la courbe lors de l'expérience de validation de la courbe au jour 2.** p. 50
- **Tableau 10. Variation entre les Ct de sortie de chaque répétition de chaque point de la courbe lors de l'expérience de validation de la courbe au jour 3.** p. 50
- **Tableau 11. Résultat du modèle de régression linéaire à effets fixes comparant les cycles d'amplification (Ct) en fonction du point de la courbe et du jour où l'expérience a été menée.** p. 51
- **Tableau 12. Résultat du modèle de régression linéaire à effets fixes comparant les cycles d'amplification (Ct) analysé par rapport à l'effet Jour en fonction du point de la courbe.** p. 52
- **Tableau 13. Résultat du modèle de régression linéaire à effets fixes comparant les cycles d'amplification (Ct) analysé par rapport à l'effet Point de la courbe en fonction du jour.** p. 52
- **Tableau 14. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité intra-essai de l'expérience du volet 2.1, jour 1.** p.52
- **Tableau 15. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité intra-essai de l'expérience du volet 2.1, jour 2.** p. 60
- **Tableau 16. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité intra-essai de l'expérience du volet 2.1, jour 3.** p. 60

- **Tableau 18. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité inter-essai de l'expérience du volet 2.1. p.61**
- **Tableau 19. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant les cycles de sortie (Ct), les nombres de mitochondries totaux retrouvés dans chaque échantillon (NMT) et le nombre de mitochondries par spore (NM/S) défini selon chaque échantillon en fonction du nombre de spores dans l'échantillon et du jour où l'expérience est menée. p. 61**
- **Tableau 20. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant les cycles de sortie (Ct), les nombres de mitochondries totaux retrouvés dans chaque échantillon (NMT) et le nombre de mitochondries par spore (NM/S) défini selon chaque échantillon par rapport à l'effet nombre de spores en fonction du jour. p. 62**
- **Tableau 21. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant les cycles de sortie (Ct), les nombres de mitochondries totaux retrouvés dans chaque échantillon (NMT) et le nombre de mitochondries par spore (NM/S) défini selon chaque échantillon par rapport à l'effet jour en fonction du nombre de spores. p. 62**
- **Tableau 22. Résultats des tests HSD de Tukey pour caractériser les effets "jour" et "nombre de spores dans l'échantillon" sur les variables sortantes Ct, nombre de mitochondries dans l'échantillon et nombre de mitochondries par spore. p. 62**
- **Tableau 23. Comparaison de deux méthodes de préparation des échantillons de spores. p. 65**
- **Tableau 24. Modèle de régression linéaire à effets mixte comparant le Ct, le NMT et le NM/S en fonction de la méthode de compte de spores et du nombre de spores présentes dans l'échantillon. p. 70**
- **Tableau 25. Résultats des tests T de Student et HSD de Tukey sur les effets "Méthode de compte" et "nombre de spores dans l'échantillon" sur les variables sortantes Ct, nombre de mitochondries dans l'échantillon et nombre de mitochondries par spores. p. 71**
- **Tableau 26. Comparaison de l'efficacité d'extraction d'ADN de 3 trouses commerciales. p. 73**
- **Tableau 27. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant le Ct, le NMT et le NM/S en fonction de la trousse d'extraction d'ADN et du milieu. p. 75**
- **Tableau 28. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant le Ct, le NMT et le NM/S par rapport à l'effet en fonction de la trousse d'extraction d'ADN et du milieu. p. 75**
- **Tableau 29. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant le Ct, le NMT et le NM/S par rapport à l'effet du milieu en fonction de la trousse d'extraction. p. 76**

- **Tableau 30. Résultats des tests T de Student et HSD de Tukey sur les effets "milieu" et "trousse d'extraction" sur les variables sortantes Ct, nombre de mitochondries dans l'échantillon et nombre de mitochondries par spore.**
p. 76
- **Tableau 31. Résultats de l'analyse quantitative sur les témoins positifs et négatifs de l'objectif 3.**
p.78
- **Tableau 32. Quantification du marqueur spécifique à DAOM197198 dans les échantillons de sol et de racines de pomme de terre du traitement 2.**
p. 80

Résumé

Les champignons mycorhizien à arbuscules (CMA) sont des organismes pouvant établir des symbioses avec 80% des plantes terrestres. Les avantages d'une telle symbiose sont de plus en plus caractérisés et exploités en agriculture. Par contre, jusqu'à maintenant, il n'existe aucun outil permettant à la fois l'identification et la quantification de ces champignons dans le sol de façon fiable et rapide. Un tel outil permettrait, entre autres, de mieux comprendre les dynamiques des populations des endomycorhizes dans le sol. Pour les producteurs d'inoculum mycorhiziens, cela permettrait également d'établir un suivi de leurs produits en champs et d'avoir un contrôle de qualité de plus sur leurs inoculants. C'est ce que nous avons tenté de développer au sein du laboratoire du Dr. Hijri. Depuis environ une trentaine d'années, des outils d'identification et/ou de quantification ont été développés en utilisant les profils d'acides gras, les isozymes, les anticorps et finalement l'ADN nucléaire.

À ce jour, ces méthodes d'identification et de quantification sont soit coûteuses, soit imprécises. Qui plus est, aucune méthode ne permet à la fois la quantification et l'identification de souches particulières de CMA.

L'ADN mitochondrial ne présente pas le même polymorphisme de séquence que celui qui rend l'ADN nucléaire impropre à la quantification. C'est pourquoi nous avons analysé les séquences d'ADN mitochondrial et sélectionné les régions caractéristiques de deux espèces de champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA). C'est à partir de ces régions que nous avons développé des marqueurs moléculaires sous forme de sondes et d'amorces TaqMan permettant de quantifier le nombre de mitochondries de chacune de ces espèces dans un échantillon d'ADN. Nous avons ensuite tenté de déterminer une unité de quantification des CMA, soit un nombre de mitochondries par spore. C'est alors que nous avons réalisé que la méthode de préparation des échantillons de spores ainsi que la méthode d'extraction d'ADN avaient des effets significatifs sur l'unité de quantification de base. Nous avons donc optimisé ces protocoles, avant d'en tester l'application sur des échantillons de sol et de racines ayant été inoculés avec chacune des deux espèces cibles. À ce stade, cet outil est toujours semi-quantitatif, mais il permet

l'identification précise de deux espèces de CMA compétentes dans des milieux saturés en phosphore inorganique. Ces résultats , en plus d'être prometteurs, ont permis d'augmenter les connaissances méthodologiques reliées à la quantification des CMA dans le sol, et suggèrent qu'à cause de leurs morphologies différentes, l'élaboration d'un protocole de quantification standardisé pour toutes les espèces de CMA demeure un objectif complexe, qui demande de nouvelles études *in vivo*.

Mots clés

Mycorhizes, Identification, PCR quantitative, marqueurs spécifiques, sol, *Glomus cerebriforme* DAOM220722, *Glomus irregulare* DAOM197198

Abstract

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) are able to form symbiosis with approximately 80% of plant species, including most important crops. This symbiosis is known as Arbuscular Mycorrhiza which has been largely used in agriculture to promote plant growth by enhancing minerals uptake and protecting plants against biotic and abiotic stresses. Despite the ecological and economical importance of this symbiosis, specific markers for spore quantification of commercial AMF strains by quantitative real-time PCR (qPCR) are extremely limited and none has been rigorously validated for quality control of manufactured products such as biofertilizers. Most of the existing AMF markers developed either for AMF identification or for AMF quantification purposes are based on either morphological characters, on Fatty Acids Methyl Esters (FAME) profiles, on specific isozymes or antibodies, or on nuclear DNA.

It has been shown that mitochondrial (mt) genomes are conserved among AMF species. This allowed us to use mt genomes in order to develop efficient isolate-specific markers. Using the alignments of 11 complete AMF mt genomes, a qPCR assay using a hydrolysis probes designed in the single copy *cox3-rnl* intergenic region was tested and validated to specifically and accurately quantify the spores of the model *R. irregularis* isolate DAOM197198 and another probe was designed in *nad1-cox2* intergene specific to *Glomus cerebriforme*. The specificity tests performed, using standard PCR and qPCR, clearly showed that the primers specifically amplified the isolate DAOM-197198 or *Glomus cerebriforme* DAOM220722. Quantification assays were successfully undertaken on unknown samples in liquid suspensions, commercial solid formulations and soil samples to show the accuracy and reproducibility of the assays. This study provides a powerful molecular toolkit specifically designed to quantify spores of the model AMF isolate *Glomus cerebriforme* DAOM220722. The latter could be applied to other AMF taxa and will be useful to research institutions and governmental and industrial laboratories running routine quality control of AMF-based products.

Key words

Mycorrhiza, Identification, quantitative PCR, specific TaqMan markers, soil, *Glomus cerebriforme* DAOM220722, *Glomus irregulare* DAOM197198

Introduction

Définition et écologie des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA)

Les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) sont des organismes fongiques possédant des mycéliums cenocytiques multinucléés qui peuvent établir des symbioses avec les racines de plus de 80% des espèces de plantes aussi bien terrestres qu'aquatiques. Un CMA peut créer des symbioses avec plus d'une espèce de plante à la fois, et une plante peut être colonisée par plus d'un CMA^{1,2}. Ces organismes seraient apparus il y a plus de 460 millions d'années et auraient facilité la colonisation du monde terrestre par les plantes^{3,4}, de part les avantages qu'ils procurent à la plante hôte. La glomaline, une protéine produite exclusivement par ces organismes, contribue au maintien du sol en augmentant la stabilité de ses agrégats. Ceci est un rôle important car les contenus en eau et en nutriments, ainsi que les échanges gazeux dans le sol⁵ dépendent en partie de l'agrégation du sol⁵. De plus, les CMA contribuent à la biodiversité microbienne de la rhizosphère (région du sol directement influencée par la présence des racines⁶). Par exemple, la diversité d'une communauté de CMA a un impact sur la diversité des communautés d'insectes et de bactérie^{7,8} de la rhizosphère. Certaines bactéries vivent à la surface des hyphes des CMA⁹ et ceux-ci abritent même des bactéries endophytes du genre *Burkholderia*¹⁰ ainsi que *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Massilia* sp., et *Methylobacterium* sp. ainsi que d'autres taxons^{9,11}. Les CMA interagissent par la formation d'anses d'anastomose (fusion des hyphes de deux individus différents¹²), ce qui leur permet d'échanger du matériel génétique¹³. Les interactions des CMA les plus étudiées demeurent toutefois celles qui les relient aux plantes avec lesquelles ils établissent une symbiose. La diversité biologique des CMA a un impact significatif sur la diversité biologique des plantes¹⁴. Malgré les nombreuses interactions des CMA avec leur environnement, les dynamiques des populations de CMA sont toujours peu connues. En 1998, Helgason et ses collaborateurs démontrent que la diversité des CMA dans les sols arables est plus faible que celle retrouvée dans les bois¹⁵, ce que Vandenkoornhuyse & al. (2003)¹ tente d'expliquer par l'hypothèse selon laquelle la rotation des cultures dans les champs sur plusieurs années favorise les souches et

espèces de CMA pouvant infecter plusieurs espèces de plantes¹. Par contre, une étude plus récente révèle que la composition des populations de CMA dans les sols arables n'est pas nécessairement pauvre et dépend de plusieurs facteurs, notamment du traitement appliqué^{16,17}.

La symbiose mycorhizienne et son action sur l'hôte

Les CMA constituent une interface entre leur hôte et le sol. Les flavonoïdes émis par la plante stimulent la germination des spores de CMA¹⁸. Des hyphes croissent depuis les spores germées, stimulées par les exsudats racinaires¹⁹, ce qui se traduit par une augmentation du nombre de mitochondries²⁰ en direction des racines, et développent au contact des racines une structure spécialisée nommée appressorium, qui leur permet de pénétrer le cortex racinaire. C'est à l'intérieur des cellules du parenchyme qu'ils forment des arbuscules, des structures d'échanges entre eux et leur hôte²¹. Les CMA alimentent la plante en eau et en minéraux, tel que le phosphore, via cette structure. En échange, les CMA reçoivent des hydrocarbures issus de la photosynthèse²² nécessaire à leur développement^{3,23-27}. Cette capacité des CMA à rendre le phosphore disponible pour les plantes est cruciale du fait de la dynamique chimique du phosphore²⁸. L'apport accru en eau et en sels minéraux qu'un CMA confère à son hôte se traduit par une augmentation de croissance de la plante et de sa biomasse^{19,21,29}. Le système racinaire d'une plante mycorhizée est plus développé et ramifié²¹ que celui d'une plante non-mycorhizée. L'endo-mycorhization semble aussi jouer un rôle dans la floraison et la fructification des plantes, en plus d'améliorer leur tolérance contre les agents pathogènes du sol^{30,31} et contre divers stress environnementaux tels que la sécheresse^{3,32,33} ou la présence de contaminants organiques et inorganiques lourds^{24,34-37}. En effet, il a été démontré que l'inoculation de plantes avec certains isolats de CMA peut augmenter significativement l'efficacité de la phytoremédiation des métaux traces³⁸. Cependant, l'efficacité de l'inoculation et de la symbiose dépend de l'espèce de l'hôte, car une espèce de CMA donnée ne réagit pas de la même manière avec toutes les espèces de plantes^{39,40}. Par exemple, le taux de sporulation d'une espèce de CMA dépendra du type d'hôte⁴¹. De même, ce ne sont pas toutes les espèces et isolats de CMA qui ont la même tolérance aux métaux traces³⁷ ou aux fertilisants chimiques tels que le phosphore inorganique^{33,42} dans

l'environnement. La structure et la nature d'un sol ont un impact sur les communautés des CMA, car les propriétés physico-chimiques des sols diffèrent d'un site à l'autre⁴³. L'étude des CMA est donc importante, car une meilleure compréhension de la biologie de ces organismes et de leurs interactions avec les divers organismes de la rhizosphère, pourraient permettre plusieurs avancées potentielles, non seulement en recherche fondamentale, mais en recherche appliquée (biofertilisants). Ces champignons ont naturellement suscité l'intérêt commercial en horticulture et en agriculture et dans plusieurs autres domaines. Par conséquent plusieurs compagnies ont investi en recherche et développement pour commercialiser des inoculants mycorhiziens^{31,44} lesquels pourraient permettre de réduire l'épandage de fertilisants chimiques³¹. Cependant, la composition, la formulation et la qualité de ces inoculants commerciaux varient grandement d'une compagnie à une autre, et il est difficile d'évaluer leurs efficacités relatives en absence d'outils adéquats de contrôle de qualité. La recherche fondamentale et appliquée gagneraient donc à ce que des marqueurs permettant d'identifier et de quantifier les CMA dans le sol soient développés. De tels marqueurs permettraient l'étude des interactions entre les CMA dans la rhizosphère, en plus de permettre d'établir des diagnostics de l'inoculation en champs et dans des racines des plantes, pour définir des standards de qualité⁴⁴. La quantification idéale serait basée sur une unité commune à tous les isolats et à toutes les espèces de CMA et sur un protocole présentant une efficacité constante dans le sol pour toutes les espèces. À ce jour, il n'existe pas de méthode fiable permettant à la fois l'identification et la quantification d'une souche de CMA dans le sol.

Les concepts d'espèce et d'isolat chez les CMA

Les CMA sont des organismes particuliers, du fait de leur mode de vie biotrophe obligatoire et de leur organisation cellulaire. De plus, la taxonomie des CMA est complexe. Longtemps classés parmi les *Endogonales* sous le phylum des *Zygomycota*, les CMA furent placés dans l'ordre des *Glomales* sur la base de leur morphologie distincte de certaines espèces d'*Endogonales* au début des années 90⁴⁵. Les critères morphologiques s'avèrent insuffisants pour délimiter les espèces et les isolats phylogénétiquement proches. En 2001, les CMA devinrent un phylum fongique monophylétique, séparé des *Zygomycota* selon une phylogénie basée sur l'ADN de la petite sous-unité ribosomale

(SSU-ADNr): les *Glomeromycota*. De nombreuses espèces de CMA ont été mal identifiées, y compris l'espèce modèle des CMA, *Glomus irregulare* DAOM197198⁴⁶. D'ailleurs, la nomenclature des *Glomeromycota* évolue au fil des clarifications des relations phylogénétiques qui existent entre les espèces et isolats. *Glomus irregulare* DAOM197198 a d'ailleurs été rebaptisé *Rhizophagus irregularis* dans un article paru en 2010 par Schübler et al.⁴⁷. Il est à noter que le nom «*Rhizophagus*» étant déjà associé à un coléoptère pour son appétit pour les racines végétales⁴⁸, nous avons décidé de conserver l'ancienne nomenclature «*Glomus*», car la nouvelle nomenclature peut induire le lecteur en erreur sur la nature des relations entre le CMA et son hôte. Le concept d'individu et d'espèce demeure plutôt flou chez les CMA car ce sont des organismes ceonocytiques hétérocaryotiques. La reproduction sexuée n'a jamais été observée⁴⁹. Le matériel génétique s'échange via les anastomoses^{12 13}. En effet, des variations de performance ont été identifiées au sein d'une même espèce par Munkvold & al. en 2004⁵⁰. Un isolat d'une espèce de CMA est déterminé par la mise en culture d'une spore de CMA. La mise en culture peut se faire *in vivo* en culture en pot ou *in vitro* sur milieu minimal en présence de racines de carottes modifiées à l'ADN-ti. L'ADN-ti provient de la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* qui confère aux racines un morphotype chevelu^{29,51,52}. Différents isolats d'une même espèce montrent une grande variation phénotypique⁵⁰. De plus, différents isolats appartenant à la même espèce peuvent présenter des variations génétiques considérables⁵³.

Identification et quantification basées sur la morphologie des CMA

Une identification fiable des CMA est cruciale pour estimer leur biodiversité dans différents écosystèmes, et pour leur utilisation en tant que biofertilisants^{54,55}. Traditionnellement, l'identification des CMA se basait principalement sur la morphologie des spores (structure de la paroi sporale, ornementation, couleur de la spore, attachement de l'hyphe, etc.) et sur les structures fongiques intra-racinaires de certains taxons⁵⁶⁻⁵⁹. C'est l'observation microscopique de ces éléments, avec ou sans coloration⁶⁰, qui permettait de différencier les différents taxons de CMA⁴¹. Cependant, la coloration des racines au bleu Trypan, ne permet pas une identification toujours fiable des CMA car la majorité des CMA ont sensiblement les mêmes structures⁶¹. Avant de pouvoir observer le

matériel, encore faut-il isoler les spores du sol. Cela est possible soit en échantillonnant du sol directement dans un milieu naturel, soit en utilisant des plants «pièges». Par après, différentes grandeurs de tamis sont utilisées pour récupérer les spores dans le sol. La technique du gradient de densité de sucrose est utilisée pour séparer les spores de la fraction fine du sol après le tamisage⁵⁵. Une fois isolées, les spores des CMA peuvent être mises en culture *in vitro*⁵⁴ avec des racines de carottes modifiées à l'ADN-ti^{29,51,52}, ou *in vivo* dans des pots en serre avec une plante hôte^{41,55}. Malheureusement, les méthodes de culture présentent des limitations, car certaines espèces de CMA ne forment que peu de spores⁵⁵. Plusieurs travaux ont démontré que les méthodes conventionnelles tendent à sous-estimer la richesse spécifique des CMA^{55,59 62}.

Les espèces caractérisées selon leur morphologie sont qualifiées de «morpho-espèces». 200 de ces morpho-espèces ont été observées à ce jour⁶³. Cette méthode d'identification s'avère toutefois difficile à cause de la limite des caractères morphologiques, et un utilisateur non-expérimenté, risque d'avoir beaucoup de difficulté à identifier certains taxons⁶⁴. En effet, certaines espèces de genres éloignés, tels que *Paraglomus* et *Glomus*, vont présenter un morphotype fort similaire³. À l'inverse, certaines espèces sont «dimorphiques», c'est-à-dire qu'elles peuvent présenter plus d'un morphotype⁶⁵. Ainsi, plusieurs espèces furent mal identifiées⁴⁶. De plus, la morphologie des spores varie au sein d'une même espèce⁶⁶ en fonction de plusieurs facteurs : l'espèce de la plante hôte colonisée^{55,65}, l'environnement dans lequel se trouve le CMA⁶⁷, le stade de développement de ce dernier, l'état de dégradation de la spore, le degré de parasitisme qu'elle présente^{54,65,68-71}. Il a été déterminé que seules les spores permettent l'identification morphologique, et non les structures intra-racinaires, lesquelles permettraient tout au plus une identification au genre⁵⁴. Tel que mentionné plus haut, l'étude de la biodiversité des CMA dans un milieu repose sur l'identification fiable des espèces et des isolats. Pour ce faire, l'observation de spores à la loupe binoculaire et au microscope est requise si la méthode morphologique d'identification est privilégiée.

En utilisant l'identification morphologique, les CMA sont identifiés et quantifiés par coloration et comptage des spores⁷²⁻⁷⁴ d'une part et d'autre part, par l'estimation du taux de colonisation en calculant le pourcentage du cortex racinaire où l'on retrouve des

structures mycorhiziennes^{60,75}. Cette méthode de caractérisation des CMA est longue et difficile, en plus d'être approximative. Concernant la quantification dans le sol par cette méthode, elle est également approximative.

Identification et quantification biochimique des CMA

Puisque la morphologie ne suffit pas à identifier adéquatement les CMA, d'autres approches ont été développées, telles que les méthodes biochimiques et moléculaires. Les méthodes biochimiques reposent sur l'utilisation des anticorps, des isozymes, des acides gras, des composants chimiques de la paroi cellulaire des CMA.

Les premiers anticorps produits pour la détection des CMA sont des anticorps polyclonaux élaborés à partir d'extraits de spores⁷⁶, mais ces anticorps étaient imprécis à cause des réactions croisées avec d'autres espèces de CMA⁷⁷. Plusieurs tentatives ont été faites pour améliorer la spécificité des anticorps polyclonaux, notamment en élaborant les anticorps contre des protéines spécifiques dans le CMA ciblé. Malgré cela, la résolution taxonomique des anticorps polyclonaux se limite au genre⁷⁷. La spécificité des anticorps monoclonaux est plus élevée, puisqu'il est possible d'en synthétiser avec des réactions spécifiques à une espèce⁷⁸. S'il est possible de distinguer les isolats par ELISA avec ces anticorps sur des échantillons de mono-cultures, il semble impossible de distinguer les isolats dans le sol via cette méthode. Cela est aussi vrai pour l'anticorps monoclonal ciblant la glomaline MAb32B11, lequel est spécifique aux CMA et permet de les quantifier dans des échantillons présentant une faible concentration de matière organique, mais pas dans des échantillons environnementaux, puisque les essais Bradford et ELISA avec cet anticorps présentent tous deux des biais d'interférence (l'antigène s'attache aux composés organiques et n'est pas relâché lors de l'extraction des protéines) et de rétention (les composés solubles du sol s'attachent aux parois de la microplaque de titrage en déplaçant l'antigène d'intérêt)⁷⁹. De plus, la glomaline n'est pas nécessairement représentative de l'abondance de CMA dans le sol et sa production est affectée par plusieurs facteurs⁵.

Les isozymes sont des versions différentes d'une enzyme ayant la même fonction dans différents types de cellules. Leur usage est suggéré pour l'identification des espèces²

et possiblement pour l'estimation de la biodiversité des CMA⁸⁰. La méthode traditionnelle pour détecter les isozymes spécifiques est d'extraire les protéines d'un échantillon, de les faire migrer sur gel de polyacrylamide et d'utiliser des marqueurs ciblant les isozymes d'intérêt après la migration⁷³. Par contre, la transcription des isozymes dépend de l'activité de l'organisme, elles ne permettront la détection que des CMA actifs. Le degré d'activité d'une spore ne reflète pas nécessairement sa viabilité. À cause de ce facteur limitant, les isozymes sont impropres à la quantification des CMA⁸¹.

En 1995, Graham s'intéresse à la grande teneur en lipides à l'intérieur des spores de CMA. En effet, l'apparition de la chromatographie en phase gazeuse ouvre la porte à l'étude des profils d'acides gras méthyl-ester (en anglais, «FAME profiles», pour «Fatty Acids Methyl Ester» profiles). C'est ce qui a permis de découvrir l'acide gras 16:1 ω 5 cis, spécifique aux CMA⁸². Les profils FAME ont été utilisés pour caractériser les populations microbiennes du sol⁸³⁻⁸⁵. Il s'agit d'un outil pratique pour quantifier la biomasse des CMA dans le sol^{86,87}, mais ne saurait être utilisé pour la quantification d'un isolat de CMA en particulier⁸⁸, puisqu'il ne les distingue pas entre eux.

Parmi les composants de la paroi cellulaire, l'ergostérol, un stérol spécifique aux champignons, a déjà été utilisé pour mesurer la biomasse fongique dans le sol⁸⁹. Or, il s'avère que les CMA n'en contiennent pas^{90,91}, et que l'ergostérol ne peut donc être utilisé pour la quantification et l'identification des *Glomeromycota* dans le sol.

Identification et quantification moléculaire des CMA

L'identification moléculaire se base sur les séquences d'acides nucléiques des CMA et nécessite de connaître les polymorphismes de séquences génomiques entre les espèces, et entre les isolats d'une même espèce. Le développement de marqueurs moléculaires spécifique à une espèce de CMA est un processus dynamique qui doit être révisé chaque fois que de nouvelles séquences sont rendues disponibles⁶⁶. Il existe plusieurs techniques basées sur l'amplification de l'ADN pour distinguer les CMA les uns des autres. Parmi ces techniques, on retrouve: l'amplification de marqueurs dominants [le «Random Amplified Polymorphic DNA»(RAPD), l'«Amplified fragment length polymorphism» (AFLP)], et co-dominants [le RFLP (Restriction Fragment Length

Polymorphism), le «Denaturing Gradient Gel Electrophoresis» (DGGE) et le SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), l'«Inter Simple Sequence Repeat» (ISSR)]⁹²; le séquençage de régions nucléaires et / ou mitochondriales.

Les marqueurs dominants permettent l'analyse de tous les allèles d'un gène en même temps, alors que les marqueurs co-dominants ne permettent que l'analyse d'un allèle. Ainsi les marqueurs dominants ne permettent pas de distinguer les homozygotes dominants des hétérozygotes, alors que les marqueurs co-dominant le peuvent⁹³. Ces techniques permettent de découvrir le polymorphisme entre les espèces et les isolats par le patron de bandes obtenu lorsque l'ADN est amplifié avec des amorces aléatoires dans le cas du RAPD⁶¹, avec des amorces ciblant les sites de liaison des enzymes de restriction dans le cas de l'AFLP⁹⁴, des agents dénaturants dans le cas du DGGE⁹⁵ et avec des amorces microsatellites dans le cas de l'ISSR⁹⁶. Le RFLP permet également d'observer le polymorphisme entre les patrons de bandes lorsque l'ADN d'un isolat est digéré par des enzymes de restriction⁹⁷, alors que le SSCP permet d'observer le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin d'une séquence de nucléotides⁹⁸. Le séquençage des bandes obtenues par ces méthodes a permis de créer les banques génomiques de CMA⁹⁹.

En 1996, Abbas a utilisé le RAPD pour amplifier des séquences d'ADN de diverses souches de CMA par PCR, afin de détecter le polymorphisme interspécifique entre *Funneliformis mosseae* et *Gigaspora margarita*^{61,99}. Gadkar & al.¹⁰⁰ ont aussi utilisé le RAPD sur la séquence M13 des microsatellites pour détecter le polymorphisme dans les spores de *G. margarita* et *Gigaspora gigantea*. En 1997, Rosendahl et al.¹⁰¹ ont utilisé l'AFLP pour étudier les variations inter- et intra-spécifiques à partir de spores individuelles, mettant ainsi en évidence les variations génétiques au sein d'un même individu. La technique de l'ISSR a été utilisée en 2008 pour tester les associations des différents haplotypes de CMA avec différents hôtes pour conclure que les hôtes privilégiaient bel et bien les interactions avec certains haplotypes des CMA⁶³.

L'identification d'un isolat grâce au polymorphisme de séquence nécessite un codage à barres moléculaire⁶⁸. Il est important de distinguer le codage à barres moléculaire de l'analyse phylogénétique¹⁰². Alors que l'analyse phylogénétique sert à comprendre les relations évolutives entre les espèces, le codage à barres moléculaire est

un outil de diagnostic¹⁰². Ces deux techniques requièrent des marqueurs moléculaires, des amorces PCR ayant un site de liaison commun à toutes les espèces ciblées et dont la séquence entre les amorces assez variable entre les espèces. Les gènes codant pour l'ARN ribosomal sont parmi les marqueurs les plus fréquemment utilisés en phylogénie des CMA. Chez les eucaryotes, l'ADNr est répété en tandem et comprend la 5S, la 5.8S, la 18S et la 25S, entre lesquelles se trouvent les ITS (Internal Transcribed Spacer)^{103,104}. Pour plusieurs espèces de champignons, ces séquences sont devenues disponibles dans les bases de données de séquences d'ADN vers le début des années 1990. Chez les champignons, les séquences de 5.8S, 18S et 25S sont plutôt conservées tandis que les séquences des ITS sont plus variables^{103,104}. Au début des années 90, la séquence conservée des unités 18S et 28S a servi de modèle pour la conception des amorces ITS1-F et ITS4, qui sont les amorces les plus utilisées en mycologie¹⁰⁵. En 1997, Redecker et al. ont utilisé la PCR avec les amorces ITS1-F et ITS4 en RFLP sur divers taxa de CMA, ce qui leur a permis d'identifier certaines espèces de CMA¹⁰⁶. Cependant, les ITS présentent une grande hétérogénéité de séquence d'ADN au sein d'un même individu^{34,53,63,104,107-110} et cette variabilité peut être plus grande au sein d'une spore qu'au sein de toutes les spores d'une communauté¹⁰⁸. C'est la variabilité des séquences ITS qui en font de si bons codages à barres moléculaires, mais cette hétérogénéité des ITS au sein d'un même individu est problématique en quantification.

Durant les mêmes années, la séquence d'ADN nucléaire codant pour la petite sous-unité ribosomale (SSU-ADNr) a intéressé les chercheurs, et l'amorce VANS1 a été développée sur une région conservée de cette séquence¹¹¹. Cette région devait servir d'ADN code-barre, mais il s'est avéré que son site de liaison n'était pas conservé pour tous les groupes de CMA⁵⁹. Helgason et al.¹⁵ ont aussi tenté de développer des amorces CMA-spécifiques sur la SSU-ADNr. Malheureusement, le site des amorces NS31 et AM1 est absent chez certaines espèces de CMA¹⁰⁹. Ces amorces amplifient des séquences qui ne correspondent pas toujours à des CMA⁶⁶ et la phylogénie obtenue ne résout pas les liens entre les espèces proches¹⁰⁹. C'est sur la base de la SSU-ADNr que Schübler et al. ont démontré que les *Glomeromycota* constituaient un groupe monophylétique parmi les champignons²⁵. En 2008, Lee et Young ont développé des amorces AML1 et AML2, spécifiques aux CMA et ciblant la SSU-ADNr. Ces amorces

reconnaissent tous les CMA publiés en 2008, sauf *Archaeospora trappei*. Cependant, la SSU-ADNr ne résout pas les relations phylogénétiques au niveau inter-isolats³. Pour cibler un isolat de CMA en particulier, une bonne séquence d'ADN code-barre est une séquence délimitée par des régions conservées et contenant assez d'éléments variables pour permettre la distinction des espèces et des isolats. À ce jour, la séquence ITS seule présente une trop forte hétérogénéité au sein d'un même isolat, et la SSU-ADNr seule n'est pas assez variable pour résoudre les liens entre les isolats¹¹². La séquence nucléaire codant pour la grande sous-unité ribosomale (LSU-ADNr) a également servi en tant qu'ADN code-barre pour la phylogénie des CMA¹¹³, puisqu'elle présente un degré de variabilité intermédiaire, plus variable que la SSU-ADNr mais moins que les ITS¹¹⁴. Récemment, des amorces basées sur les séquences de la LSU-ADNr pouvant reconnaître tous les isolats de CMA ont été découvertes¹¹⁵. Auparavant, ce type d'amorces avait toujours exclu quelques isolats^{3,116}.

Des gènes codant pour des protéines ont été également séquencés. Parmi ceux-ci, on compte la β -tubuline¹¹⁷, les sous-unités 1 et 2 de la polymérase d'ARN II, la H+ ATPase, le transporteur de phosphate, le facteur d'élongation Efl alfa etc¹¹⁸. Toutefois, l'amplification de ces régions pour tous les CMA nécessite plusieurs paires d'amorces différentes⁴⁶.

L'utilisation de l'ADN nucléaire en tant que marqueur pour identifier et quantifier les CMA est fortement discutée. Cela est dû à l'état coenocytique et hétérocaryotique de ces organismes. En effet, les spores d'une même espèce ne présentent pas toutes le même nombre de noyaux¹¹⁹. Un marqueur conçu sur une séquence d'ADN nucléaire ne pourra donc pas servir à la quantification, car le nombre de copies de marqueur nucléaire ne pourrait être représentatif du nombre de spores présent dans un échantillon. En effet, Sander & al. (1995)⁵³ mettent en évidence la variabilité génétique de la séquence ITS au sein d'une même spore. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La première, soutenue par Kuhn et al. en 2001¹²⁰, veut que les noyaux soient haploïdes et différents au sein d'une même spore. L'utilisation de sondes ciblant deux séquences différentes de ITS2 en hybridation *in situ* a permis de déterminer que les noyaux d'une même spore pouvaient contenir les deux séquences, à des fréquences différentes selon la spore, ce qui vient

appuyer l'hypothèse de l'hétérocaryotie. La seconde hypothèse, soutenue par Pawlowska et Taylor (2004)¹²¹, implique que les CMA soient polyploïdes et homocaryotiques. Ils en sont venus à cette conclusion en séquençant le groupe de gènes PLS1 de noyaux micro-disséqués d'une même spore mère et de ses spores filles. Les 5 spores filles contenaient toutes le groupe PLS1 et ses 13 variantes, ce qui suggère que les noyaux étaient polyploïdes N=13, car si les noyaux avaient été haploïdes, il y avait peu de chances que les treize variantes soient transmises aux spores filles¹²¹. Cette hypothèse est soutenue par Stuckenbrock et Rosendahl (2004)¹²², qui ont utilisé les introns des protéines GmFOX2, GmTOR2 ainsi que GmGM1 comme marqueurs co-dominants en nested-PCR suivi de SSCP pour caractériser les génotypes présents dans des spores uniques de 3 espèces en 2004. Par contre, en 2005, Hijri et Sanders¹²³ ont quantifié le nombre de copies de PLS par noyau pour conclure que les noyaux sont bel et bien haploïdes et hétérocaryotiques. En 2010, Boon et al.¹²⁴ ont démontré, à l'aide des séquences des protéines PLS et de la LSU-ADNr, que les variantes sont toutes transcrites et que pour LSU-ADNr, toutes les variantes sont fonctionnelles, tandis que pour les protéines PLS, deux variantes existent, PLS1, laquelle est un pseudogène, et PLS2, la variante fonctionnelle. Par conséquent, certaines protéines sont aux prises avec le même problème d'hétérogénéité qui nuit au développement de marqueurs moléculaires de quantification. De plus, peu de taxons ont été évalués chez les CMA avec des marqueurs ciblant des protéines¹²².

En 2008, le premier génome mitochondrial de l'un des isolats de *G. intraradices* a été publié par Lee et Young⁶⁶. Selon un article publié par Raab et al. en 2005¹²⁵, le génome mitochondrial des CMA ne présenterait pas la même hétérogénéité intra-spécifique et intra-isolat que le génome nucléaire. Le génome mitochondrial est un génome circulaire à copies multiples¹²⁶ composé à 37% de G+C¹²⁷. Le fait que les séquences obtenues par ces auteurs soient plutôt homogènes constitue un indice supplémentaire de l'absence de variation intra-isolat observée précédemment par Raab et al. (2005)¹²⁵ sur le génome mitochondrial. Cette homogénéité donne aux chercheurs l'espoir de pouvoir développer un marqueur basé sur une séquence du génome mitochondrial qui permettrait la quantification des CMA.

La séquence de mtLSU a été utilisée en nested-PCR pour le traçage d'inoculum de *Glomus irregulare* par Sykorova et al. en 2012¹²⁸, ce qui leur a permis de conclure que ce CMA était plus présent dans les sols inoculés que dans les sols contrôles. Cette séquence est également celle qui présente la plus grande résolution phylogénétique niveau intra-spécifique¹²⁹. En 2012, une étude sur la compétition entre deux isolats de *G. intraradices* a été menée en comparant les résultats de qPCR utilisant des marqueurs basés sur la mtLSU et sur l'ADN ribosomal nucléaire¹²⁹. Ces marqueurs ont permis de découvrir une baisse du nombre de copies chez l'un des isolats, alors que les marqueurs basés sur l'ADN ribosomal n'ont pas détecté la co-existence des deux isolats. Le génome mitochondrial constitue donc une nouvelle cible potentielle de marqueurs moléculaires isolats-spécifiques et il devient ainsi possible de quantifier la présence d'isolats, que ce soit dans les racines ou dans le sol. Toutefois, si le génome mitochondrial permet le développement de marqueurs isolats-spécifiques, il n'est pas exempt de faiblesses. Bien que les mitochondries soient réparties de manière homogène chez les champignons filamenteux¹²⁹, leur nombre n'est pas constant et certaines irrégularités ont été observées, telles que la concentration d'un nombre accru de mitochondries à l'extrémité d'une hyphes ou au sein d'une spore en germination¹²⁹. Le traitement du sol et la date de récolte ont un impact sur le nombre de copies de gène nucléaire et de gène mitochondrial retrouvé dans les spores d'un CMA¹²⁹. Par contre, il semble que le ratio entre le nombre de copies de gène mitochondrial par rapport au nombre de copies de gène nucléaire soit plutôt constant à travers les récoltes¹²⁹. Il ne faut pas oublier le fait que de nombreux organismes présentent des éléments mobiles mitochondriaux dans leurs génomes nucléaires^{130,131}. Par conséquent, les marqueurs conçus à partir de séquences de génomes mitochondriaux doivent tout de même subir un test de spécificité pour s'assurer que les séquences mitochondriales considérées spécifiques à une espèce ne reconnaissent pas le génome nucléaire d'autres espèces.

L'ADN mitochondrial est caractérisé par un taux d'évolution très rapide. Par conséquent, il accumule de nombreuses mutations, des remaniement chromosomiques et la présence d'éléments mobiles¹³¹⁻¹³³. Les cellules contiennent plusieurs génomes mitochondriaux, et les génomes mitochondriaux peuvent se répliquer plus d'une fois par cycle cellulaire et être transmis de manière différentielle aux cellules filles¹³². Le nombre

de mitochondries présentes dans une spore dépend du niveau d'activité de celle-ci, et peut donc être variable¹³⁴. Les études phylogénétiques utilisent généralement les séquences homologues d'un gène pour inférer les relations phylogénétiques. L'obtention de génomes mitochondriaux permet de pouvoir évaluer les relations phylogénétiques en utilisant plusieurs gènes (phylogénomique) et en se basant aussi sur l'ordre de ces gènes plutôt que sur les séquences des gènes individuels¹³⁵. Les mutations ponctuelles peuvent être neutres ou peuvent affecter la fonction d'un gène¹³⁵. En 1997, un vaste projet de séquençage de génome mitochondriaux fongique a été entrepris, le "Fungal Mitochondrial Genome Project" (FMGP), afin d'éclaircir les relations phylogénétiques entre les champignons¹³⁶.

Récemment, notre laboratoire a séquencé 12 génomes mitochondriaux de CMA. La taille du génome mitochondrial varie de 59 kb à 97 kb¹³⁷. Ces génomes ont été annotés et les séquences géniques et inter-géniques ont été alignées. Ce faisant, nous avons découvert que les gènes mitochondriaux n'apparaissent pas dans le même ordre chez toutes les espèces et isolats séquencés. Ainsi, les régions inter-géniques peuvent être spécifiques à certaines espèces, comme c'est le cas chez *G. cerebriforme*. Cette variabilité au sein des séquences d'ADN mitochondriales des diverses espèces permet le développement de marqueurs spécifiques.

Problématique

G. cerebriforme DAOM227022 et *G. irregulare* DAOM197198 sont des isolats qui se développent très bien dans des sols saturés en phosphore. C'est pourquoi leur intérêt en agriculture est indiscutable. Toutefois, il n'existe à ce jour aucune méthode qui permette à la fois de les identifier spécifiquement et de les quantifier avec précision dans le sol et dans les inoculants commerciaux.

Objectif

L'objectif général de mon projet de maîtrise est de développer des marqueurs moléculaires pour l'identification et la quantification de *Glomus cerebriforme* isolat DAOM227022 et de *Glomus irregulare* isolat DAOM197198. Le développement de ces marqueurs permettra de quantifier la présence de ces espèces dans des produits commerciaux et d'assurer un suivi de l'inoculation en champs, dans le sol et dans les racines des plantes. De plus, la méthode du développement de ces marqueurs pourra être appliquée à d'autres taxons de CMA. Ces marqueurs pourront être utilisés dans des études des structures des communautés des CMA et de leur écologie, ce qui pourrait améliorer les connaissances sur la biologie, la fonction des CMA et leur interaction avec des plantes et d'autres microorganismes du sol. Les objectifs spécifiques de mon mémoire de maîtrise sont les suivants:

- **Objectif 1** – Développement, test de spécificité et validation des marqueurs de PCR quantitative (amorces et sondes TaqMan) en utilisant des alignements de séquences géniques et des inter-géniques mitochondriales des CMA d'intérêt et ceux dont le génome mitochondrial est disponible.
- **Objectif 2** – Développement de la méthode de quantification de *G. cerebriforme* DAOM227022 (détermination du nombre de copies du marqueur par spore).
- **Objectif 3** – Application de la méthode de quantification dans des échantillons de sol et racines provenant d'essais d'inoculation mycorhizienne en serres.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture *in vivo* et *in vitro* des CMA

Les CMA ont été cultivés *in vitro* sur milieu M (1% sucrose; 0,4% Gel Gro; 1% macroéléments; 1% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1% NaFe EDTA; 1% microéléments; 1% KI.) avec des racines de carottes modifiées à l'ADN-ti, lequel provient de la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, qui leur confère un morphotype chevelu^{29,51,52,138}. Comme il s'agit d'organismes symbiotiques, la culture des CMA est impossible sans une plante hôte. C'est pour cela que le milieu M est inoculé avec des CMA et avec des racines de carotte modifiées. Les cultures *in vitro* de CMA sont conservées dans un incubateur à 25°C.

La culture *in vivo* des CMA s'est déroulée dans les serres de Biopterre à La Pocatière. Cette partie de l'expérience était prise en charge par le Dr. Younes Machrafi de Premier Tech. Au moment de la semence des deux types de plantes hôtes, la pomme de terre et le soya, 10 types d'inoculation ont été appliqués. Les types d'inoculation sont considérés comme des traitements. Les traitements qui font l'objet de ce mémoire sont présentés au tableau 1. Les plants ont été semés dans des pots en plastique de 1 litre ayant 12 cm de diamètre et de 12 cm de profondeur contenant un sol riche en phosphore. Les plants de pommes de terre ont été entretenus à l'aide d'un engrais à faible teneur en phosphore soit le 20-2-20 suivi du 20-20-20 à partir de la troisième semaine. De l'engrais granulaire 0-20-0 a été utilisé pour le soya à partir de la troisième semaine et au besoin par la suite. Le dosage des engrais est un paramètre optimisé par Premier Tech et demeure confidentiel. La culture des plants a duré de 6 à 8 semaine, selon la croissance des plants. Pour chaque traitement, six pots contenant un plant de soya et six pots contenant un plant de pomme de ont été préparés. L'inoculation a été un succès pour certains pots, mais pas tous (voir tableau 1).

Tableau 1. Représentation des traitements de l'expérience en serre de Biopterre.

Traitement	Description	Nombre de pots sur les 10 pots par traitement qui présentent de la colonisation racinaire	
		Patate	Soya
1	Témoin négatif (pas d'inoculation)	3	5
2	Inoculation initiale de 100 spores de DAOM197198	4	4
3	Inoculation initiale de 50 spores de DAOM197198	3	5
6	Inoculation initiale de 50 spores de DAOM197198 et de 50 spores de DAOM220722	3	5
10	Inoculation initiale de 50 spores de DAOM220722	3	4

Récolte et conservation des échantillons de spores produites *in vitro* et *in vivo*

Afin de prélever les spores produites *in vitro*, le gel ne contenant que les spores et le mycélium est découpé en conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Il est déposé dans un bécher de 1L contenant un agitateur magnétique, dans lequel du tampon sodium citrate - acide citrique (acide citrique 0,18 mM; sodium citrate 0,82 mM) est ajouté⁵². En plaçant le bécher sous agitation magnétique à vitesse moyenne, le tampon dissout le gel en environ 40 minutes. Les spores sont ensuite recueillies par filtration sur un tamis cellulaire stérile de 40 µm (Fisher, QC).

Les suspensions de spores en milieu *simple* (eau et spores) et en milieu *complexe* (eau, spores et fragments de racines) ont été fournies par Premier Tech. Elles ont été conservées dans des tubes Falcon de 15 mL à 4°C. La récolte des échantillons à partir de ces suspensions se fait par simple pipetage avec un embout tronqué, sous hotte à flux laminaire, avec agitation magnétique de la suspension. Il suffit de pipeter le volume de suspension correspondant au nombre de spores souhaité selon la coloration MTT. Une méthode alternative consiste à déposer des gouttes de 300 µL de suspension sur une boîte de Petri à fond quadrillé sous le binoculaire, suivi du pipetage des spores une à une jusqu'à ce que le nombre de spores souhaité ait été prélevé. Toutefois, à chaque pipetage,

l'embout utilisé doit être également vérifié sous le binoculaire, afin d'assurer qu'aucune perte de spores ne se produise et que le nombre de spores qui se trouvent dans l'échantillon soit bien celui ayant été pipeté. Cette méthode de préparation des échantillons sera appelée méthode de compte sans coloration.

Pour la récolte de spores *in vivo*, le sol est prélevé et contenu dans des sacs *ziplock* fermés, et conservés à -20°C. Les étapes de séparation des spores du sol sont décrites dans la section «Préparation des échantillons à partir du sol et des racines des essais en serre». Les racines de chaque plant ont été prélevées, nettoyées et préservées à -20°C également. Ces éléments ont été congelés ainsi pendant plusieurs mois.

Coloration MTT

Il est possible de déterminer un nombre de spores viables contenu par mL de suspension en milieu complexe et en milieu simple. En effet, il suffit de colorer un élément cellulaire qui est présent chez les cellules viables et absent chez les cellules mortes. Plusieurs types de coloration des spores ciblent des enzymes qui sont dégradées rapidement lorsque l'organisme meurt. Par exemple, la coloration tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) est transformée en formazan, sa forme mauve et insoluble, par les enzymes oxydoréductases NAD(P)H-dépendantes cellulaires cytosoliques¹³⁹.

Des échantillons des suspensions de DAOM197198 et de DAOM220722 sont colorées au MTT, afin de déterminer un nombre de spores viables/mL de suspension. Les suspensions de DAOM197198 et de DAOM220722 sont conservées dans des bouteilles de verres de 100 mL qui contiennent également un agitateur magnétique. Sans agitation, les spores se déposent au fond de la bouteille, et la suspension n'est pas homogène. Sous hotte, trois prélèvements de 100 µL d'une suspension agitée magnétiquement sont réalisés à l'aide d'une pipette P200 à l'embout tronqué dans trois tubes 1,5 mL. À ces prélèvements sont ajoutés 100 µL d'une solution de 0,5% MTT, puis le tout est incubé à 27°C pour 28h. Au terme des 28h, le contenu de chaque tube est déposé sur un verre dépoli sous lequel est collé un acétate quadrillé. Ce montage est ensuite observé sous le binoculaire. Cette méthode permet de compter le nombre de spores viables contenu dans chacun des trois prélèvements d'une suspension donnée¹³⁹. La moyenne du nombre de spores viables dans les trois prélèvements permet de connaître le nombre moyen de

spores viables/100 μL de la suspension. À partir de ces concentrations en spores viables, il est possible de calculer le volume de chaque dilution à prélever pour avoir les nombres de spores requis pour la préparation des échantillons.

Calcul du volume à prélever de la dilution 1 pour avoir 1 échantillon de 600 spores:

Concentration de spores dans la suspension 1: $75 \text{ spores}/100\mu\text{L} = 0,75 \text{ spores}/\mu\text{L}$

Si C = Concentration de spores dans la suspension 1, où N = nombre de spores de l'échantillon de la gamme étalon et où V = le volume de la suspension 1, alors*

$$C = \frac{N}{V}, \text{ donc } 0,75 \text{ spores}/\mu\text{L} = \frac{600 \text{ spores}}{V} \text{ donc } V = 800\mu\text{L}$$

Ainsi, pour avoir un échantillon de 600 spores, il faut prélever 800 μL de la suspension 1.

**Gamme étalon: il s'agit d'échantillons de différents nombre de spores d'un même isolat, qui servent de référence pour déterminer un nombre de mitochondries par spores grâce au marqueur moléculaire.*

Préparation des échantillons à partir du sol et des racines des essais en serre

200 g de sol de chaque traitement sont filtrés à l'aide de tamis permettant de retenir les plus petites spores de DAOM220722 (taille des spores entre 25 et 80 μm)⁵⁸ et les plus grandes spores de DAOM197198 (taille des spores entre 70 et 165 μm selon le site web de la collection INVAM¹⁴⁰). Les tamis utilisés sont donc un tamis de 250 μm pour retenir les grosses particules, un tamis de 180 μm pour laisser passer les plus grandes spores de DAOM197198 et un tamis de 20 μm pour retenir toutes les spores ayant traversé les deux tamis précédents. Ces fractions fines de sol sont ensuite incubées à 60°C pour 15-18h, afin de les assécher. Le poids des fractions fines sèches est pris en note. De ces fractions fines, des échantillons de 250 mg et des échantillons de 10 g sont prélevés. Les échantillons de 250 mg sont conservés dans des tubes 1,5 mL, et les échantillons de 10 g sont conservés dans des tubes Falcon de 50 mL à -20°C. Le reste de la fraction fine est également conservé à -20°C.

Également pour chaque pot de chaque plante et de chaque traitement, 400 mg de racines aléatoirement prélevées sont broyées à l'azote liquide. Des échantillons de 20 mg de la poudre ainsi obtenue sont prélevés dans des tubes 1,5 mL et conservés à -20°C.

Extraction d'ADN

Afin de déterminer la meilleure trousse d'extraction d'ADN du sol, trois trousse ont été comparées, soient la *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Mo Bio, CA), la *NucleoSpin soil kit* (Macherey-Nagel, BioLynx ON) et la *E.Z.N.A DNA isolation kit*.

Les échantillons récoltés à partir de suspension de spores sont extraits à l'aide du *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Mo Bio, CA), selon les directives du manufacturier, à l'exception de quelques modifications. En effet, plutôt que d'être directement déposés dans le tube *Powerbead*, les échantillons sont resuspendus dans 400 μL du liquide de ces tubes, avant d'être transférés dans des tubes à billes de céramique de diamètre 1,4 mm (Mo Bio, CA), auquel 25 mg de célite ont été préalablement ajoutés. La célite sert d'abrasif, afin d'optimiser la lyse des spores. Pour ce qui est de l'homogénéisation, plutôt que d'être agités par vortex à l'aide du Mo Bio *Vortex Adapter tube holder* pendant 10 minutes à vitesse maximale, les échantillons sont homogénéisés soit dans l'agitateur *Precellys 24* réglé à trois agitations de 15 secondes à 5000 rpm, soit dans le dans le *FastPrep FP120* (Thermo, ON) pour 3 homogénéisations de 20 secondes à vitesse 4. Le reste de l'extraction d'ADN se déroule tel qu'indiqué dans les recommandations du manufacturier.

L'ADN d'échantillons de sol a également été extrait à l'aide du *NucleoSpin soil kit* (Macherey-Nagel, BioLynx ON) selon les recommandations du manufacturier, à l'exception de quelques modifications. En effet, pour chaque échantillon, un tube à billes Nucleospin est préparé avec 25 mg de célite pour favoriser la lyse, et 70 μL de lait (0,2% lait en poudre) pour minimiser l'effet inhibiteur des acides humiques¹⁴¹. De plus, au moment de les transférer dans leur tube à billes respectif, les échantillons de sol et les témoins sont resuspendus dans 700 μL de solution SL1. La solution ajoutée à l'échantillon de sol est alors mélangée par pipetage, et 350 μL est alors transféré dans le tube à billes. Sans changer l'embout de pipette, les 350 μL restant sont mélangés par pipetage pour homogénéiser le mélange, puis transférés dans le tube à billes. Cette précaution a pour but d'éviter que des spores adhèrent aux parois du tip, occasionnant ainsi une perte qui pourrait fausser les résultats. À l'étape de la lyse également, plutôt que d'homogénéiser les échantillons par agitation au vortex à température ambiante pour 5 minutes à vitesse maximale, les échantillons subissent une première agitation de 3 oscillations/ secondes pour 15 minutes au Tissue-Lyser de QIAgen, afin d'homogénéiser doucement le mélange, puis subissent 3 homogénéisations de 20 secondes à vitesse 4 au *FastPrep FP120* (Thermo, ON), ce qui est un procédé efficace pour lyser des spores. Le reste de l'extraction se déroule selon le protocole décrit dans le manuel d'utilisation.

Le *E.Z.N.A DNA isolation kit* (Omega Biotech, Canada) a également servi à l'extraction d'ADN des échantillons de spores en suspension. À l'exception de l'homogénéisation, qui se fait dans 350 µL de GTC Lysis buffer dans un tube à billes de céramique 1,4 mm de chez Mo Bio (cat. no. 13113-S) dans le *FastPrep FP120* de chez Thermo Savant pour 3 homogénéisation de 20 secondes à vitesse 4, les étapes du manuel de protocole ont été suivies à la lettre.

Finalement, les échantillons de racines ont été extraits selon les instructions du manuel du *DNeasy plant mini kit* de chez QIAgen^{34,104}.

Alignement des gènes et inter-gènes mitochondriaux

Nous avons utilisé les génomes mitochondriaux (ADNmt) de 11 isolats de CMA de différentes espèces^{127,137,142}. Les séquences des ADNmt ont ensuite été analysées dans le but de détecter des caractéristiques uniques à chaque espèce d'intérêt (DAOM220722 et DAOM197198) et pouvant servir de cible potentielle pour développer des amorces et sondes spécifiques. L'ordre des gènes est un caractère fort intéressant qui a été utilisé pour des fins de comparaison des CMA. Cette comparaison des ADNmt en format FASTA a été faite dans le logiciel *Textpad*. Elle permet de discerner les génomes présentant des ordres de gènes mitochondriaux uniques à leur espèce (Voir tableau 2). C'est le cas de *G. cerebriforme*, qui est l'unique espèce, parmi celles dont nous avons les séquences du génome mitochondrial entier, à présenter le gène *nad1* suivi directement par le gène *cox2* (tableau 1). Certains isolats sont caractérisés par la présence d'une insertion dans leur génome mitochondrial qui ne se retrouve chez aucun autre isolat. Ce type d'insertion peut servir de cible pour le développement d'un marqueur spécifique. Pour détecter ses insertions spécifiques, les séquences des gènes et des inter-gènes mitochondriaux de chaque espèce ont été alignées à l'aide du programme MUSCLE¹⁴³ sur Mega 5¹⁴⁴. *G. irregulare* (DAOM197198) présente une telle insertion (Voir figure 1.).

Tableau 2. Ordre des gènes mitochondriaux chez diverses espèces et isolats de CMA. N.B. L'ADN mitochondrial se présente la plupart du temps sous forme d'une molécule circulaire et le premier gène est conventionnellement *rnl*. En rouge est encadrée la série de gène *nad1-cox2*, unique à *G. cerebriforme*.

<i>Glomus irregulare</i> DAOM213198	<i>Glomus irregulare</i> DAOM234328	<i>Glomus irregulare</i> DAOM240415	<i>Glomus irregulare</i> , DAOM197198	<i>Glomus irregulare</i> , DAOM234179	<i>Glomus aggregatum</i> DAOM240163	<i>Glomus fasciculatum</i> DAOM227127	<i>Glomus sp.</i> DAOM240422	<i>Glomus diaphanum</i> DAOM229456	<i>Glomus Cerebriforme</i> DAOM227022	<i>Gigaspora Rosea</i> DAOM194757
<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>	<i>rnl</i>
<i>atp6</i>	<i>cox2</i>	<i>cox2</i>	<i>cox2</i>	<i>cox2</i>	<i>cox2</i>	<i>cox2</i>	<i>cox2</i>	<i>cox2</i>	<i>nad2</i>	<i>nad4</i>
<i>nad2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp8</i>	<i>atp8</i>	<i>atp8</i>	<i>atp8</i>	<i>atp8</i>	<i>atp8</i>	<i>atp8</i>	<i>nad3</i>	<i>cox1 (rev)</i>
<i>nad3</i>	<i>atp9</i>	<i>atp9</i>	<i>atp9</i>	<i>atp9</i>	<i>atp9</i>	<i>atp9</i>	<i>atp9</i>	<i>atp9</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>
<i>nad6</i>	<i>rns (rev)</i>	<i>rns (rev)</i>	<i>rns (rev)</i>	<i>rns (rev)</i>	<i>atp6</i>	<i>rns</i>	<i>cox1</i>	<i>rns (rev)</i>	<i>nad6</i>	<i>cox3</i>
<i>cox3</i>	<i>nad5</i>	<i>nad5</i>	<i>nad5</i>	<i>nad5</i>	<i>nad2</i>	<i>nad5</i>	<i>atp6</i>	<i>nad5</i>	<i>rns</i>	<i>rns</i>
<i>rns (rev)</i>	<i>cob</i>	<i>cob</i>	<i>cob</i>	<i>cob</i>	<i>nad3</i>	<i>cob</i>	<i>nad2</i>	<i>cob</i>	<i>nad5</i>	<i>cob</i>
<i>nad5</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4</i>	<i>nad6</i>	<i>nad4</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad1</i>
<i>cob</i>	<i>nad1</i>	<i>nad1</i>	<i>nad1</i>	<i>nad1</i>	<i>cox3</i>	<i>nad1</i>	<i>nad6</i>	<i>nad1</i>	<i>nad4 (rev)</i>	<i>nad2</i>
<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad4L</i>	<i>rns (rev)</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4L</i>	<i>atp6 (rev)</i>	<i>atp9</i>
<i>nad1</i>	<i>cox1</i>	<i>cox1</i>	<i>cox1</i>	<i>cox1</i>	<i>nad5</i>	<i>cox1</i>	<i>rns</i>	<i>cox1</i>	<i>atp9</i>	<i>nad6</i>
<i>nad4L</i>	<i>atp6</i>	<i>atp6</i>	<i>atp6</i>	<i>atp6</i>	<i>cob</i>	<i>atp6</i>	<i>nad5</i>	<i>atp6</i>	<i>nad1</i>	<i>nad5</i>
<i>cox1</i>	<i>nad2</i>	<i>nad2</i>	<i>nad2</i>	<i>nad2</i>	<i>nad4</i>	<i>nad2</i>	<i>cob</i>	<i>nad2</i>	<i>cox2</i>	<i>cox1</i>
<i>cox2</i>	<i>nad3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad1</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad3</i>	<i>cob</i>	<i>atp6</i>
<i>atp8</i>	<i>nad6</i>	<i>nad6</i>	<i>nad6</i>	<i>nad6</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad6</i>	<i>nad1</i>	<i>nad6</i>	<i>atp8</i>	<i>nad3 (rev)</i>
<i>atp9</i>	<i>cox3</i>	<i>cox3</i>	<i>cox3</i>	<i>cox3</i>	<i>cox1</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox3</i>	<i>cox3</i>	-

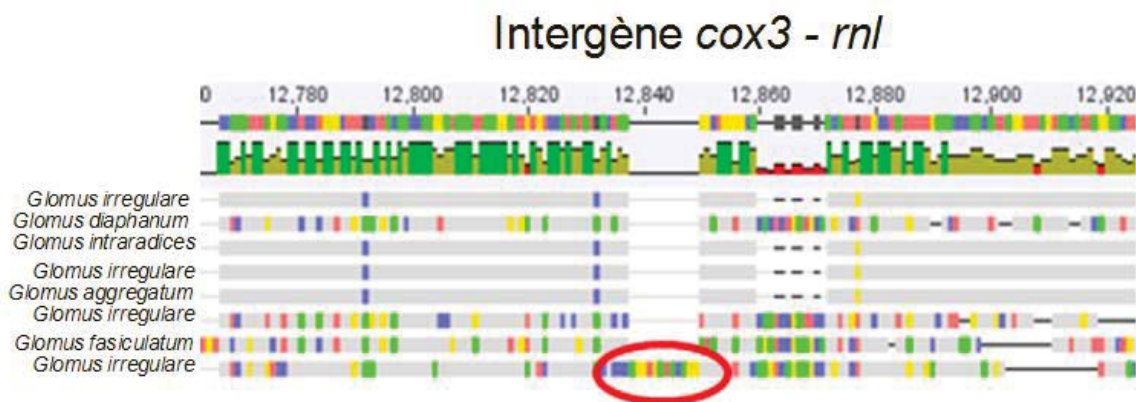


Figure 1. Alignement de l'intergène *cox3-rnl* des espèces présentant cet ordre de gènes. En rouge est encadrée l'insertion spécifique à *G. irregulare* DAOM197198.

Conception d'amorces et de sonde Taqman spécifique à DAOM220722 et à DAOM197198

Les amorces et la sonde ont été développées en utilisant le logiciel *Primer Express* v3.0.1 (Life Technologies). Elles sont présentées au tableau 3. Leur spécificité a été testée en PCR sur une vaste gamme d'espèces et d'isolats de CMA, présentés dans le tableau 4.

Tableau 3. Caractéristiques des amorces et des sondes ciblant DAOM220722 et DAOM197198.

Cible	Nom des amorces	Séquence des amorces	Taille du fragment (bps)
<i>G.cerebriforme</i> (DAOM227022), intergène Nad1-Cox2	CerebF CerebR CerebProbe	5'-CTCGTAGCTCTTGAAATTACACCT-3' 5'-TGGTATTGAATAGGAATCTAAGCA-3' 5'-TAGTCATCAAGATTATGAGCCCTTAGAT-3'	148
<i>R.Irregularis</i> (DAOM197198), Intergène Cox3-Rnl	GI PRF GI PRR GI PRProbe	5'-CCCACCAGGGCAGATTAATC-3' 5'-TGGCTTTGTACAGGCAACAG-3' 5'-CCCTGGAGTATCTG-3'	106

Tableau 4. Collection de l'IRBV (lesquelles proviennent de chez GINCO¹⁴⁵) et collection de Premier Tech.

Nomenclature latine de l'espèce	Isolat	Provenance
<i>Glomus fasciculatum</i>	DAOM227127	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus diaphanum</i>	DAOM229456	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM213198	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM234328	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus etunicatum</i>	NE108A	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus mossae</i>	DAOM227131	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus aggregatum</i>	DAOM240163	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM197198	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM240415	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus clarum</i>	MUCL46238	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus clarum</i>	MUCL52335	Collection du laboratoire du Dr. Hijri de l'IRBV (GINCO)
<i>Glomus intraradices</i>	Isolat 494	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus cerebriforme</i>	DAOM227022	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus sp</i>	DAOM240422	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM234328	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus aggregatum</i>	DAOM240163	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus diaphanum</i>	DAOM229456	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM240429	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM240159	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus clarum</i>	DAOM234281	Collection des laboratoires de Premier Tech
<i>Glomus irregulare</i>	DAOM240415	Collection des laboratoires de Premier Tech
Racines de carotte	DC4	Collection des laboratoires de Premier Tech

Clonage du fragment d'ADN spécifique à DAOM220722

Le produit de la PCR du test de spécificité du marqueur de DAOM220722 est purifié à l'aide du *GeneJET PCR purification kit* (Thermo Scientific, ON) selon le guide de l'utilisateur. L'amplicon ainsi purifié est inséré dans le plasmide *pDrive Cloning Vector* du *QIAGEN PCR Cloning kit* (Qiagen, ON). Ce plasmide fait 3851 pb et contient un gène de résistance à l'ampicilline. L'insert se trouve au milieu de l'opéron *lac*, lequel permet la synthèse de l'enzyme β -galactosidase. Ce plasmide est donc approprié pour le

criblage bleu-blanc, et par conséquent, le milieu choisi est le milieu LB/X-Gal/IPTG/ampicilline (1,5% agar; 1% Bacto-tryptone; 0,5% Bacto-extrait de levure; 0,5% NaCl; 0,1 mg/mL X-Gal; 100µg/mL ampicilline; 10 mM IPTG). Le protocole requiert également du milieu LB/ampicilline liquide (1% tryptone; 0,5% extrait de levures; 0,5% NaCl; 100µg/mL ampicilline) et du milieu SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levures; 0,01M NaCl; 2,5 mM KCl; 0,02 M Mg²⁺; 0,02 M glucose).

La réaction de ligation se fait dans un volume total de 10 µL (5 ng/µL *pDrive Cloning Vector*; 1,9 ng/µL produit PCR purifié; 50% *Ligation Master Mix*) incubée 30 minutes à 4°C. Pour la réaction de transformation, les cellules compétentes *QIAGEN EZ* sont dégelées à 4°C. 2µL de la réaction de ligation sont ajoutés à un tube de cellules *QIAGEN EZ*. Le contenu du tube est ensuite mélangé délicatement, par tapotement. Le tube est ensuite incubé sur glace pendant 5 minutes. L'échantillon subit ensuite un choc thermique de 30 secondes dans un bain marie à 42°C. 200 µL de milieu SOC sont ajoutés au tube de cellules. 100 µL de la réaction de transformation ainsi obtenue est ensuite utilisé pour inoculer un pétri contenant du milieu LB/X-Gal/IPTG/ampicilline.

Une fois la transformation terminée, sous hotte à flux laminaire, des boîtes de Petri contenant du milieu LB/X-Gal/IPTG/ampicilline, sont inoculées avec les cellules transformées. Les bactéries contenant le plasmide sont celles qui poussent sur milieu LB/ampicilline, car le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline. Les bactéries dont le plasmide a intégré l'insert sont celles qui sont blanches, car le site d'insertion est au milieu de l'opéron *lac*, lequel permet la synthèse de l'enzyme β-galactosidase. La β-galactosidase permet de dégrader le X-Gal, et le produit de cette réaction est bleu. Les colonies blanches sont repiquées sur milieu LB/ampicilline liquide et incubés à 37°C sous agitation à 150 rpm pour 15-18h. 5 mL de ce bouillon sont ensuite centrifugés 10 minutes à 11000 x g et le milieu surnageant est retiré afin de ne conserver que le culot de cellules. Une purification du plasmide est ensuite effectuée sur ces cellules à l'aide du *GeneJet Plasmid Miniprep kit* (Thermo Scientific, ON), selon les instructions du protocole. Il est important de noter que les plasmides sont conservés dans des tubes *LoBind* 1,5 mL (Eppendorf), car la concentration de chaque point de la courbe standard diminue dans le temps lorsque conservés dans des tubes 1,5 mL réguliers. Cet

effet est réduit lorsque la conservation des plasmides se fait dans des tubes *LoBind*. Le plasmide de DAOM197198 a été fourni par les laboratoires du CRBM.

Préparation de la courbe standard

Afin de pouvoir calculer le nombre de plasmides à mettre dans chaque point de la courbe standard, il est nécessaire de déterminer avec précision la concentration d'ADN dans la purification du plasmide. En effet, avec la concentration et le volume, il est possible de déduire la masse d'ADN plasmidique présente dans le produit de la purification du plasmide. Grâce à la première équation présentée dans l'exemple de calcul présenté en annexe, il est possible de déterminer le poids d'un seul plasmide. La concentration du plasmide purifié et le poids d'un seul plasmide permettent de déterminer le volume de plasmide purifié à mettre dans la série de dilution de la courbe standard. Le plasmide purifié est dosé au Qubit (Life Technologies, ON), une technologie basée sur le principe de la fluorescence du PicoGreen. Comme la concentration d'ADN des plasmides purifiés excède généralement 100 ng/μL, la trousse *Qubit dsDNA HS Assay* est utilisé. Pour la quantification Qubit, un volume de 1 à 20 μL d'échantillon complète un volume final de 200 μL dont le reste est composé d'une solution de travail composée de 0,5% de *Qubit dsDNA HS reagent* et de 99,5% *Qubit dsDNA HS buffer*. Chaque échantillon doit être placé dans un tube à PCR 0,5 mL à paroi fine transparente Axygen® (VWR, QC). Le Qubit calcule les concentrations d'ADN des échantillons par rapport à une courbe standard de deux points, le standard 1 et le standard 2. Pour la préparation de chaque standard, 10 μL de standard du *Qubit dsDNA HS Assay* est ajouté à 190 μL de solution de travail. Une fois les solutions des standards et des échantillons prêtes, elles sont incubées 2 minutes à température ambiante. Puis, les standards et les échantillons sont vortexés et centrifugés rapidement avant d'être analysés dans le Qubit.

Une dilution 1:10 du plasmide purifié(C10 1:10) a été dosé par Qubit également, ainsi qu'une dilution 1:20 (C10 1:20).

C'est à partir de la dilution C10 1:20 du plasmide de DAOM220722 que le premier point de la courbe standard est calculé. La courbe standard de DAOM220722 comprend six points, chacun correspondant à une dilution 1:10 du point précédent. Le facteur de dilution 1:10 de la courbe standard permet de couvrir une plus vaste gamme de concentrations possibles, étant donné que le nombre de copies de marqueur présent dans

une seule spore n'est pas connu, et que la quantité de spores de CMA présente dans les échantillons de sol et de racines est inconnue. Le premier point (P1) de la courbe représente 10 000 000 copies du plasmide, et le dernier (P6), 100 copies du plasmide. L'exemple du calcul requis pour la dilution du P1, qui permet d'obtenir les données illustrées au tableau 5, figure dans l'annexe:

Tableau 5. Calcul du détail de chaque dilution de la courbe standard du marqueur moléculaire de *G. cerebriforme*

Dilution	Source de l'ADN plasmidique	Concentration initiale (C1) (pg/ μ L)	Concentration finale (C2) (pg/ μ L)	Volume initial (V1) (μ L)	Volume final (V2) (μ L)	Volume de dilution (V2-V1) (μ L)	Volume de dilution ajouté au mix de qPCR (μ L)	Masse de l'ADN dans le mix de qPCR (pg)	Nombre de copies dans le mix de qPCR
P1	C10 1:20	610	16,233	5,3	200	194,7	2,7	43,829	10000000
P2	P1	16,233	1,6233	20	200	180	2,7	4,3829	1000000
P3	P2	1,6233	0,16233	20	200	180	2,7	0,43829	100000
P4	P3	0,16233	0,016233	20	200	180	2,7	0,043829	10000
P5	P4	0,016233	0,0016233	20	200	180	2,7	0,0043829	1000
P6	P5	0,0016233	0,00016233	20	200	180	2,7	0,00043829	100

Le même type de calcul est utilisé pour les dilutions de la courbe standard du marqueur moléculaire de DAOM197198, lesquelles sont présentées en détail au tableau 6.

Tableau 6. Calcul du détail de chaque dilution de la courbe standard du marqueur moléculaire de DAOM197198

Dilution	Source de l'ADN plasmidique	Concentration initiale (C1) (pg/ μ L)	Concentration finale (C2) (pg/ μ L)	Volume initial (V1) (μ L)	Volume final (V2) (μ L)	Volume de dilution (V2-V1) (μ L)	Volume de dilution ajouté au mix de qPCR (μ L)	Masse de l'ADN dans le mix de qPCR (pg)	Nombre de copies dans le mix de qPCR
P1	GiPRplasmid	266,5	16,304	12,2	200	187,8	2,7	43,369	10000000
P2	P1	16,304	1,6304	20	200	180	2,7	4,3369	1000000
P3	P2	1,6304	0,16304	20	200	180	2,7	0,43369	100000
P4	P3	0,16304	0,016304	20	200	180	2,7	0,043369	10000
P5	P4	0,016304	0,0016304	20	200	180	2,7	0,0043369	1000
P6	P5	0,0016304	0,00016304	20	200	180	2,7	0,00043369	100

Réactions de PCR et de qPCR

La réaction de PCR se fait dans un volume final de 30 μ L, dont 2 μ L d'ADN de l'échantillon. Le protocole utilisé est celui de la *Platinum Taq DNA polymerase* d'Invitrogen (0,2 mM dNTP mix; 0,2 mM amorce sens; 0,2 mM amorce antisens; 1,5 mM MgCl₂; 0,025 U/ μ L). Le thermocycleur est réglé pour une dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C, suivie de 35 cycles comprenant une dénaturation de 45 secondes à 94°C,

une hybridation de 45 secondes à 50°C et une élongation de 1,5 minute à 72°C, suivi par une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les amplicons sont ensuite conservés à 10°C.

Le volume final de la réaction de qPCR est 20 µL, dont 2,7µL d'ADN et 17,3 µL d'un mélange qPCR (50% *itaq universal probes supermix* de chez Biorad; 0,67 µM amorce sens; 0,67 µM amorce antisens; 0,08 µM sonde TaqMan). Les réactions sont ensuite placées à l'intérieur du *Viiia7* (Applied Biosystems, Life Technologies, ON) et subissent une première dénaturation à 95°C pour 3 minutes suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95°C pour 15 secondes et une étape d'hybridation/élongation pour 1 minute.

Dispositifs expérimentaux et analyse statistique

Pour chacun des objectifs spécifiques, les analyses statistiques ont été menées sur le logiciel JMP 11.

- Objectif 1: Validation de la courbe standard

Comme la courbe standard servira à quantifier des quantités inconnues de CMA dans différentes matrices, il est important qu'elle couvre un large spectre de quantités possibles. De plus, si une courbe standard requiert un minimum de 5 points, il reste que plus elle comporte de points, plus elle permettra une quantification précise. C'est la raison pour laquelle la série de dilution de la courbe sera réalisée selon un facteur de dilution de 1:10¹⁴⁶. Pour faciliter l'aspect technique de la préparation, la courbe comprendra 6 points. En quantification absolue, comme tous les résultats dépendent de la courbe standard, il est important que celle-ci soit soigneusement sélectionnée et validée¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Le but de la validation est de s'assurer que la mesure obtenue pour chaque point de la courbe ne varie pas de manière significative d'un jour à l'autre. Pour la validation intra-essai, trois répétitions techniques de chaque point de la courbe doivent être effectués lors de l'essai¹⁴⁶. Il faut faire au moins trois essais pour pouvoir faire la validation inter-essai¹⁴⁷. Ainsi, le premier jour, les 6 points de la courbe ont été analysés en qPCR avec 6 répétitions. Les 2e et 3e jours, les 6 points de la courbe ont été analysés en qPCR avec 3 répétitions.

Lors de la validation de la courbe standard, un modèle de régression linéaire à effets fixes a été utilisé pour connaître les effets du point de la courbe standard et du jour

où l'expérience a été menée sur la valeur du cycle seuil. Il s'agit en fait de déterminer si l'hypothèse nulle, soit que le jour ou que le point de la courbe n'ont pas d'effet sur la variable mesurée, est validée ou non. Comme chaque point de la courbe a été testé à chaque jour, ces facteurs sont croisés¹⁵⁰. Lorsqu'une interaction entre les effets point de la courbe et jour est significative, ces derniers ont été analysés séparément à l'aide du test HSD de Tukey pour isoler la source de la différence entre les résultats d'un point à l'autre de la courbe et entre les résultats de chaque point d'un jour à l'autre.

- Objectif 2.1: Détermination d'un nombre de copies par spore selon le protocole de Premier Tech

Pour obtenir un nombre de copies de marqueur par spore, le protocole de validation de Premier Tech suggère une expérience sur une durée de trois jours. Le premier jour, 8 échantillons de 100 spores, 8 échantillons de 200 spores et 8 échantillons de 400 spores de DAOM220722 sont préparés selon le compte MTT et leur ADN est extrait à l'aide du *PowerSoil DNA Isolation Kit* de chez Mo Bio. Les 2e et 3e jours, ce sont plutôt 4 nouveaux échantillons de chaque quantité de spores qui sont préparés et dont l'ADN est extrait (voir figure 2)¹⁵¹. L'objectif de cette expérience est de s'assurer que le nombre de copies de marqueur par spore constitue une unité de quantification fiable et stable pour être utilisée à grande échelle. Si le nombre de copies par spore constitue une bonne unité, alors le nombre de copies retrouvé devrait doubler entre les échantillons de 100 et ceux de 200 spores. De plus, les résultats ne devraient pas varier significativement d'un jour à l'autre.

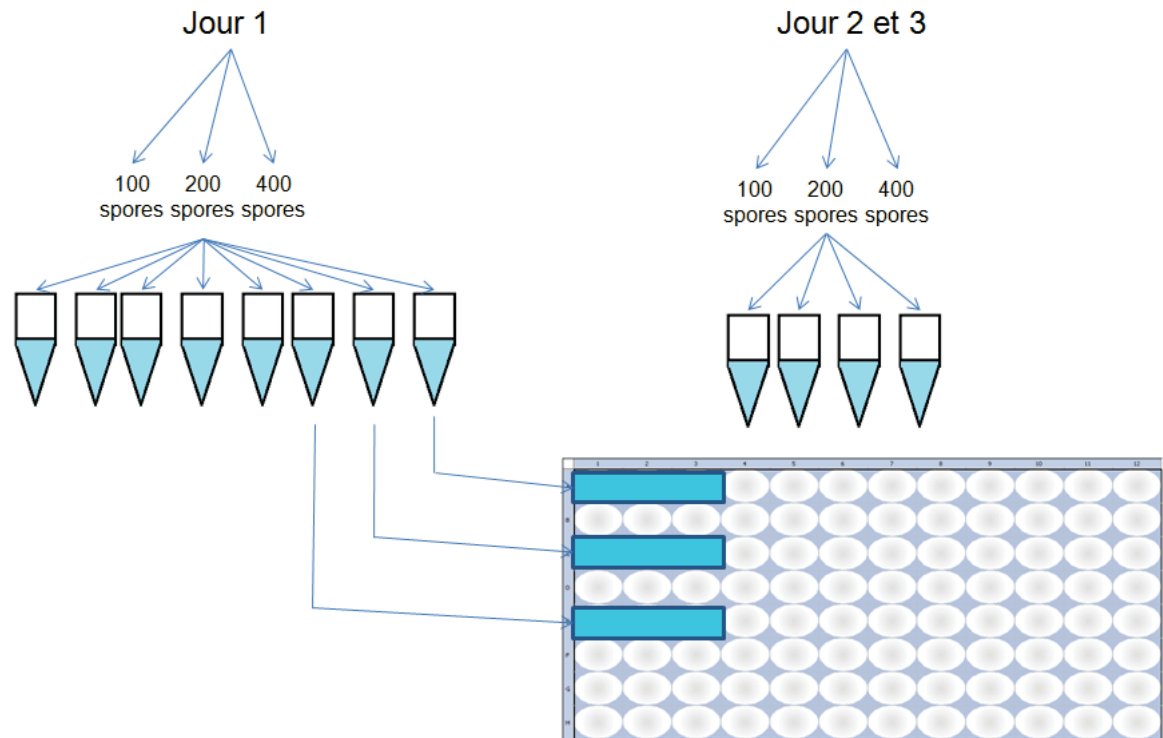


Figure 2. Dispositif expérimental de détermination du nombre de copies de marqueur par spore

Le modèle choisi pour analyser la première section de la recherche d'un nombre de copies de marqueur de DAOM220722 par spore est plus complexe. En effet, le modèle d'analyse de variance à régression linéaire mixte a été utilisé pour calculer les effets du nombre de spores dans l'échantillon et du jour sur les variables de cycles d'amplification, de nombre de copies total de marqueur retrouvé dans un échantillon et de nombre de copies de marqueur par spore selon le nombre de spores dans l'échantillon. Les effets jour et nombre de spores dans l'échantillon sont également des facteurs croisés. L'effet de l'extraction d'ADN lors de cette expérience est imbriqué dans le jour et le nombre de spores, car toutes les extractions se retrouvent à chaque jour et pour chaque nombre de spores¹⁵⁰. Un facteur aléatoire est ajouté à l'effet de l'extraction, car il s'agit du fruit d'un tirage aléatoire non-exhaustif¹⁵⁰. Pour mieux comprendre les interactions significatives entre les effets, le test HSD de Tukey a été utilisé pour analyser chaque effet séparément.

- Objectif 2.2: Détermination de la meilleure méthode de préparation des échantillons pré-extraction d'ADN

Comme les résultats de la détermination d'un nombre de copies de marqueur de DAOM220722 sont plus variables que prévu, il faut tenter de trouver les causes de cette variabilité dans les étapes précédant l'analyse qPCR¹⁴⁷. Le but de l'expérience est donc de déterminer la méthode de préparation la plus efficace et la moins variable entre le compte sans coloration et le compte avec coloration MTT. Gamper et al. (2008) suggère de préparer au moins trois répétitions de différentes quantités de spores pour la validation de l'essai¹⁵². De plus, si le nombre de copies de marqueur par spore constitue une unité stable pour la quantification, alors une relation linéaire devrait être observée entre le nombre de copies de marqueur retrouvé dans un échantillon et le nombre de spores contenues dans cet échantillon. La meilleure méthode devrait permettre des amplifications à des cycles moins élevés, présenter moins de variation entre les résultats obtenus pour un même nombre de spore et avoir le R^2 le plus élevé entre le nombre de spores et le nombre de copies de marqueur retrouvé. Pour obtenir un R^2 plus fiable, des nombres de spores ont été ajoutés. Ainsi, plutôt que d'avoir seulement des échantillons de 100, de 200 et de 400 spores à chaque jour, trois répétitions d'échantillons de 50, de 100, de 200, de 400, de 600 et de 800 spores à chaque jour pendant trois jours seront préparés selon chacune des deux méthodes (voir figure 3).

La comparaison des méthodes de compte de spores implique un effet de plus dans le modèle de régression linéaire mixte. Ici, les effets méthode de compte et nombre de spores dans l'échantillon sont croisés. L'effet jour est imbriqué dans les effets méthode de compte et nombre de spores dans l'échantillon plutôt que d'être croisé avec eux, puisque les protocoles de préparation et d'extraction d'ADN sont longs et peuvent prendre plus d'une journée. Il n'est donc pas possible de préparer les échantillons de tous les nombres de spores par comptage visuel en une seule journée. L'effet de l'extraction est imbriqué dans la méthode de compte, le nombre de spore dans l'échantillon et le jour. Pour déterminer les différences significatives entre les divers éléments de chaque effet, les tests HSD de Tukey et T de Student ont été utilisés.

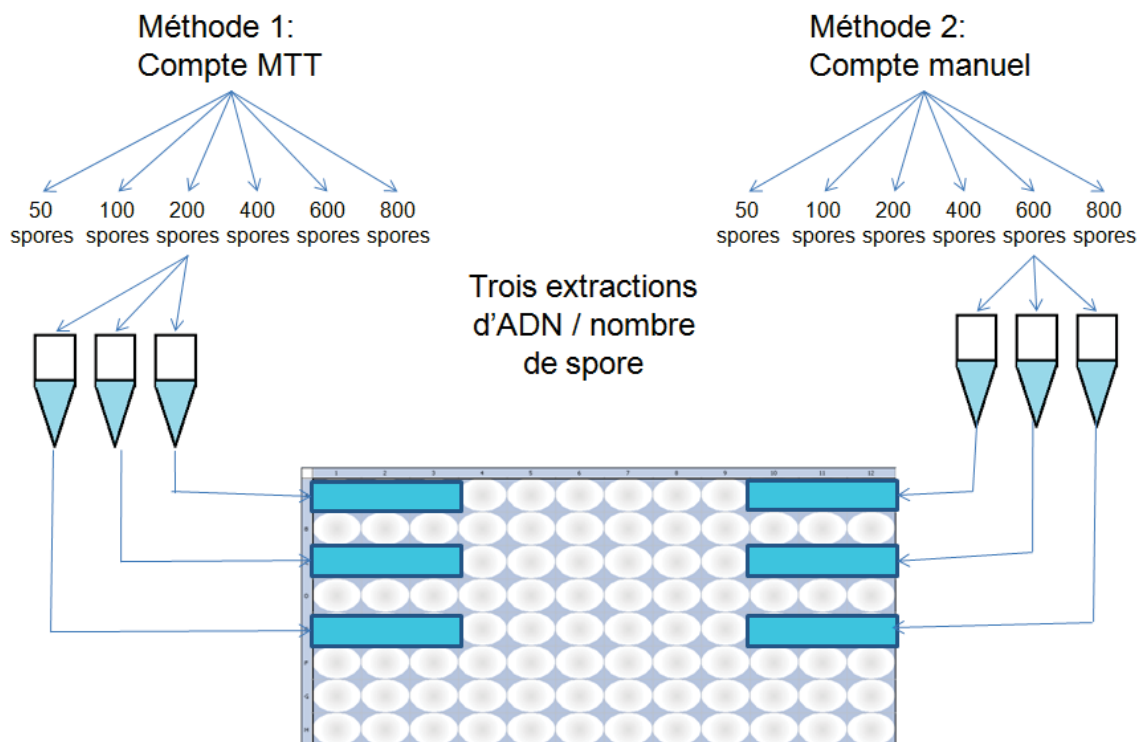


Figure 3. Dispositif expérimental de détermination de la méthode optimale de préparation des échantillons de spores. Compte MTT: méthode de préparation qui implique une coloration des spores viables à partir de laquelle est déterminée une concentration de spores viables par mL de suspension de spores. Compte manuel: pipetage de spores seules directement, sans aucune coloration.

- Objectif 2.3: Détermination de la trousse d'extraction d'ADN de sol optimal

L'étude des micro-organismes du sol peut se faire de deux manières, directe et indirecte. La méthode indirecte implique d'extraire les micro-organismes du sol et de les isoler en culture *in vitro* avant l'extraction d'ADN, alors que la méthode directe consiste en l'extraction d'ADN directement à partir d'échantillons du sol¹⁵³. La méthode indirecte implique une étape supplémentaire, soit la mise en culture et la préparation d'échantillon à partir de ces cultures. Lors de cette étape supplémentaire, il est possible que certains micro-organismes soient perdus, c'est la raison pour laquelle la méthode directe est privilégiée¹⁵³. Le sol est une matrice contenant toutes sortes de composés phénoliques, d'acides fulviques et humiques pouvant inhiber la réaction de PCR¹⁵⁴. Il est difficile d'établir un protocole standardisé qui puisse éliminer tous ces composés à la fois, puisqu'ils présentent des concentrations, des charges et des solubilités différentes les uns des autres¹⁵⁴. C'est la raison pour laquelle la plupart des protocoles développés pour

l'extraction d'ADN des échantillons de sol divergent au niveau de la purification¹⁵³. La purification est souvent nécessaire après l'extraction d'ADN de sol, afin de retirer les substances inhibitrices de l'échantillon.¹⁵³ Les trousse d'extraction d'ADN de sol combinent plusieurs des méthodes de purification. C'est pourquoi, afin d'optimiser le protocole pour obtenir une unité de quantification de base qui soit la plus précise que possible, trois trousse d'extraction d'ADN sont testés : le *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Mo Bio), le *E.Z.N.A DNA isolation kit* de (Omega Biotech)et le *NucleoSpin soil kit* (Macherey-Nagel). Chacune de ces trousse a servi pour extraire l'ADN de 6 échantillons de 100 spores en milieu simple (suspension d'eau et de spores) et de 6 échantillons de 100 spores en milieu complexe (suspension de spores et de racines dans de l'eau) (voir tableau 7). Les quantités de spores dans chaque échantillon sont préparés selon la méthode de compte sans coloration.

Tableau 7. Dispositif expérimental de comparaison de l'efficacité de l'extraction d'ADN de trois trousse commerciale.

Source de l'échantillon	Milieu	Mo Bio		E.Z.N.A		Macherey-Nagel	
		<i>G. Cerebriforme</i> DAOM220722	simple	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores
	complexe	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores	6 échantillons de 100 spores

Pour la comparaison des trousse commerciale, les effets trousse d'extraction et milieu sont croisés et l'effet extraction est un facteur imbriqué dans les effets milieu et trousse d'extraction. Pour déterminer les différences significatives entre les divers éléments de chaque effet, les tests HSD de Tukey et T de Student ont été utilisés.

- Objectif 3.1: Test du protocole développé pour le marqueur de DAOM22072 sur des échantillons de racines et de sols présentant des inoculations différentes

Afin de tester l'application du marqueur de DAOM220722, trois échantillons de sol sont prélevés à partir des pots de culture *in vivo* inoculés avec chacun des traitements impliquant une inoculation contenant des spores de DAOM220722. L'ADN de ces

échantillons est ensuite extrait à l'aide du *NucleoSpin soil kit* (Macherey-Nagel). Le dispositif expérimental est illustré à la figure 4.

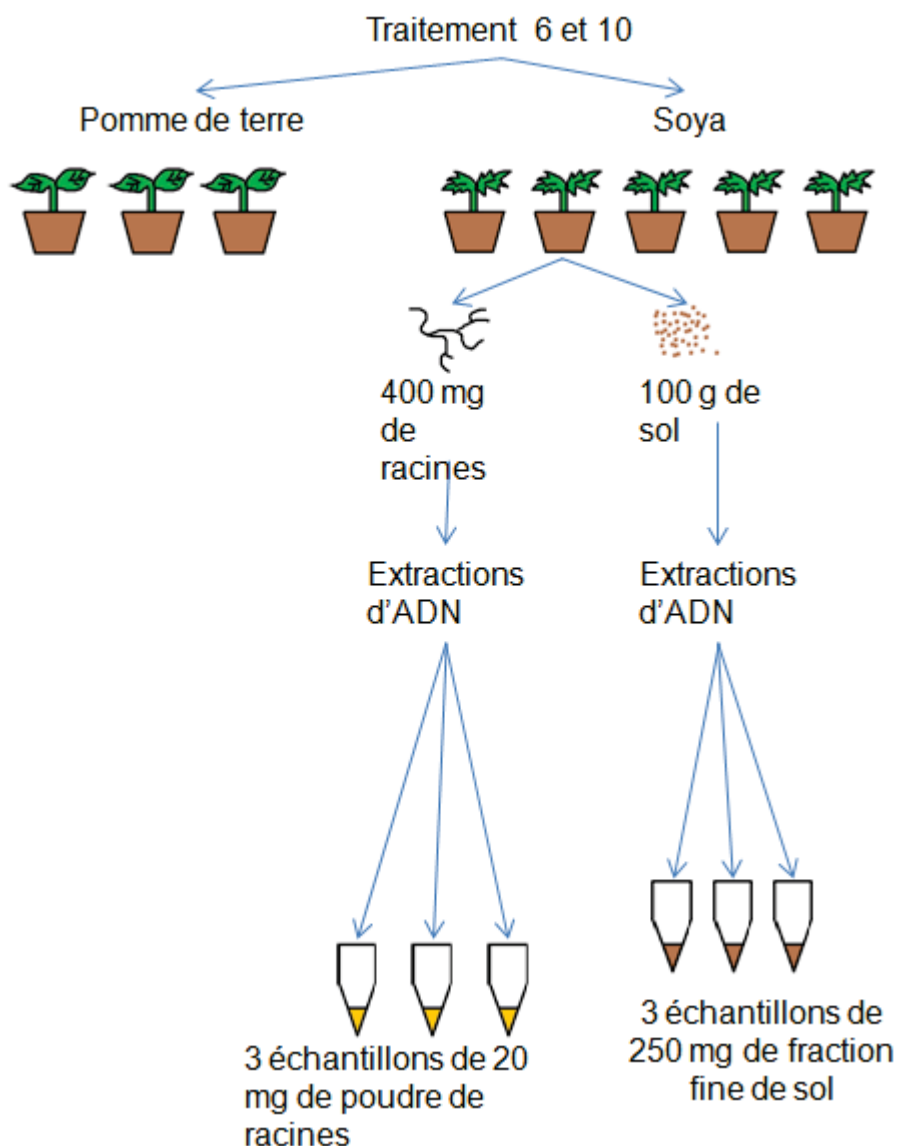


Figure 4. Dispositif expérimental du test de l'application du marqueur spécifique à DAOM220722 sur des échantillons de sol de cultures in vivo de soja et de pomme de terre inoculés avec les traitements 6 et 10.

- Objectif 3.2: Test du protocole développé pour le marqueur de DAOM197198 sur des échantillons de racines et de sols présentant des inoculations différentes

Suite à la grande variabilité des résultats obtenus pour le nombre de copies de marqueur par spore, et suite aux cycles d'amplification tardifs rencontrés dans les

résultats du test de l'application du marqueur de DAOM220722, l'application du marqueur DAOM197198 a été testée sur des échantillons de sol provenant des pots inoculés à l'aide du traitement 2, afin de voir si des résultats semblables étaient obtenus avec un marqueur différent. Si c'était le cas, il faudrait conclure que les cycles d'amplification tardifs et la grande variabilité rencontrée dans les résultats de l'application du marqueur DAOM220722 n'est pas due au marqueur, mais plutôt au protocole d'extraction et au fait qu'il s'agissait de la première fois que les marqueurs étaient testés sur des échantillons de sol. C'est pour cette raison que les échantillons de racines et de sol des cultures en pot *in vivo* de pommes de terre inoculées à l'aide du traitement 2 ont été utilisés pour cette expérience. Le traitement 2 est une inoculation avec un nombre maximal de 100 spores, toutes de DAOM197198. C'est donc le traitement pour lequel l'inoculation avait le plus de chances de succès.

Les résultats de cette partie de l'expérience ont donné lieu à plusieurs modifications pour optimiser le protocole, lesquelles seront discutées dans la section «résultats et discussion».

Résultats et discussion

Objectif 1: Développement d'une courbe standard pour la quantification absolue du marqueur de DAOM227022

Le développement d'un marqueur moléculaire TaqMan spécifique à DAOM227022 est une nouvelle méthode bio-analytique qui doit être validée. Traditionnellement, la validation de nouvelles méthodes bio-analytiques requiert de tester la spécificité du marqueur choisi, la linéarité, la stabilité, la limite de quantification (LQ) et la limite de détection (LD) et le recouvrement¹⁵⁵. La spécificité se rapporte au fait que le marqueur doit reconnaître l'analyte de tous les composés non-analytes présents dans un échantillon¹⁵⁶. Dans ce cas, une spore de DAOM227022 constitue l'analyte, et le marqueur doit pouvoir distinguer une spore de DAOM227022 sans pouvoir distinguer d'autres organismes. Le marqueur est constitué des amorces et de la sonde TaqMan. La stabilité réfère à la stabilité d'un échantillon de spores de DAOM227022 au sein des matrices dans lesquelles les spores seront recherchées sur certaines périodes de temps pré-déterminées. Elle est cruciale à la quantification, et dans le cas échéant, elle a été validée dans les laboratoires de Premier Tech¹⁵⁵. La linéarité, ou la calibration, implique d'introduire diverses concentrations connues de l'analyte dans des matrices destinées à être étudiées. Une relation linéaire doit être observée entre le nombre de spores dans une matrice donnée et le signal fluorescent obtenu lors de l'analyse en qPCR. Selon le protocole établi par Premier Tech, la linéarité du procédé est validée lorsqu'une corrélation linéaire correspondant à un R^2 de plus de 0,95 est observé entre la quantité de marqueur et la quantité de spores présentes dans la matrice. Généralement, c'est lors du test de linéarité que les LQ et LD sont déterminées. La LQ réfère à la plus petite quantité d'analytes pouvant être quantifiée de manière fiable, donc à la plus petite quantité émettant une intensité de signal fluorescent à l'intérieur des limites de la courbe standard. La LD réfère à la plus petite quantité d'analyte permettant d'obtenir un signal lors de l'analyse quantitative, même à l'extérieur de la courbe standard. Le terme LD réfère à ce qui est détecté, sans toutefois pouvoir être quantifié précisément à l'aide de la courbe standard. Finalement, le recouvrement réfère au pourcentage d'analyte retrouvé par le marqueur lorsqu'une quantité connue d'analyte est ajoutée dans une matrice.

Test de spécificité des amorces CerebF, CerebR

La première chose à tester lors de la validation de cette nouvelle méthode bio-analytique que constitue le marqueur de DAOM227022 est sa spécificité. La spécificité des amorces CerebF et CerebR est donc testée en PCR sur une gamme de CMA. La figure 5 illustre les résultats de celle-ci. Ainsi, il est possible de constater que *G. cerebriforme* DAOM227022 est la seule espèce dont l'ADN est amplifié en PCR avec les amorces spécifiques à DAOM227022. Aucune amplification non-spécifique n'a eu lieu pour aucune autre espèce et aucun autre isolat de CMA. De plus, comme l'ADN des racines de carottes non-mycorhizées n'a pas été amplifié, le marqueur ne devrait pas surestimer le nombre de mitochondries présentes dans un échantillon contenant des racines mycorhizées. Le marqueur de 148 pb est donc indéniablement spécifique à DAOM227022 à l'intérieur de la gamme d'organismes testés.

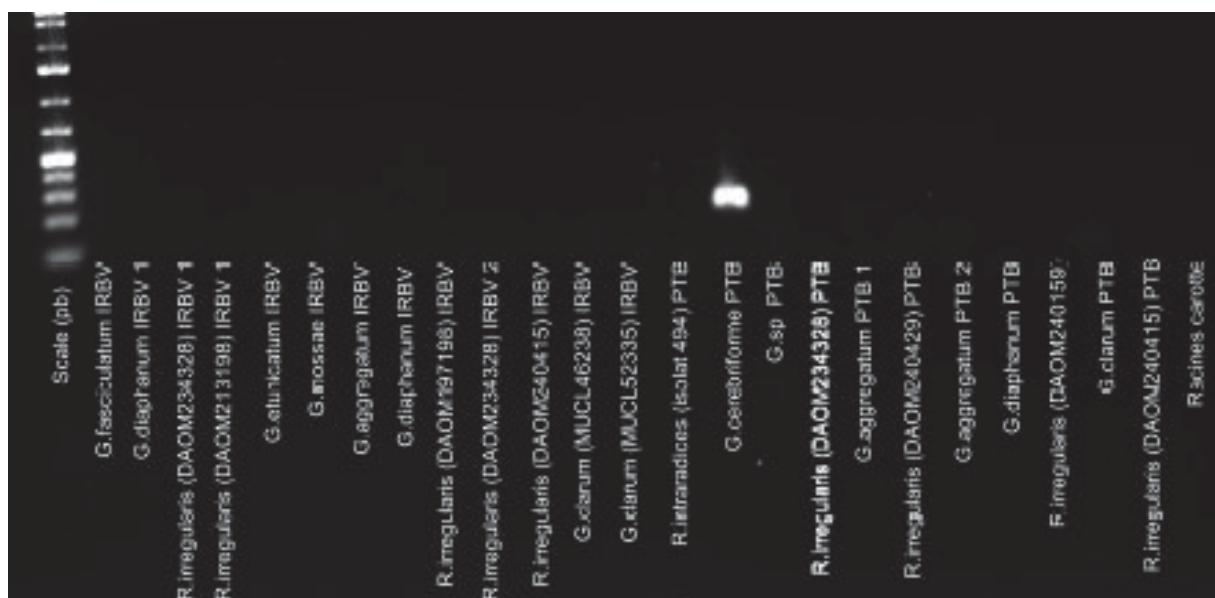


Figure 5. Test de spécificité des amorces CerebF et CerebR en PCR régulière sur une gamme d'espèces et d'isolats de CMA. Certains CMA proviennent de la collection de l'Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV) alors que d'autres proviennent de Premier Tech Biotechnologies (PTB, et la provenance de chaque échantillon est indiquée sur la figure. De plus, certains CMA proviennent de deux extractions différentes sur deux pétris différents. Ceux-ci sont indiqués par les numéros 1 et 2.

Élaboration d'une courbe standard

La différence entre la quantification à l'aide d'un marqueur moléculaire spécifique et les méthodes bio-analytiques traditionnelles ou biochimiques, c'est que, normalement, l'unité de quantification est déjà définie. C'est-à-dire que l'on sait si l'on quantifie une concentration d'un composé chimique, un nombre de globules par mL de sang, ou encore une densité optique, par exemple. À chacun de ces types d'unité, il est possible d'associer un chiffre. Or, dans le cas de DAOM227022, il serait idéal qu'une spore unique soit l'unité de quantification. Pour que cela soit possible à l'aide de notre marqueur, il faut établir un nombre moyen de copies de marqueur par spore. L'élaboration d'une courbe standard de différentes quantités de plasmides augmentant d'un facteur de 10 entre elles permet de déterminer le nombre de copies de marqueur présentes dans un échantillon, et cela grâce à la comparaison du nombre de copies retrouvé dans un échantillon par rapport aux nombres de copies retrouvées dans chacun des points de la courbe standard. Ainsi, tous les calculs permettant de déterminer l'unité de quantification et de quantifier subséquentement des échantillons inconnus dépendent de la courbe standard. C'est pourquoi il est important de la valider avant la détermination de l'unité de quantification.

Les paramètres de l'expérience de validation sont déterminés selon les normes de validation définies grâce à l'expertise du Dr. Alain Bélanger en biochimie¹⁵¹. Le Dr. Bélanger est en charge de la gestion du projet de quantification des mycorhizes dans les matrices commerciales et dans le sol chez Premier Tech. La validation de la courbe standard a pour but de vérifier que la courbe standard ne varie pas d'un jour à l'autre, afin qu'elle constitue un outil de quantification fiable^{84,148}, car la quantification absolue présuppose que l'efficacité de chaque dilution en série est environ la même¹⁵⁷. Cette courbe standard permettra ensuite de valider la linéarité, ainsi que les autres paramètres de la nouvelle méthode bio-analytique. Le premier jour, chaque point de la courbe comporte 6 répétitions, alors que les 2e et 3e jour, chaque point de la courbe comporte 3 répétitions. Le protocole du Dr. Bélanger et la littérature indiquent que pour chaque essai, la pente de la courbe doit être entre -3,58 et -3,10, ce qui correspond à des efficacités comprises entre 90% et 110%, et le R^2 doit être supérieur à 0,995^{149,151}. Les courbes standard effectuées à chaque jour sont représentées aux figures 6, 7 et 8. Les critères d'acceptation d'une courbe sont respectés à chaque jour.

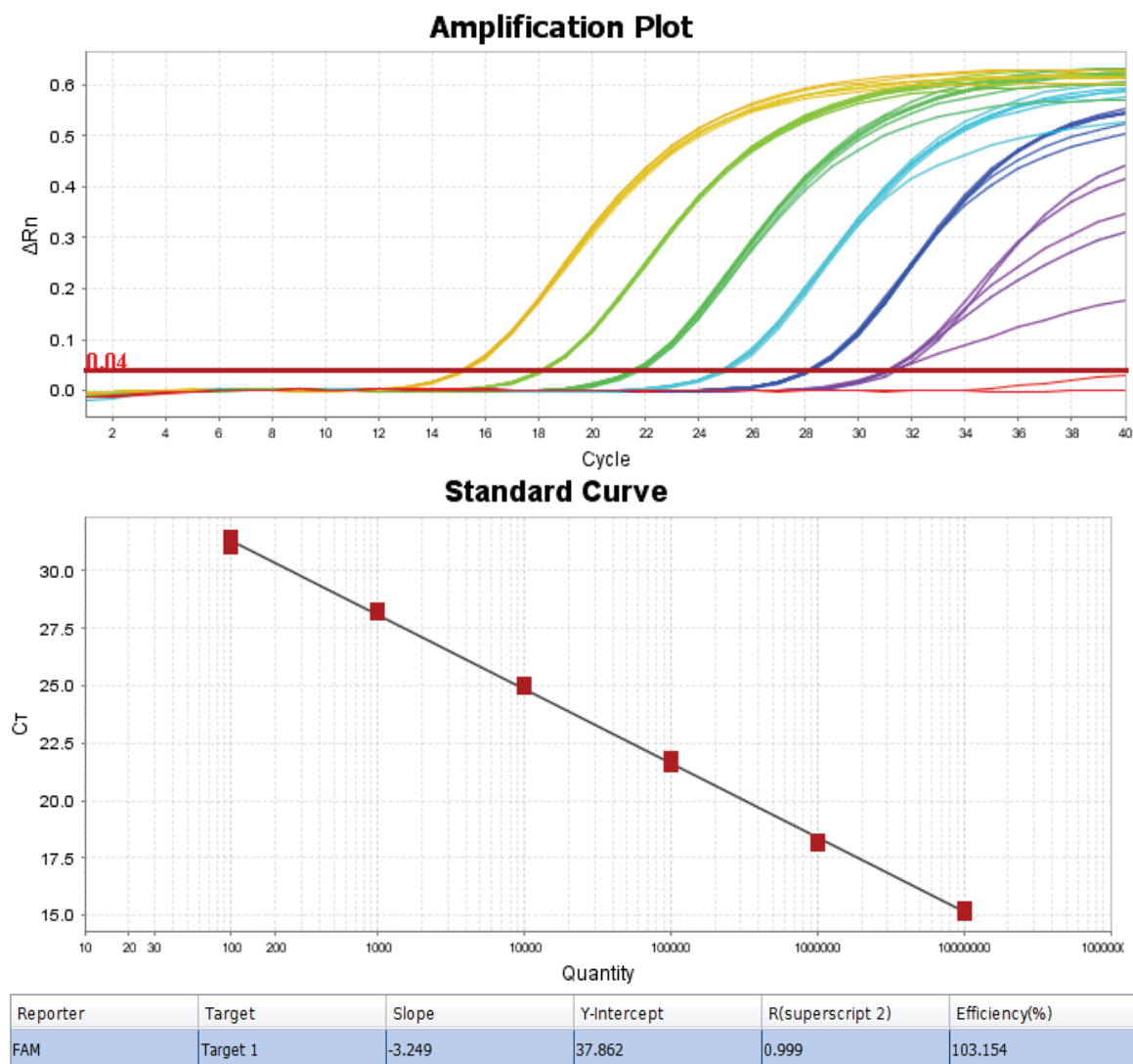


Figure 6. Validation de la courbe standard du marqueur spécifique à DAOM220722 jour 1. En haut : les courbes d'amplification de chaque point de la courbe. Au milieu : la courbe indiquant le cycle d'amplification selon le nombre de copies de marqueurs. En bas : les données de l'équation de la courbe standard.

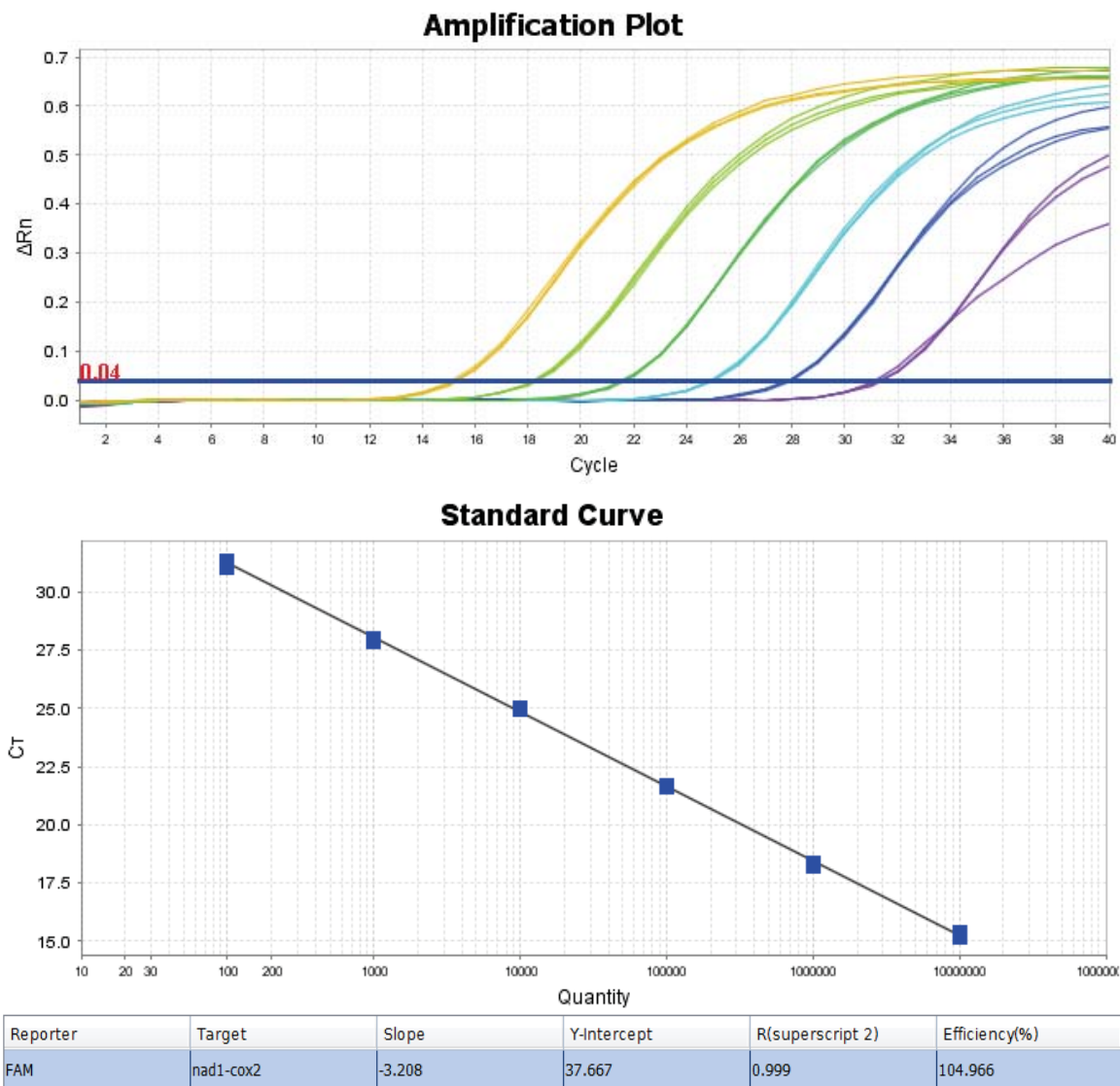


Figure 7. Validation de la courbe standard du marqueur spécifique à DAOM220722 jour 2. En haut : les courbes d'amplification de chaque point de la courbe. Au milieu : la courbe indiquant le cycle d'amplification selon le nombre de copies de marqueurs. En bas : les données de l'équation de la courbe standard.

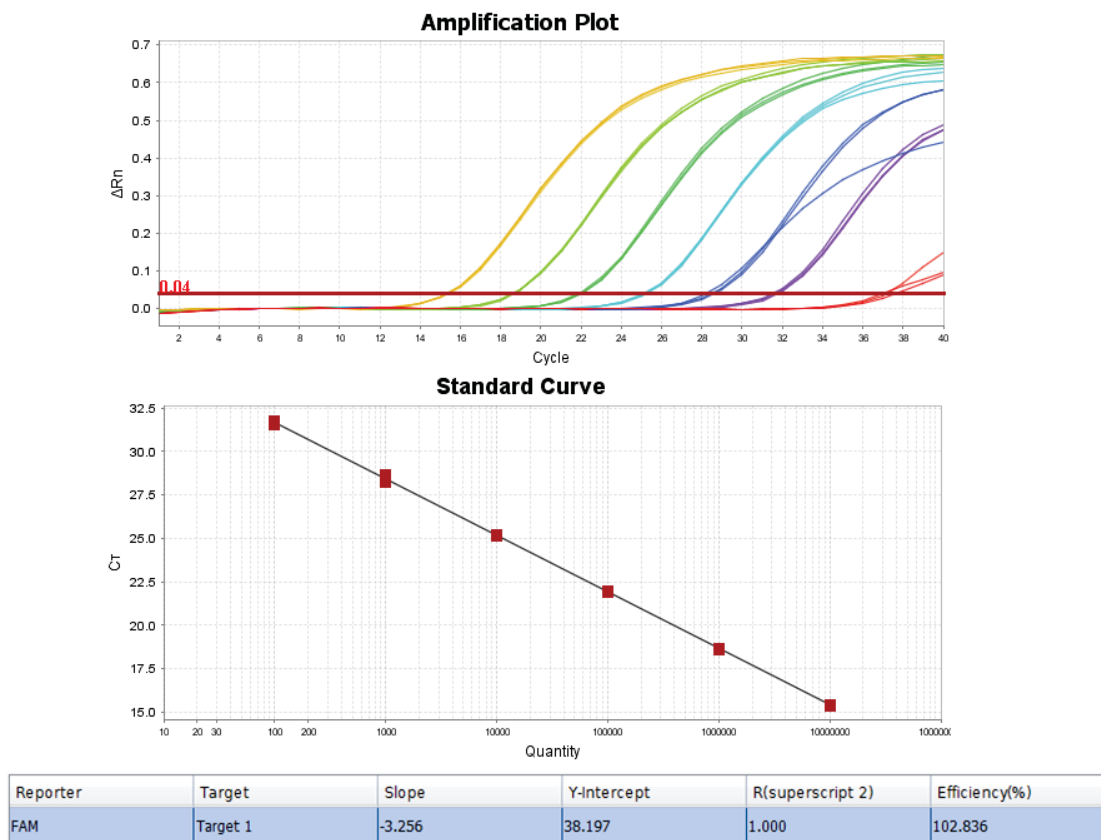


Figure 8. Validation de la courbe standard du marqueur spécifique à DAOM220722 jour 3. En haut : les courbes d'amplification de chaque point de la courbe. Au milieu : la courbe indiquant le cycle d'amplification selon le nombre de copies de marqueurs. En bas : les données de l'équation de la courbe standard.

Le protocole du Dr. Alain Bélanger permet d'évaluer la variabilité intra-essai et inter-essai de la courbe, afin de s'assurer que celle-ci ne varie pas selon le temps. Cette stabilité est cruciale pour que la courbe standard soit un bon outil de quantification. Si la courbe standard est constante d'un jour à l'autre, le seul effet qui devrait affecter significativement les cycles d'amplification de chaque point est le nombre de copies de marqueur présent dans ce point, car plus un échantillon contient d'ADN cible du marqueur, plus il sera amplifié tôt dans les cycles de qPCR.

Tableau 8. Variation entre les Ct de sortie de chaque répétition de chaque point de la courbe lors de l'expérience de validation de la courbe au jour 1.

Point de la courbe	Nombre de copies de plasmide	Ct de sortie moyen	Coefficient de variation du Ct de sortie (%)
P1	10 000 000	15,195	0,499
P2	1 000 000	18,179	0,242
P3	100 000	21,654	0,547
P4	10 000	24,956	0,292
P5	1 000	28,228	0,225
P6	100	31,222	0,554

Tableau 9. Variation entre les Ct de sortie de chaque répétition de chaque point de la courbe lors de l'expérience de validation de la courbe au jour 2.

Point de la courbe	Nombre de copies de plasmide	Ct de sortie moyen	Coefficient de variation du Ct de sortie (%)
P1	10 000 000	15,274	0,609
P2	1 000 000	18,272	0,419
P3	100 000	21,645	0,163
P4	10 000	24,993	0,190
P5	1 000	27,911	0,219
P6	100	31,281	0,548

Tableau 10. Variation entre les Ct de sortie de chaque répétition de chaque point de la courbe lors de l'expérience de validation de la courbe au jour 3.

Point de la courbe	Nombre de copies de plasmide	Ct de sortie moyen	Coefficient de variation du Ct de sortie (%)
P1	10 000 000	15,388	0,214
P2	1 000 000	18,654	0,269
P3	100 000	21,944	0,294
P4	10 000	25,178	0,194
P5	1 000	28,467	0,744
P6	100	31,645	0,433

Tableau 11. Variation inter-essai entre les Ct de sortie de chaque répétition de chaque point de la courbe.

Point de la courbe	Nombre de copies de plasmide	Ct de sortie moyen	Coefficient de variation du Ct de sortie (%)
P1	10 000 000	15,263	0,694
P2	1 000 000	18,321	1,150
P3	100 000	21,724	0,727
P4	10 000	25,020	0,447
P5	1 000	28,209	0,818
P6	100	31,353	0,764

En utilisant JMP 11 pour l'analyse de variance des cycles seuil, il devient évident que cette variable subit l'effet significatif du jour ($P < 0,0001$) et du point de la courbe ($P < 0,0001$), et que ces effets interagissent de manière significative ($P < 0,0001$) (voir tableau 12). En analysant la variable des ct de sortie avec le modèle statistique un effet à la fois, en commençant par l'effet jour (tableau 13), le test HSD de Tukey sur les points de la courbe indique que chaque point est amplifié a un cycle significativement différent, ce qui est le résultat attendu, car chaque point présente un nombre de copies de marqueur dix fois moins concentré que le point précédent. Par contre, en analysant la variable des ct de sortie avec le modèle statistique par point de la courbe (tableau 14), le test HSD de Tukey sur les jours révèle que le cycle seuil de chaque point au jour 3 est significativement différent des deux autres jours. L'effet jour n'aurait pas dû être significatif, et selon ces tests, il est impossible de dire que la courbe standard est constante à chaque jour. Cependant, selon le protocole établi par le Dr. Bélanger, le coefficient de variation des valeurs du cycle d'amplification moyen pour chaque point ne doit pas dépasser 3% pour l'évaluation de la variabilité intra-essai et 7,5% pour l'évaluation de la variabilité inter-essai. Les tableaux 8, 9, 10 et 11 montrent que c'est le cas. Ainsi, selon le protocole de validation du protocole de quantification établi par le Dr. Alain Bélanger de chez Premier Tech, cette courbe standard est validée.

Tableau 12. Résultat du modèle de régression linéaire à effets fixes comparant les cycles d'amplification (Ct) en fonction du point de la courbe et du jour où l'expérience a été menée.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Point de la courbe	5	36093,30	<0,0001
Jour	2	59,1859	<0,0001
Point de la courbe: Jour	10	6,9304	<0,0001
Résidus			

Tableau 13. Résultat du modèle de régression linéaire à effets fixes comparant les cycles d'amplification (Ct) analysé par rapport à l'effet Jour en fonction du point de la courbe.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Point de la courbe	5	18528,13	<0,0001
Résidus	69		

Tableau 14. Résultat du modèle de régression linéaire à effets fixes comparant les cycles d'amplification (Ct) analysé par rapport à l'effet Point de la courbe en fonction du jour.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Jour	2	6,8240	0,0157
Résidus	69		

Le protocole de validation établi par le Dr. Bélanger est-il invalidé à cause de pareils résultats? En fait, selon Fu et al. (2009), le coefficient de variation intra et inter-essai peut servir à déterminer la répétabilité d'un protocole de quantification¹⁵⁸. Peters et al. (2006) déplorent que plusieurs études utilisent les coefficients de variation pour valider la calibration d'une courbe standard, car les critères de validation basés sur ce coefficient sont subjectifs, mais ne sauraient confirmer avec une valeur de P plus petite que 0,05 la signifiante de l'hypothèse nulle, soit qu'il n'existe pas de différence entre les variables de sortie obtenues à chaque jour¹⁵⁵. L'article de Peters et al. (2006) parle surtout des méthodes de bio-analyses chimiques n'incluant pas l'analyse qPCR. Peu d'articles sur la validation de méthodes quantitative en utilisant la qPCR sont accessibles, mais ceux qui le sont utilisent les coefficients de variation^{158,159}. Difficiles à obtenir, des cycles seuil non statistiquement différents pour une courbe standard élaborée selon les mêmes calculs, mais à partir d'une solution différente de plasmide purifié? Il semblerait que oui. C'est la

raison pour laquelle plusieurs mesures peuvent être prises pour stabiliser le plasmide dans le temps, c'est-à-dire pour s'assurer de la stabilité de sa configuration, ainsi que pour s'assurer de la stabilité de sa concentration dans la dilution dans le temps (car celle-ci varie lorsque les molécules plasmidiques adhèrent aux parois des tubes).

Parmi ces mesures, la plus évidente serait de linéariser le plasmide. En effet, un plasmide circulaire présente certains désavantages, le premier étant qu'il a été démontré qu'une courbe standard à base de plasmide circulaire pour la quantification absolue tendra à surestimer la quantité de copies présentes dans un échantillon¹⁶⁰. De plus, la conformation du plasmide peut faire varier l'efficacité de la quantification¹⁶¹, et la conformation circulaire relâchée («nicked circular») peut induire un biais lors de la lecture de la concentration du plasmide purifié à l'aide du QuBit¹⁶¹. Tel que l'on sait, la concentration du plasmide purifié est une information très importante, puisqu'elle sert à tous les calculs subséquents utilisés pour préparer les dilutions en série. En effet, les cycles seuil des six points de la courbe ont été enregistrés à chaque expérience au cours de ce projet, ce qui permet de relever une variation significative qui se produit lorsqu'un plasmide purifié est épuisé et que la concentration d'un nouveau plasmide purifié est utilisée pour faire le calcul de dilutions en séries de la courbe standard. Typiquement, le Picogreen est privilégié par rapport au nanodrop comme manière de déterminer la concentration¹⁶². L'essai Qubit repose d'ailleurs sur la chimie du Picogreen. Or, bien que ce soit la méthode la plus efficace de déterminer la concentration de plasmide à ce jour, il semble qu'elle constitue tout de même une source de variation à ne pas négliger.

Les conditions d'entreposage de l'ADN servant à la synthèse de la courbe standard peuvent également être une source de variation lors de la quantification absolue¹⁶³. Or, dans le cas échéant, Premier Tech avait déjà déterminé les conditions optimales d'entreposage de leur plasmide contenant le marqueur de DAOM197198, et par souci d'uniformité, ce sont les conditions confidentielles de l'industrie qui ont été utilisées pour l'entreposage du plasmide spécifique à DAOM220722. Malheureusement, cette validation de la stabilité n'a pas été effectuée avec des tubes LoBind, et des expériences ont été menées au laboratoire Hijri qui ont démontré que ces tubes permettent d'observer des concentrations de l'ADN qu'ils contiennent plus stable dans le temps. Il serait donc judicieux de valider ces conditions avec des tubes LoBind et sur des plasmides contenant

l'insert de DAOM220722 car l'insert étant différent, il s'agit d'une molécule différente, et une molécule différente peut nécessiter des conditions d'entreposage différentes.

L'une de méthodes de quantification absolue qui pourrait constituer une alternative à la courbe standard tout en contournant ces inconvénients serait la PCR digitale en gouttelettes. En PCR digitale, l'échantillon d'ADN est répandu parmi des milliers de répétitions de la réaction PCR, et la quantification est basée sur la loi de Poisson sur les grands nombres, ce qui élimine le besoin d'une courbe standard. Malheureusement, cette technique est récente et encore très dispendieuse^{164,165}.

Objectif 2.1: Détermination d'une unité de quantification (nombre de copies de marqueur par spore) selon le protocole développé par Premier Tech pour DAOM197198.

La courbe standard étant validée selon les normes de Premier Tech, il est maintenant possible de l'utiliser pour définir et valider l'unité de quantification. Une courbe standard est validée lorsque les conditions suivantes sont rencontrées:

1. la pente de la courbe issue du calcul : $y = mx + b$ doit être entre -3.10 (110%) et -3.58 (90%) et le R^2 doit être supérieur à 0.995;
2. le coefficient de variation intra-essai pour chaque point de la courbe ne doit pas dépasser 3%;
3. le coefficient de variation inter-essai pour chaque point de la courbe ne doit pas excéder 7,5%.

Pour la détermination d'un nombre de copies de mitochondries par spores, le protocole du Dr. Bélanger établit les critères suivants:

1. Le coefficient de variation pour tous les échantillons composés d'un même nombre de spores ne devrait pas dépasser 10%;
2. Une fois le nombre de copies par spores déterminé, les résultats de l'analyse quantitative des échantillons dont le nombre de spores déterminé par coloration MTT est connu devraient se situer à $\pm 15\%$ du nombre de spores réel dans l'échantillon.

Le protocole utilisé à cette fin s'inspire des normes de validation du protocole établi par Premier Tech pour la quantification de l'espèce DAOM197198 dans le sol¹⁵¹. Il a pour but de déterminer un nombre de copies de marqueurs par spore qui soit assez constant

pour constituer une bonne unité de base de la quantification de l'espèce DAOM227022, et de vérifier la répétabilité de la méthode. Le terme «répétabilité» est ici préféré au terme «reproductibilité», car la reproductibilité implique d'être testée dans plusieurs laboratoires. Lorsque testée dans le même laboratoire, il s'agit de répétabilité¹⁵⁵. Ce protocole a été utilisé pour déterminer le nombre de copies de marqueur spécifique à DAOM197198 dans une seule spore avec succès. Il se déroule sur trois jours; le premier jour, 8 échantillons de 100 spores, 8 échantillons de 200 spores, 8 échantillons de 400 spores sont préparés selon la méthode de la coloration MTT et leur ADN est extrait à l'aide du *PowerSoil DNA Isolation Kit* de chez Mo Bio; les 2e et 3e jours, 4 échantillons de 100 spores, 4 échantillons de 200 spores et 4 échantillons de 400 spores sont ainsi préparés, avant d'être analysés en qPCR. Les jour 2 et 3, 4 échantillons de chaque nombre de spores sont analysés (voir figure 2.).

Si la méthode est répétable, les résultats ne devraient pas varier de manière significative d'un jour à l'autre. Le protocole de validation de Premier Tech établi par le Dr. Alain Bélanger indique que pour la quantification des échantillons de spores, chaque moyenne devrait avoir un coefficient de variation maximal de 10%, qu'il s'agisse d'évaluer la variabilité intra- ou inter- essai. Pour ce qui est de la variabilité intra-essai, les résultats de l'expérience du jour 1 sont présentés à la figure 9 et au tableau 15. Les résultats de l'expérience du jour 2 sont présentés à la figure 10 et au tableau 16, et ceux de l'expérience du jour 3 sont présentés à la figure 11 et au tableau 17. Le tableau 18 présente la variabilité inter-essai de l'application de la méthode développée par Premier Tech pour DAOM197198 sur DAOM220722. Les normes du protocole de validation établi par le Dr. Bélanger ne sont donc pas respectées pour les résultats présentés aux tableaux 10 à 13, ce qui sera discuté plus bas.

Statistiquement parlant, la variable «cycle seuil» devrait subir un effet nombre de spores dans l'échantillon significatif et ne devrait pas être significativement influencé par le jour. En effet, l'analyse de variance du cycle seuil indique que cette mesure est affectée significativement par le nombre de spore dans l'échantillon ($P < 0,0001$), mais pas par le jour ($P = 0,2764$). Par contre, cette analyse suggère une interaction significative entre l'effet du nombre de spores et l'effet jour sur le cycle seuil ($P = 0,0148$) (voir tableau 19). Le modèle d'analyse de variance par nombre de spore dans l'échantillon (voir tableau 20)

permet d'effectuer un test HSD de Tukey sur les jours de chaque nombre de spores évalué lors de cette expérience (voir tableau 22). Ce test révèle que les résultats pour 200 et 400 spores sont constants d'un jour à l'autre, mais que le cycle seuil de l'ADN des échantillons de 100 spores extraits le jour 2 sont significativement différents des ADN de ceux extraits les jours 1 et 3. Le modèle d'analyse de variance par effet permet d'effectuer un test HSD de Tukey sur l'effet jour (voir tableau 21). Selon ce test, aux jours 1 et 3, les ct de sortie des échantillons présentant un nombre de spores différent sont significativement différents, ce qui est le résultat attendu. Cependant, au jour 2, les échantillons de 100 et de 200 spores présentent de cycles seuil qui ne sont pas significativement différents l'un de l'autre.

Sachant que le nombre de copies de marqueur retrouvé dans un échantillon étant une variable intimement liée au cycle seuil, il n'est pas étonnant de constater que les résultats de l'analyse statistique des cycles d'amplification se reflètent sur les résultats de l'analyse statistique du nombre de copies de marqueur retrouvé dans un échantillon. L'analyse de variance du nombre de copies de marqueurs a nécessité une transformation logarithmique des mesures du nombre de copies de marqueurs obtenues, pour contourner l'hétéroscédasticité (forme en entonnoir des résidus de la variance)¹⁶⁶. Cette analyse indique que le nombre de copies de marqueur retrouvé dans un échantillon n'est pas affecté significativement par le jour ($P = 0,7305$), mais est affecté significativement par le nombre de spores dans l'échantillon ($P < 0,0001$), avec une interaction significative entre l'effet jour et l'effet nombre de spores ($P = 0,0009$). En analysant le modèle selon l'effet du nombre de spores dans l'échantillon, le test HSD de Tukey sur les jours indique que le nombre de copies de marqueur n'est pas significativement différent de jour en jour pour les échantillons de 200 et 400 spores, mais que cette mesure est différente pour les échantillons de 100 spores des jours 2 et 3, alors qu'aucune différence significative n'est retrouvée entre les mesures des jours 1 et 2, et des jours 1 et 3 pour les échantillons de 100 spores. Lorsque le modèle est analysé par jour, le test HSD de Tukey sur le nombre de spores dans l'échantillon révèle que les jours 1 et 3, le nombre de copies de marqueurs retrouvé est différent pour chaque nombre de spores, alors qu'au jour 2, le nombre de copies de marqueurs retrouvé pour les échantillons de 100 et 200 spores n'est pas

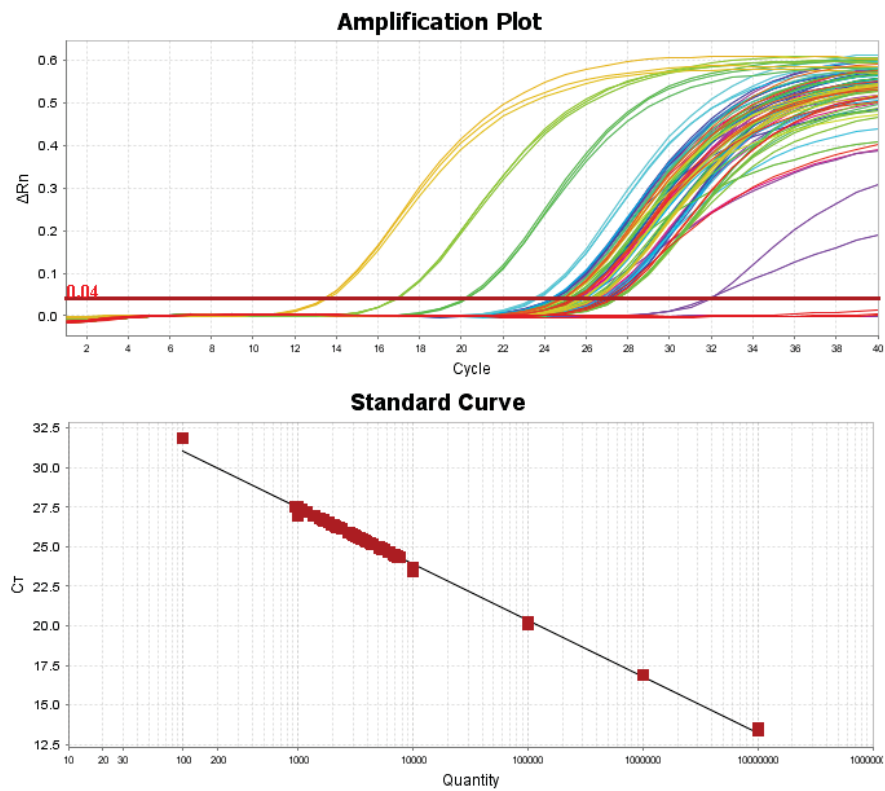
significativement différent. Ainsi, il y a tout de même un léger effet jour qui se manifeste au jour 2.

Cela est problématique pour le calcul du nombre de copies de marqueur par spore, car un nombre similaire de copies de marqueur obtenus pour ces échantillons est divisé par le nombre de spores différent de leurs échantillons respectifs, ce qui induit une grande variabilité du nombre de copies par spore qui devrait servir d'unité de quantification de base. Pour être validé comme unité de quantification, le nombre de copies par spore ne doit pas varier en fonction du jour, et doit être le même peu importe le nombre de spores présentes dans l'échantillon qui a servi à son calcul. Le modèle d'analyse de variances du nombre de copies de marqueurs par spore permet de dire que ni l'effet nombre de spores dans l'échantillon ($P = 0,1718$) ni l'effet jour ($P = 0,6243$) n'affectent significativement le nombre de copies de marqueur retrouvé par spore. Par contre, il y a un effet combiné du jour et du nombre de spore dans l'échantillon par rapport au nombre de copies de marqueur détecté dans une spore ($P = 0,0053$). En analysant le modèle selon l'effet du nombre de spores dans l'échantillon, le test HSD de Tukey révèle que le nombre de copies de marqueurs par spore n'est pas différent au cours des trois jours pour les échantillons de 200 et de 400 spores, mais qu'il l'est pour les échantillons de 100 spores du jour 2 par rapport aux jours 1 et 3. En analysant le modèle selon l'effet du jour, le test HSD de Tukey ne révèle aucune différence significative obtenue pour le nombre de copies de marqueur par spore pour les échantillons de 100, 200 et 400 spores les jours 1 et 3, mais soulève que le jour 2, le nombre de copies de marqueur par spore est significativement différent pour les échantillons de 100 et de 200 spores. Cela s'explique sans doute par le fait qu'au jour 2, le nombre de copies de marqueur total retrouvé dans les échantillons de 100 et de 200 spores n'est pas significativement différent.

Le protocole doit être répétable. La méthode de préparation des échantillons avant l'analyse qPCR est la même à chaque jour, et comporte deux étapes majeures, le compte du nombre de spore à inclure dans chaque échantillon et l'extraction d'ADN. C'est là que doit se trouver la source de cette variation retrouvée dans les échantillons de 100 spores. En effet, les échantillons de cette expérience ont été préparés selon la méthode MTT, laquelle se base sur un nombre moyen de spores/mL des suspensions de spores fournies par Premier Tech pour ensuite associer un volume de suspension à prélever pour chaque

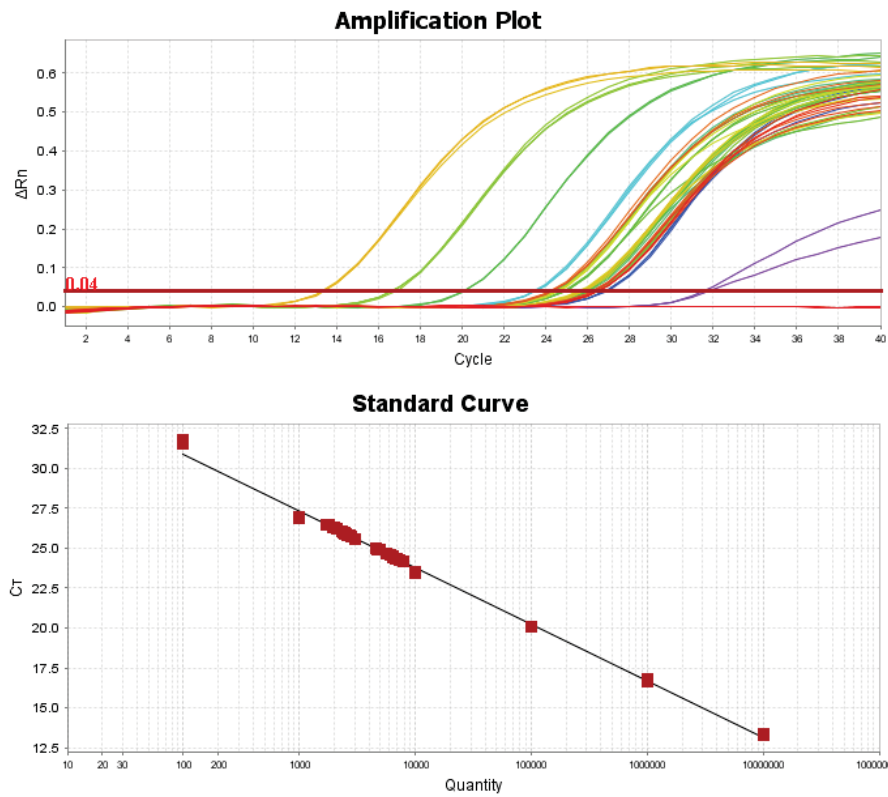
nombre de spores souhaité dans les échantillons. Par conséquent, moins un nombre de spores à mettre dans un échantillon est élevé, moins grand est le volume de suspension à pipeter. Or le tableau 17 révèle que ce sont les échantillons de 100 spores qui présentent le coefficient de variation le plus élevé. Cela pourrait être dû au fait qu'ils correspondent à de plus petits volumes de suspension pipetés.

Les effets statistiques des nombres de spores dans l'échantillon et des jours n'étant pas jugés satisfaisants, il faut optimiser la méthode de détermination de l'unité de quantification. En effet, les coefficients de variation observés sont trop élevés pour chaque nombre de spores dans les échantillons pour correspondre aux critères de qualité de Premier Tech. À l'intensité de cette variation, il y a deux explications possibles: soit la variation provient des étapes précédant l'analyse quantitative, soit elle est d'ordre métabolique. Avant d'étudier l'explication métabolique, il est possible d'optimiser les étapes précédant l'analyse quantitative, soit le mode de compte des spores mises dans l'échantillon et l'extraction d'ADN. L'optimisation de la méthode de compte de spores à déposer dans les échantillons est examinée à l'objectif 2.2.



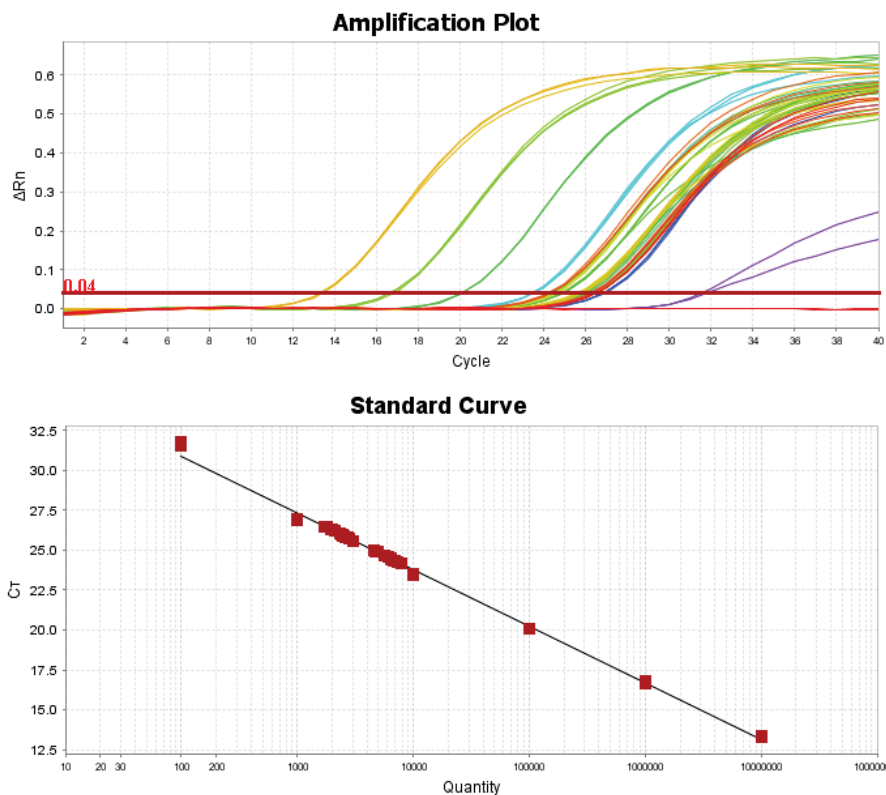
Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R ^(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	nad1-cox2	-3.560	38.139	0.996	90.934

Figure 9. Détermination d'un nombre de copies/spore, jour 1.



Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	nad1-cox2	-3.549	37.973	0.996	91.335

Figure 10. Détermination d'un nombre de copies/spore, jour 2.



Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	nad1-cox2	-3.549	37.973	0.996	91.335

Figure 11. Détermination d'un nombre de copies/spore, jour 3.

Tableau 15. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité intra-essai de l'expérience du volet 2.1, jour 1.

Nombre de spores dans l'échantillon	Ct de sortie moyen	Nombre de copies de marqueur retrouvé dans l'échantillon en moyenne	Nombre de copies de marqueurs par spore en moyenne	Coefficient de variation (%)
100	26,881	55919	559	27,9
200	25,696	117667	588	18,2
400	24,650	231070	578	16,7

Tableau 16. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité intra-essai de l'expérience du volet 2.1, jour 2.

Nombre de spores dans l'échantillon	Ct de sortie moyen	Nombre de copies de marqueur retrouvé dans l'échantillon en moyenne	Nombre de copies de marqueurs par spore en moyenne	Coefficient de variation (%)
100	26,171	79825	798	19,8
200	25,945	91614	458	13,7
400	24,545	228223	571	16,6

Tableau 17. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité intra-essai de l'expérience du volet 2.1, jour 3.

Nombre de spores dans l'échantillon	Ct de sortie moyen	Nombre de copies de marqueur retrouvé dans l'échantillon en moyenne	Nombre de copies de marqueurs par spore en moyenne	Coefficient de variation (%)
100	26,891	49779	498	16,3
200	25,822	107664	538	32,4
400	24,498	257403	644	8,3

Tableau 18. Détermination d'un nombre de mitochondries par spores: variabilité inter-essai de l'expérience du volet 2.1.

Nombre de spores dans l'échantillon	Ct de sortie moyen	Nombre de copies de marqueur retrouvé dans l'échantillon en moyenne	Nombre de copies de marqueurs par spore en moyenne	Coefficient de variation (%)
100	26,702	60455	605	30,0
200	25,794	108261	541	23,8
400	24,585	236942	592	15,3

Tableau 19. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant les cycles de sortie (Ct), les nombres de mitochondries totaux retrouvés dans chaque échantillon (NMT) et le nombre de mitochondries par spore (NM/S) défini selon chaque échantillon en fonction du nombre de spores dans l'échantillon et du jour où l'expérience est menée.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Nombre de spores dans l'échantillon	2	146,2640	<0,0001
Jour	2	1,3295	0,2764
Nombre de spores dans l'échantillon: Jour	4	3,5366	0,0148
Résidus	140		
NMT			
Nombre de spores dans l'échantillon	2	149,3790	<0,0001
Jour	2	0,3166	0,7305
Nombre de spores dans l'échantillon: Jour	4	3,8930	0,0094
Résidus	140		
NM/S			
Nombre de spores dans l'échantillon	2	1,8439	0,1718
Jour	2	0,4768	0,6243
Nombre de spores dans l'échantillon: Jour	4	4,3540	0,0053
Résidus	140		

Tableau 20. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant les cycles de sortie (Ct), les nombres de mitochondries totaux retrouvés dans chaque échantillon (NMT) et le nombre de mitochondries par spore (NM/S) défini selon chaque échantillon par rapport à l'effet nombre de spores en fonction du jour.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Jour	2	5,2267	0,0216
Résidus	140		
NMT			
Jour	2	4,1667	0,0400
Résidus	140		
NM/S			
Jour	2	4,8791	0,0262
Résidus	140		

Tableau 21. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant les cycles de sortie (Ct), les nombres de mitochondries totaux retrouvés dans chaque échantillon (NMT) et le nombre de mitochondries par spore (NM/S) défini selon chaque échantillon par rapport à l'effet jour en fonction du nombre de spores.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Nombre de spores dans l'échantillon	2	81,2748	<0,0001
Résidus	140		
NMT			
Nombre de spores dans l'échantillon	2	81,2452	<0,0001
Résidus	140		
NM/S			
Nombre de spores dans l'échantillon	2	0,2421	0,7872
Résidus	140		

Tableau 22. Résultats des tests HSD de Tukey pour caractériser les effets "jour" et "nombre de spores dans l'échantillon" sur les variables sortantes Ct, nombre de mitochondries dans l'échantillon et nombre de mitochondries par spore.

	Nombre de spores dans l'échantillon	Résultats des tests HSD de Tukey pour les variables suivantes:			
		Ct	Nombre de mitochondries dans l'échantillon	Nombre de mitochondries/spores	
Analyse selon l'effet "jour"	JR1	100	A	A	A
		200	B	B	A
		400	C	C	A
	JR2	100	A	A	A
		200	A	B	B
		400	B	B	AB
	JR3	100	A	A	A
		200	B	B	A
		400	C	C	A
Analyse selon l'effet "nombre de spores"	100	JR1	A	AB	B
		JR2	B	A	A
		JR3	A	B	B
	200	JR1	A	A	A
		JR2	A	A	A
		JR3	A	A	A
	400	JR1	A	A	A
		JR2	A	A	A
		JR3	A	A	A

Objectif 2.2: Comparaison de deux méthodes de préparation des échantillons de spores de DAOM220722 par rapport au nombre de copies de marqueurs obtenues: évaluation de la linéarité

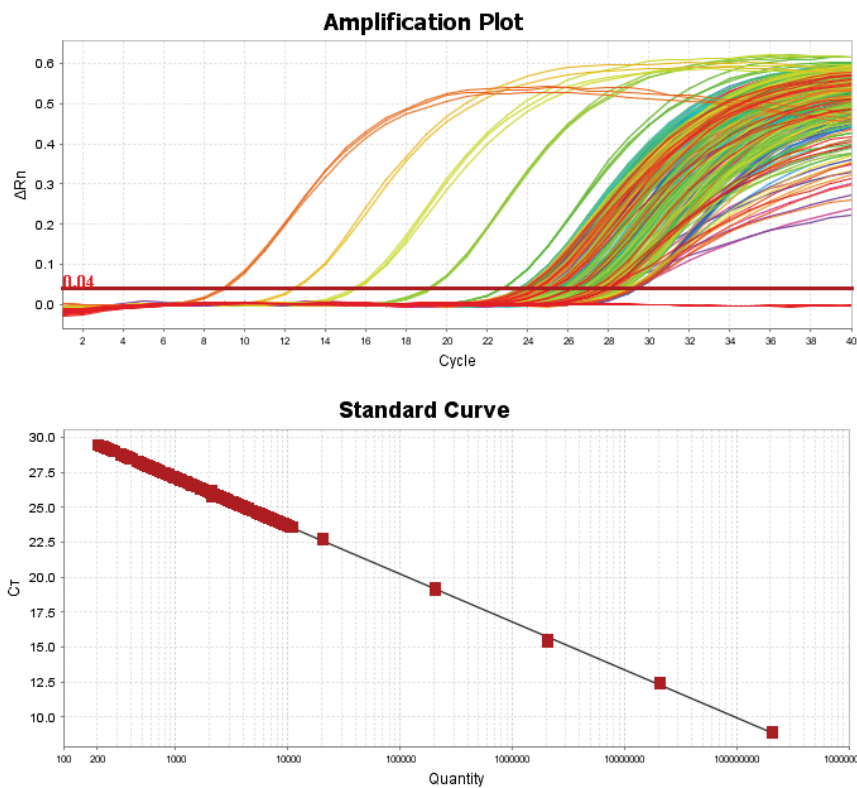
Dans ce volet, deux méthodes de préparation des échantillons de spores de DAOM220722 sont comparées, soit la méthode par coloration MTT (méthode 1), traditionnellement utilisée par Premier Tech, et la méthode de préparation manuelle, par prélèvements sous le binoculaire sans coloration (méthode 2). Selon la méthode MTT, une «concentration» de spores viables est définie par coloration d'un volume de la suspension de spores. Les échantillons sont ensuite préparés par simple pipetage du volume de suspension auquel correspond le nombre de spore souhaité dans l'échantillon. Il est soupçonné ici que le nombre de spores prélevées selon cette méthode ne coïncide pas nécessairement avec le nombre de spores attendu. En pipetant les spores une par une sous la loupe binoculaire, il est vrai que la viabilité est plus difficile à évaluer, mais l'expérimentateur est certain d'avoir dans son échantillon le nombre de spores souhaité. De plus, en développant la méthode de pipetage sous la loupe binoculaire, il a été observé que les spores de DAOM220722 sont petites, et restent parfois collées dans des gouttelettes qui adhèrent aux parois des embouts de pipettes. Des mesures ont été prises pour éviter ce biais dans la méthode de compte sans coloration, mais cela n'a pas été le cas pour la méthode MTT, afin que la méthode MTT testée à l'objectif 2.2 soit la même que celle utilisée pour tester l'objectif 2.1.

Pour comparer ces deux méthodes et analyser leur linéarité¹⁵⁵, 6 échantillons de 50 spores, 6 échantillons de 100 spores, 6 échantillons de 200 spores, 6 échantillons de 400 spores, 6 échantillons de 600 spores et 6 échantillons de 800 spores sont préparés avec coloration MTT, alors que 9 échantillons de 50 spores, 9 échantillons de 100 spores, 9 échantillons de 200 spores, 9 échantillons de 400 spores, 9 échantillons de 600 spores et 9 échantillons de 800 spores sont préparés sans coloration. En considérant que le nombre de copies de marqueur par spore est assez peu variable pour constituer une unité de quantification de DAOM220722 fiable, il serait alors logique qu'en dressant le graphique du nombre de copies de marqueur retrouvées dans un échantillon par rapport au nombre de spores contenu dans cet échantillon, la courbe présentée par les échantillons comptés manuellement soit plus linéaire que la courbe présentée par les échantillons préparés

selon le compte MTT. Une corrélation linéaire existant entre le nombre de copies de marqueur retrouvé et le nombre de spores dans l'échantillon confirmerait la faisabilité de la quantification des spores grâce à la méthode¹⁶⁷.

Les résultats obtenus avec la méthode 2 devraient être moins variables. Des résultats significativement différents devraient être obtenus selon le nombre de spores présent dans l'échantillon. Les résultats des échantillons comportant le même nombre de spores ne devraient pas varier de manière significative d'un jour à l'autre. Les résultats de l'expérience sont présentés à la figure 12 et au tableau 23.

Le protocole de validation de Premier Tech indique que pour être valide, la moyenne d'une mesure doit avoir un coefficient de variation maximal de 10%¹⁵¹. Aucune des mesures présentées au tableau 23 ne satisfait ce critère. Un plus grand nombre de copies de marqueur est retrouvé dans les échantillons comptés manuellement, mais un plus grand coefficient de variation également. Cependant, la relation entre le nombre de copies de marqueur retrouvé dans un échantillon et le nombre de spores contenues dans cet échantillon est plus linéaire lorsque les échantillons sont préparés manuellement ($R^2 = 0,9985$) que lorsqu'ils sont préparés selon la méthode MTT ($R^2 = 0,9844$) (voir figure 13).



Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	nad1-cox2	-3.429	37.395	0.999	95.714

Figure 12. Comparaison de deux méthodes de préparation des échantillons de spores.

Tableau 23. Comparaison de deux méthodes de préparation des échantillons de spores.

Méthode de compte	Nombre de spores dans l'échantillon	Ct de sortie	Nombre de copies de marqueur total	Nombre de copies de marqueur/spores	Coefficient de variation (%)
Compte à la main	50	28,222	18432	369	34,4
	100	27,327	32533	325	19,0
	200	26,077	75841	379	22,2
	400	25,134	143255	358	22,5
	600	24,382	232564	388	12,1
	800	24,017	303338	379	22,8
Compte MTT	50	29,215	9050	181	10,7
	100	27,962	21130	211	15,6
	200	26,653	50576	253	11,2
	400	25,618	103616	259	24,4
	600	24,501	216400	361	17,0
	800	24,139	274690	343	14,6

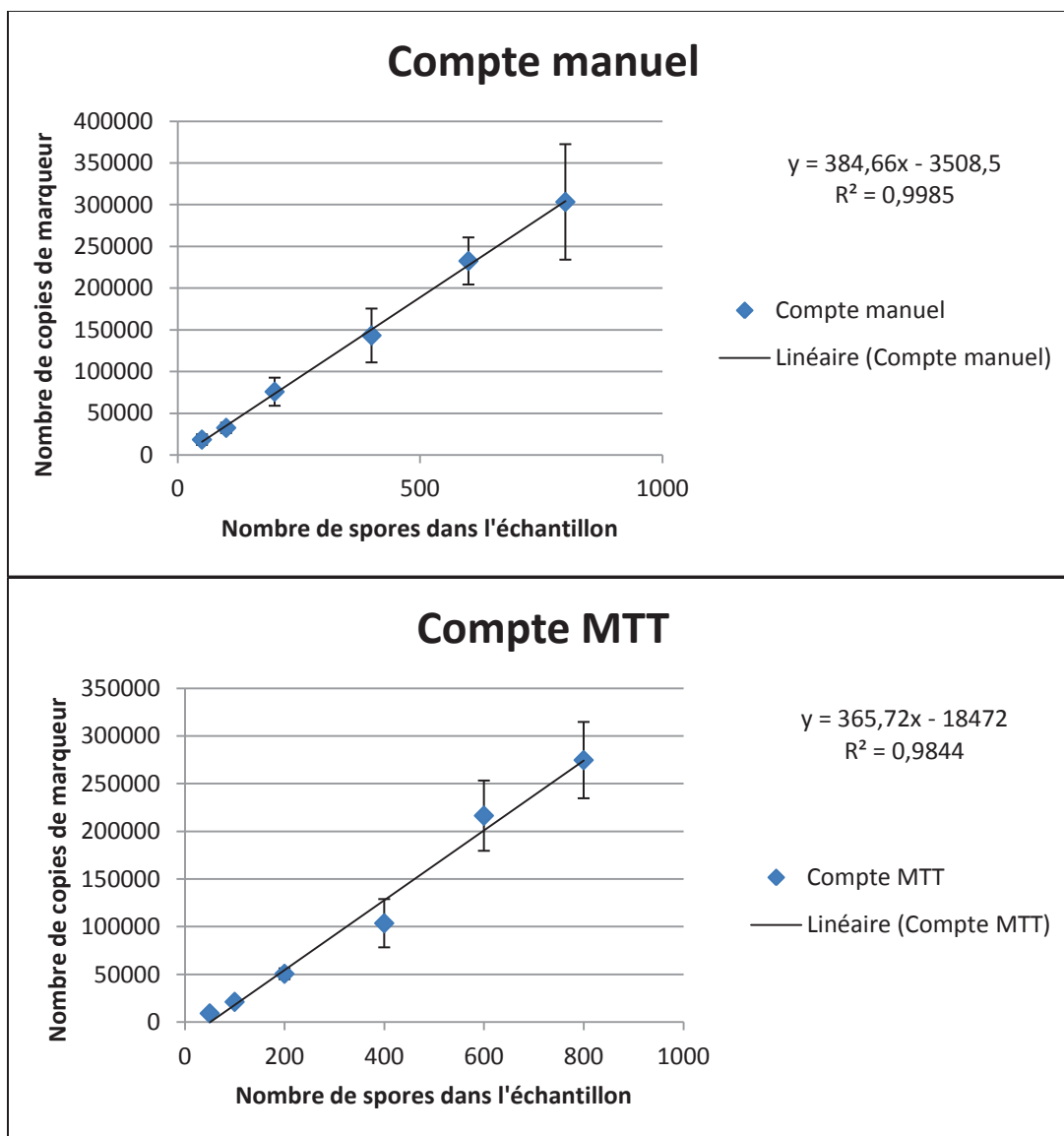


Figure 13. Comparaison de deux méthode de préparation des spores: relation de linéarité entre le nombre de spores dans un échantillon et le nombre de copies de marqueur retrouvées.

Les données du cycle seuil des échantillons, du nombre de copies de marqueurs retrouvées dans l'échantillon et du nombre de copies de marqueurs par spore selon les échantillons présentant de l'hétéroscédasticité, elles ont dû subir des transformations avant d'être intégrées au modèle linéaire mixte. Ainsi, les données du cycle seuil des échantillons et du nombre de copies de marqueurs retrouvées dans l'échantillon ont subi une transformation log, alors que les données du nombre de copies de marqueurs par spore selon les échantillons ont subi une transformation Box-Cox avant d'être analysées.

Statistiquement parlant, les résultats attendus pour la variable «cycle seuil» ont un effet significatif de la méthode de compte et un effet significatif du nombre de spores dans l'échantillon. En effet, si l'une des méthodes est significativement plus efficace que l'autre, l'amplification de l'ADN d'un même nombre de spores devrait se faire plus tôt dans les cycles. De plus, la méthode la plus efficace devrait présenter des cycles d'amplification moins variés. Également, en considérant que le nombre de copies de marqueur moyen par spore puisse être utilisé comme unité de quantification, il serait logique que plus il y ait de spores dans l'échantillon, plus il ait d'ADN mitochondrial et donc de copies de marqueur. Les cycles d'amplification devraient donc différer significativement pour les échantillons ne comptant pas le même nombre de spores.

Le modèle linéaire mixte d'analyse de variance du cycle seuil des échantillons révèle que les effets de la méthode de compte et du nombre de spore contenu dans l'échantillon influencent tous les deux le cycle seuil des échantillons de manière significative, avec des valeurs P de respectivement 0,0067 et 0,0001. Aucune interaction significative entre les effets de la méthode de compte et du nombre de spores dans un échantillon n'est détectée, ce qui est le résultat attendu. Le test T de Student révèle que les ADN des échantillons comptés par la méthode MTT ont été amplifiés à un cycle significativement différent des échantillons comptés manuellement. L'analyse HSD de Tukey sur l'effet du nombre de spores dans un échantillon par rapport au cycle seuil indique que les cycles seuil sont significativement différents pour les échantillons de 50, de 100, de 200, de 400 et de 600 spores. Les échantillons de 600 et de 800 spores présentent des cycles seuil qui ne sont pas significativement différents (voir tableau 25).

Les résultats du modèle d'analyse de variance de la variable «nombre de copies de marqueurs total retrouvé dans un échantillon» correspondent à ceux de l'analyse de la variable «cycle seuil». C'est-à-dire que le nombre de copies de marqueur retrouvé dans un échantillon subit les effets significatifs de la méthode de compte ($P = 0,0057$) et du nombre de spores dans l'échantillon ($P < 0,0001$), et ce, sans interaction entre les effets (voir tableaux 24 et 25). Encore une fois, le test T de Student indique que le nombre de copies de marqueurs retrouvées dans un échantillon est significativement différent pour les échantillons comptés selon la méthode MTT par rapports aux échantillons comptés manuellement. Les résultats du test HSD de Tukey sur l'effet du nombre de spores dans

un échantillon sur le nombre de copies de marqueurs retrouvées correspondent aux résultats obtenus avec le test HSD de Tukey sur l'effet du nombre de spores dans l'échantillon sur la valeur du cycle seuil. Cela veut dire que pour les échantillons de 50, de 100, de 200, de 400 et de 600 spores, le nombre de copies de marqueurs retrouvé est significativement différent, mais qu'il ne l'est pas pour les échantillons de 600 et de 800 spores.

Pour la variable «nombre de copies de marqueur/spore», si les deux méthodes de comptes ne sont pas aussi efficaces l'une que l'autre, alors l'effet «méthode de compte» devrait être significatif. De plus, si le nombre de copies de marqueur est assez constant pour constituer une unité de quantification pour DAOM220722, alors le «nombre de spores dans l'échantillon» ne devrait pas avoir d'effet significatif sur la variable «nombre de copies de marqueur/spore», selon le modèle d'analyse statistique mixte.

L'analyse de variances du nombre de copies de marqueur par spore indique que cette variable subit également un effet significatif de la méthode de compte ($P = 0,0062$) et du nombre de spores dans l'échantillon ($P = 0,0435$), mais ces deux effets ne s'influencent pas significativement l'un l'autre. Le test T de student est utilisé pour analyser l'effet méthode de compte. Il indique que les valeurs de nombre de copies de marqueurs par spores diffèrent significativement entre les échantillons préparés selon la méthode MTT et les échantillons comptés manuellement. Cela confirme qu'une des deux méthodes est plus efficace que l'autre. Par contre, l'effet du nombre de spores dans l'échantillon ne devrait pas être significatif. Curieusement, le test HSD de tukey sur le nombre de spores dans l'échantillon révèle que peu importe le nombre de spores dans l'échantillon, le nombre de copies/spore détecté n'est pas significativement différent. Les résultats du tableau 23 montrent que le nombre de copies par spore est plus similaire parmi les échantillons préparés à l'aide de la méthode manuelle que parmi les échantillons préparés l'aide de la méthode MTT. Il semble en effet que les échantillons contenant 50 et 100 spores en compte MTT présentent un nombre de copies par spore qui soit différent. Il est probable que cela s'explique par le pipetage de la solution de spores agitée.

Selon la méthode du compte sans coloration, le nombre de copies de marqueur par spore minimal est de 220, et le maximal, de 634. Il y a presque un facteur de 3 entre le minimum et le maximum, ce qui est plutôt vaste. Dans leur article de 2002, Schwarzott &

al. ont décrit un protocole utilisé pour extraire l'ADN d'une seule spore¹⁶⁸. Le protocole de Premier Tech suggère éventuellement de calculer la LQ et la LD en utilisant l'ADN d'une, de 5, de 10, de 25 et de 50 spores. Malheureusement les trousse d'extraction d'ADN sur le marché ne permettent pas l'extraction d'ADN à partir d'une seule spore¹⁶⁹. Il serait intéressant d'utiliser le protocole d'extraction d'ADN à partir de spores seules de Schwarzott pour tenter de définir un nombre de copies par spore plus précis. Il serait alors possible de confirmer les résultats obtenus avec 25 et 50 spores à l'aide de la méthode de Schwarzott et avec une trousse commerciale. Cela permettrait d'établir si la variation est d'ordre métabolique, dû au fait que le nombre de mitochondries varie en fonction du métabolisme^{129,134,170}. Il est également possible que la variation du nombre de copies/spore soit due au mode d'extraction. En effet, l'extraction est une étape cruciale de la quantification absolue, et elle peut constituer une source de variation des résultats^{171,172}.

Tableau 24. Modèle de régression linéaire à effets mixte comparant le Ct, le NMT et le NM/S en fonction de la méthode de compte de spores et du nombre de spores présentes dans l'échantillon.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Méthode de compte	1	8,7481	0,0067
Nombre de spores dans l'échantillon	5	164,9969	<0,0001
Méthode de compte:Nombre de spores dans l'échantillon	5	0,8566	0,5236
Résidus	323		
NMT			
Méthode de compte	1	9,1624	0,0057
Nombre de spores dans l'échantillon	5	164,0939	<0,0001
Méthode de compte:Nombre de spores dans l'échantillon	5	0,9764	0,4516
Résidus	323		
NM/S			
Méthode de compte	1	8,9482	0,0062
Nombre de spores dans l'échantillon	5	2,7109	0,0435
Méthode de compte:Nombre de spores dans l'échantillon	5	0,8822	0,5076
Résidus	323		

Tableau 25. Résultats des tests T de Student et HSD de Tukey sur les effets "Méthode de compte" et "nombre de spores dans l'échantillon" sur les variables sortantes Ct, nombre de mitochondries dans l'échantillon et nombre de mitochondries par spores.

Nombre de spores dans l'échantillon			Résultats des tests HSD de Tukey pour les variables suivantes:		
			Ct	Nombre de mitochondries dans l'échantillon	Nombre de mitochondries/spores
Analyse selon l'effet "méthode de compte"	Compte MTT	50	A	A	A
		100	B	B	B
		200	C	C	C
		400	D	D	D
		600	E	E	E
		800	E	E	E
	Compte manuel	50	A	A	A
		100	B	B	B
		200	C	C	C
		400	D	D	D
		600	E	E	E
		800	E	E	E
Analyse selon l'effet "nombre de spores"	100	Manuel	A	A	A
		MTT	B	B	B
	200	Manuel	A	A	A
		MTT	B	B	B
	400	Manuel	A	A	A
		MTT	B	B	B
	600	Manuel	A	A	A
		MTT	B	B	B
	800	Manuel	A	A	A
		MTT	B	B	B

Ni la méthode MTT, ni la méthode manuelle ne répondent aux critères de validation de chez Premier Tech. Toutefois, une meilleure corrélation linéaire entre le nombre de spores dans l'échantillon et le nombre de copies de marqueur détectées est observée avec la méthode de compte sans coloration (voir figure 13.). En sachant cela, et puisque la méthode de compte sans coloration présente un nombre de copies par spore plus constant, la méthode de compte sans coloration serait à privilégier, même si les résultats obtenus avec cette méthode présentent des coefficients de variation plus élevés que les résultats obtenus avec la méthode MTT. Il est vrai que la méthode de compte sans coloration ne permet pas de discerner les spores viables des spores non-viables, et que les acides nucléiques provenant des spores non-viables peuvent être amplifiés lorsque l'ADN est utilisé plutôt que l'ARN comme molécule de quantification. Cependant, les échantillons environnementaux contiendront des spores non-viables également¹⁶³. En termes de quantification du nombre de spores total, la méthode du compte sans coloration demeure à privilégier, puisqu'il n'existe actuellement pas de moyen rapide et efficace pour séparer les spores viables des non-viables des échantillons de sol avant d'en extraire l'ADN. La détermination des spores viables pourrait se faire par coloration d'échantillons

de sol dilué, en établissant une moyenne du ratio nombre de spores viables/nombre de spores total par gramme de sol, par exemple.

Bien qu'elle implique de grands coefficients de variation, la méthode de compte manuelle reste la meilleure à ce jour. La variation peut toujours être d'ordre métabolique, mais elle peut aussi être due à la seconde étape précédant l'analyse quantitative, soit l'extraction d'ADN. C'est ce qui est étudié avec l'objectif 2.3.

Objectif 2.3: Comparaison de trois méthodes d'extraction d'ADN des échantillons de spores de DAOM220722 par rapport au nombre de copies de marqueurs obtenues

Ce volet a pour objectif d'optimiser l'extraction d'ADN, afin de parvenir à un nombre de copies de marqueur par spore plus précis. Il est important de garder à l'esprit que le protocole d'extraction d'ADN doit éventuellement servir pour des échantillons de sol, et qu'il doit être le plus standardisé possible, afin que son efficacité varie le moins possible d'un expérimentateur à un autre. Beaucoup de laboratoires ont développé leur propre protocole d'extraction d'ADN du sol. Il serait laborieux et coûteux de comparer chacune de ces méthodes, lesquelles ne sont malheureusement pas standardisées. C'est pour cette raison que cette expérience s'attarde plutôt à la comparaison des trois trousse d'extraction d'ADN suivant: le *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Mo Bio), le *E.Z.N.A DNA isolation kit* (Omega Biotech) et le *NucleoSpin soil kit* (Macherey-Nagel). Chacune de ces trousse a servi pour extraire l'ADN de 6 échantillons de 100 spores en milieu simple (suspension d'eau et de spores) et de 6 échantillons de 100 spores en milieu complexe (suspension de spores et de racines dans de l'eau) (voir tableau 5). Les résultats de ces extractions sont représentés à la figure 14 et au tableau 26. Ici encore, aucune des moyennes ne présente un coefficient de variation qui corresponde aux normes de validation de Premier Tech.

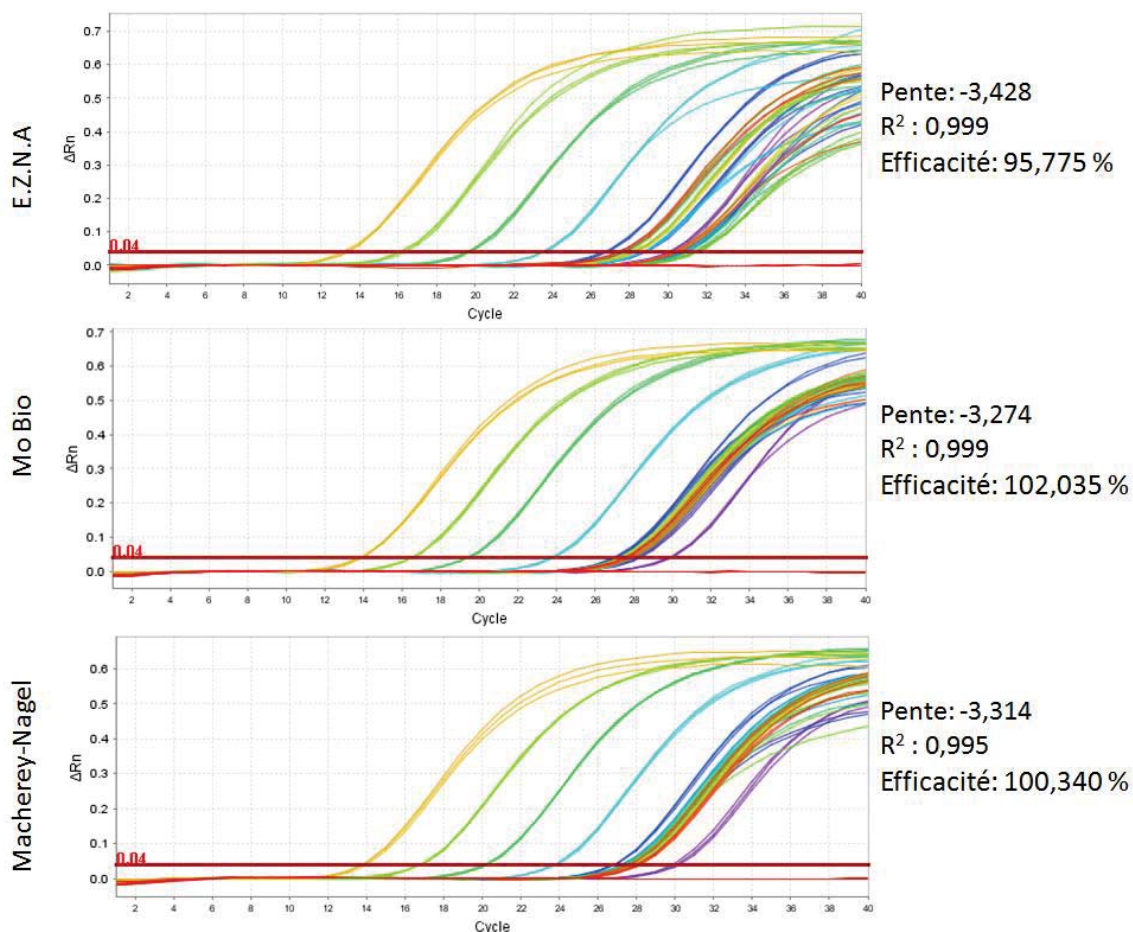


Figure 14. Comparaison des efficacités d'extraction d'ADN de 3 troussees commerciales: détection du nombre de copies de marqueurs en rt-PCR.

Tableau 26. Comparaison de l'efficacité d'extraction d'ADN de 3 troussees commerciales.

Kit d'extraction d'ADN	Type de milieu	Ct de sortie moyen	Nombre de copies de marqueur	Nombre de copies de marqueur/spore moyen	Coefficient de variation (%)
Mo Bio	Simple	27,825	18906	189	16,8
	Complexe	27,672	21053	211	16,8
Macherey-Nagel	Simple	27,543	21449	214	22,2
	Complexe	27,824	17430	174	14,7
E.Z.N.A.	Simple	28,212	14485	145	32,9
	Complexe	30,813	2486	25	26,4

Toutefois, le modèle d'analyse de variance des cycles seuil des échantillons de l'expérience de ce volet indiquent que cette variable subit un effet significatif de la

trousse d'extraction ($P < 0,0001$) et du milieu ($P < 0,0001$). De plus, ces deux effets interagissent de manière significative ($P < 0,0001$) (voir tableau 27). L'analyse de variance des cycles seuils par trousse d'extraction permet d'effectuer un test T de Student pour analyser l'influence de l'effet du milieu sur le cycle seuil. Le test T de Student révèle que seule la trousse E.Z.N.A. présente des cycles seuil significativement différents pour le milieu *simple* et pour le milieu *complexe*. Lorsqu'au contraire, l'analyse de variance des cycles seuil est effectuée selon le milieu des échantillons, le test T de Student indique que les résultats des échantillons extraits avec la trousse E.Z.N.A. (cycle seuil moyen = 30,813) sont significativement différents de ceux des échantillons extraits avec les trousse de chez Mo bio (cycle seuil moyen = 27,672) et de chez Macherey-Nagel (cycle seuil moyen = 27,825). Pour ce qui est des résultats des échantillons en milieu simple, le test T de Student révèle que le cycle seuil des échantillons extraits à l'aide de la trousse E.Z.N.A. (cycle seuil moyen = 28,212) n'est pas significativement différent du cycle seuil des échantillons extraits avec la trousse de chez Mo Bio (cycle seuil moyen = 27,825) et des échantillons extraits avec la trousse de chez Macherey-Nagel (cycle seuil moyen = 27,543).

Afin d'éviter le phénomène d'hétéroscédasticité, les données du nombre de copies de marqueur retrouvées dans un échantillon et les données du nombre de copies de marqueur contenues dans une seule spore selon les échantillons ont subi une transformation Box-Cox avant d'être analysées.

L'analyse de variance d'un nombre de copies de marqueur retrouvées dans un échantillon indique que ce résultat subit un effet significatif de la trousse d'extraction ($P < 0,0001$) et du milieu ($P < 0,0001$), et que ces deux effets interagissent entre eux de manière significative ($P < 0,0001$). L'analyse de variance d'un nombre de copies de marqueur retrouvées dans un échantillon par trousse d'extraction permet d'effectuer un test T de Student pour analyser l'effet milieu sur le nombre de copies de marqueurs dans un échantillon. Sans surprises, le test T de Student révèle que seule la trousse E.Z.N.A. présente un nombre de copies de marqueur moyen significativement différent pour le milieu simple et pour le milieu complexe. Lorsqu'au contraire, l'analyse de variance du nombre de copies de marqueur est effectuée selon l'effet du milieu, le test T de Student indique que les résultats pour le milieu *complexe* des échantillons extraits avec la trousse

E.Z.N.A. sont significativement différents de ceux des échantillons extraits avec les trousse de chez Mo bio et de chez Macherey-Nagel. Pour ce qui est des résultats des échantillons en milieu *simple*, le test T de Student révèle que le cycle seuil des échantillons extraits à l'aide de la trousse E.Z.N.A. n'est pas significativement différent du cycle seuil des échantillons extraits avec la trousse de chez Mo Bio et des échantillons extraits avec la trousse de chez Macherey-Nagel.

L'analyse de variance révèle que le nombre de copies de marqueur par spore subit également les effets significatifs de la trousse d'extraction ($P < 0,0001$) et du milieu ($P < 0,0001$), et que ces deux effets interagissent entre eux de manière significative ($P < 0,0001$). En analysant le modèle selon l'effet de la trousse d'extraction, le test T de student révèle qu'en fait, seule la trousse EZNA présente des nombre de copies de marqueurs par spore significativement différents pour les échantillons en milieu complexe et pour ceux en milieu simple.

Tableau 27. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant le Ct, le NMT et le NM/S en fonction de la trousse d'extraction d'ADN et du milieu.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Trousse d'extraction	2	111,6545	<0,0001
Milieu	1	64,3455	<0,0001
Trousse d'extraction: Milieu	2	56,8796	<0,0001
Résidus	176		
NMT			
Trousse d'extraction	2	109,7824	<0,0001
Milieu	1	62,6723	<0,0001
Trousse d'extraction: Milieu	2	55,3417	<0,0001
Résidus	176		
NM/S			
Trousse d'extraction	2	109,7824	<0,0001
Milieu	1	62,6723	<0,0001
Trousse d'extraction: Milieu	2	55,3417	<0,0001
Résidus	176		

Tableau 28. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant le Ct, le NMT et le NM/S par rapport à l'effet de la trousse d'extraction, en fonction du milieu.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Milieu	1	91,7951	<0,0001
Résidus	176		
NMT			
Milieu	1	91,8022	<0,0001
Résidus	176		
NM/S			
Milieu	1	91,8022	<0,0001
Résidus	176		

Tableau 29. Modèle de régression linéaire à effets mixtes comparant le Ct, le NMT et le NM/S par rapport à l'effet du milieu en fonction de la trousse d'extraction.

Paramètre	Degrés de liberté	F	P
Ct			
Trousse d'extraction	2	203,3432	<0,0001
Résidus	176		
NMT			
Trousse d'extraction	2	200,1353	<0,0001
Résidus	176		
NM/S			
Trousse d'extraction	2	200,1353	<0,0001
Résidus	176		

Tableau 30. Résultats des tests T de Student et HSD de Tukey sur les effets "milieu" et "trousse d'extraction" sur les variables sortantes Ct, nombre de mitochondries dans l'échantillon et nombre de mitochondries par spore.

Nombre de spores dans l'échantillon			Résultats des tests HSD de Tuckey pour les variables suivantes:		
			Ct	Nombre de mitochondries dans l'échantillon	Nombre de mitochondries/spores
Analyse selon l'effet "Trousse d'extraction d'ADN"	PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio) (Mo Bio)	MS	A	A	A
		MC	A	A	A
	NucleoSpin soil kit (Macherey-Nagel) (NSMN)	MS	A	A	A
		MC	A	A	A
E.Z.N.A DNA isolation kit (Omega Biotech) (EZNA)	MS	A	A	A	
	MC	B	B	B	
Analyse selon l'effet "milieu"	Milieu simple (MS)	Mo Bio	AB	AB	AB
		NSMN	A	A	A
		EZNA	B	B	B
	Milieu complexe (MC)	Mo Bio	A	A	A
		NSMN	A	A	A
		EZNA	B	B	B

Les résultats obtenus à l'aide des trousse de chez Mo Bio et de chez Macherey-Nagel ne sont pas significativement différents, mais des tests effectués sur des échantillons de sol chez Biopterre ont révélé que l'efficacité de l'extraction d'ADN de sol est un peu meilleure pour la trousse de chez Macherey-Nagel que pour la trousse de chez Mo Bio. C'est pour cette raison que la trousse d'extraction d'ADN de chez Macherey-Nagel est l'option à privilégier. Selon les résultats de nos analyses obtenus à l'aide de la trousse de chez Macherey-Nagel, le nombre de copies de marqueur moyen est de 195 (résultats pour le milieu complexe et pour le milieu simple confondus, puisqu'ils ne sont

pas significativement différents). Le nombre de copies de marqueur minimal retrouvé est de 122, et le maximal, de 309. Ces chiffres sont significativement plus petits que ceux trouvés lors de l'optimisation de la méthode de compte de spores. Cela est dû au changement de plasmide purifié. Comme nous l'avons mentionné plus haut, le dosage du plasmide purifié est une étape cruciale de la quantification absolue, et malheureusement, c'est souvent ce dernier qui est source de variations.

Bien qu'il reste place à des optimisations des étapes précédant l'analyse quantitative, nous avons décidé de tester les marqueurs de DAOM227022 et DAOM197198 sur des échantillons de sol et de racines dont la mycorrhization a été validée par observation sous le binoculaire. L'idée était de voir comment le marqueur se comporte avec la matrice du sol. C'est ce qui est étudié par l'objectif 3.

Objectif 3.1: Détermination du nombre de spores de DAOM220722 contenues dans des échantillons ayant reçu des inoculations initiales de concentration différentes, pour deux plantes hôtes différentes.

L'objectif 3 du présent mémoire correspond aux tests de deux marqueurs spécifiques respectivement à DAOM197198 et à DAOM220722 sur des échantillons de sol et de racines de cultures en pots contenant des plants de soya ou de pommes de terre inoculés à l'aide de 10 sortes de traitements correspondants à diverses quantités de spores de différents isolats de CMA, tel que spécifié dans le tableau 1. Les traitements 6 et 10 correspondent à deux types d'inoculation de la plante hôte avec des spores de DAOM220722, soit une avec 50 spores de DAOM220722 et 50 spores de DAOM197198, et une avec seulement 50 spores de DAOM220722. C'est pour cela que les échantillons d'ADN provenant des pots inoculés avec ces traitements sont analysés en qPCR à l'aide du marqueur spécifique de DAOM220722. Comme chaque pot de chaque traitement contient le même nombre de spores à l'inoculation, il est attendu que le nombre de spores retrouvées dans les racines et dans le sol soit le même d'un pot à un autre pour le même traitement. L'ADN des échantillons de sol est extrait avec le *NucleoSpin soil kit* de chez Macherey-Nagel, et l'ADN des échantillons de racines est extrait avec le *DNeasy plant mini kit* de chez QIAgen. Afin de vérifier la performance de chacun de ces deux trousseaux d'extraction d'ADN, 4 échantillons de 100 spores de DAOM220722 en milieu *simple* servent de témoins positifs. Les résultats de l'analyse des témoins positifs et

négatifs en qPCR sont présentés au tableau 31. Les témoins négatifs sont en fait des extractions d'ADN où le volume normalement alloué à l'échantillon est remplacé par un volume égal d'eau. L'ADN des témoins positifs est amplifié plus tôt avec le *NucleoSpin soil kit* de chez Macherey-Nagel qu'avec le *DNeasy plant mini kit* de chez QIAgen. Cela signifie que la trousse de chez Macherey-Nagel est plus efficace pour extraire l'ADN des spores de DAOM220722 que la trousse de QIAgen. Par ailleurs, selon les nombres maximal et minimal de copies de marqueur spécifique à DAOM220722 par spore de DAOM220722 établi plus tôt, la trousse de chez Macherey-Nagel permet de retrouver entre 48 et 121 spores sur les 100 spores de DAOM220722 des témoins positifs, avec un coefficient de variation de 33,77%, une performance considérablement plus près de la réalité que ce qui est retrouvé avec le *DNeasy plant mini kit* de chez QIAgen, soit entre 2 et 4 spores de DAOM220722 sur 100, avec un coefficient de variation de 87,50%. Aucun témoin négatif n'est amplifié au cours de l'expérience.

Tableau 31. Résultats de l'analyse quantitative sur les témoins positifs et négatifs de l'objectif 3.

Témoins	Kit d'extraction d'ADN	Ct de sortie moyen	Nombre de spores maximal retrouvé sur 100	Nombre de spores minimal retrouvé sur 100
Positif	<i>NucleoSpin soil kit</i> de chez Macherey-Nagel	28,018 ± 0,481 (1,71%)	121 ± 41 (33,77%)	48 ± 16 (33,77%)
Positif	<i>DNeasy plant mini kit</i> de chez QIAgen	33,479 ± 1,31 (3,91%)	4 ± 4 (87,50%)	2 ± 1 (87,50%)
Négatif	<i>NucleoSpin soil kit</i> de chez Macherey-Nagel	40	0	0
Négatif	<i>DNeasy plant mini kit</i> de chez QIAgen	40	0	0

Il se pourrait que cette efficacité réduite du *DNeasy plant mini kit* de chez QIAgen explique le fait que seules 8 des 45 extractions d'ADN de racines n'ait vu son ADN

amplifié en qPCR (voir tableau 39, annexe). Pour chacune de ces 8 extractions, une seule des trois répétitions techniques présente une amplification. Il est à noter que les échantillons de racines dont l'ADN est amplifié présentent tous des cycles seuil passés le 30^e cycle de qPCR. Selon les données obtenues, les racines de pommes de terre des pots 1 et 4 du traitement 6 ne seraient pas mycorrhizées par DAOM220722, et celles du pot 5 ne le seraient que très faiblement (l'une des répétitions techniques indique que pour 400 mg de racines, on retrouverait entre 1 et 4 spores). En ce qui a trait aux racines de soya du traitement 6, celles du pot 2 seraient fortement mycorrhizées (l'une des répétitions techniques indique que pour 400 mg de racines, on retrouverait entre 137 et 347 spores), alors que celles des pots 4, 5 et 6 ne le seraient pas du tout et que celles du pot 3 ne le seraient que très faiblement (entre 1 et 4 spores de DAOM220722 pour 400 mg de racines).

Les racines de pommes de terre du traitement 10 présenteraient une mycorrhization modérée dans le pot 4 (selon la répétition technique ayant amplifié, entre 19 et 48 spores de DAOM220722 pour 400 mg de racines) et faible dans le pot 5 (selon la répétition technique ayant amplifié entre 2 et 4 spores de DAOM220722 pour 400 mg de racines). Les racines de pommes de terre du pot 3 ne contiendraient aucune spore de DAOM220722 en se basant sur l'analyse qPCR. Pour ce qui est des racines de soya du traitement 10, celles des pots 2 et 5 présenteraient entre 1 et 2 spore pour 400 mg de racines, celles des pots 4 et 6 ne présentent aucune spore de DAOM220722. Il est fort probable que l'analyse qPCR de l'ADN des échantillons de racines sous-estime le nombre de spores présent dans les racines à cause du mode d'extraction d'ADN utilisé pour leur préparation, ainsi que l'indiquent les témoins positifs.

L'analyse des échantillons de sol des pots des traitements 6 et 10 est présentée en détails au tableau 39 (voir annexe). Il est à noter qu'aucun des échantillons d'ADN ayant amplifié lors de l'expérience n'amplifie avant le 35^e cycle. Les sols des pots 1 et 4 contenant des plants de pommes de terre du traitement 6 ne contiennent aucune spore de DAOM220722 selon l'analyse qPCR. Pour ce qui est du sol du pot 5, deux des trois extractions de 250 mg de sol analysées en qPCR ne contiennent aucune spore de DAOM220722. La troisième extraction présente cependant une amplification pour deux des trois répétitions techniques, selon laquelle le sol de ce pot contiendrait entre 1 et 4

spores. Le coefficient de variation est de 8,53%. Aucun des échantillons de sol des pots contenant un plant de soya du traitement 6 ne contient de spores de DAOM220722.

Pour ce qui est du traitement 10, le sol du plant de pommes de terre du pot 5 ne contient aucune spore selon l'analyse qPCR, mais le sol des pots 3 et 4 semblent en contenir. En effet, l'ADN des extractions 1 et 2 faites sur le pot 3 a amplifié pour les trois répétitions technique, alors que l'ADN de l'extraction 3 du pot 3 n'a amplifié que pour une répétition technique. Selon ces données, le sol du pot de pommes de terre 3 contiendrait entre 6 et 16 spores de DAOM220722. Le coefficient de variation du nombre de spores dans le sol du pot 3 est de 68,25%. L'ADN des extractions 2 et 3 faites sur le sol des pommes de terre du pot 4 ont amplifié pour respectivement 3 et 2 répétitions techniques. Selon ces données, le sol du pot de pommes de terre 4 contiendrait entre 2 et 5 spores de DAOM220722, avec un coefficient de variation de 62,40%. L'ADN des extractions faites sur le sol des plants de soya des pots 4, 5 et 6 du traitement 10 n'ont pas amplifié, ce qui porte à croire que le sol de ces pots ne contient aucune spore de DAOM220722. Seul l'une des répétitions technique de l'analyse qPCR de l'ADN de l'extraction 3 du pot 2 contenant un plant de soya a amplifié. Selon cette donnée, entre 1 et 3 spores de DAOM220722 seulement se trouveraient dans la totalité du sol du pot 2.

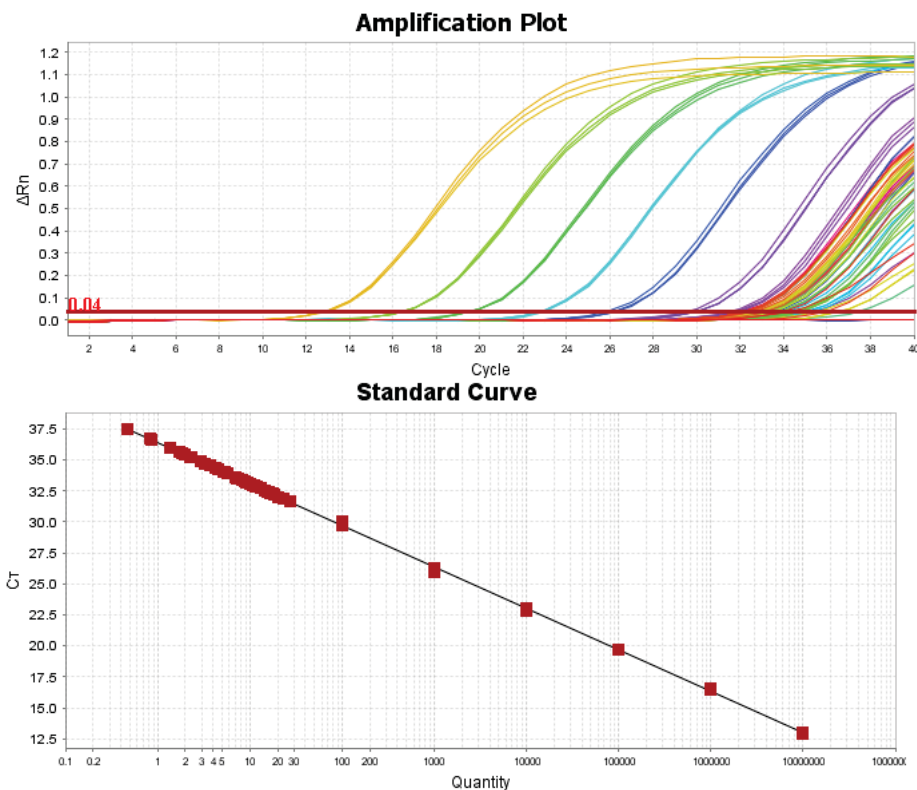
Le peu de répétitions dont l'ADN a amplifié ainsi que les coefficients de variation élevés de cette expérience ne permettent pas de conclure à l'efficacité du marqueur ou à une quantité de spores crédible retrouvée dans les racines et dans le sol des pots des deux différents traitements. Le fait que les répétitions dont l'ADN amplifient le font après le dernier point de la courbe standard contribue au peu de fiabilité de ces résultats. Il semble que le protocole doit être amélioré pour réduire les variations et augmenter le nombre d'amplifications. Les trois répétitions techniques devraient amplifier de la même manière. Comme ce n'est pas le cas, malgré le fait que cette expérience se déroule selon les mêmes conditions que les précédentes, il semble que ce phénomène soit lié au fait qu'il s'agit d'échantillons provenant du sol. En fait, cela est probablement dû au fait que les étapes précédant l'analyse quantitative n'aient été optimisées que pour les matrices des inoculants commerciaux, soient le milieu *complexe* et le milieu *simple*, plutôt que sur les différents types de sol. Par conséquent, le marqueur sera relativement efficace pour la quantification dans les inoculants commerciaux, mais pas dans le sol, pour lequel le

processus de préparation des échantillons et d'extraction d'ADN n'a pas été mis au point. Le sol constitue en effet une matrice complexe, plus dense et truffée de molécules inhibitrices de la réaction PCR.

Le marqueur spécifique à DAOM197198 a subi les mêmes optimisations des étapes précédant l'analyse quantitative que le marqueur DAOM227022. Nous avons donc décidé d'étudier son efficacité dans la matrice complexe qu'est le sol, afin de pouvoir comparer l'efficacité des deux marqueurs. Si des résultats similaires sont obtenus à l'aide du marqueur de DAOM197198, alors c'est que le protocole d'optimisation des étapes précédant l'analyse quantitative doit être refait pour les deux marqueurs dans la matrice du sol.

Objectif 3.2: Détermination du nombre de spores de DAOM197198 contenues dans des échantillons ayant reçu des inoculations initiales de concentration différentes, pour deux plantes hôtes différentes.

Dans le but de vérifier si le type de résultats obtenus à l'aide du marqueur spécifique à DAOM227022 n'est attribuable qu'à une inefficacité du marqueur et non à une inefficacité du protocole établi, le marqueur DAOM197198 est testé sur les échantillons provenant des pots du traitement 2. Le traitement 2 est sélectionné, car c'est celui présentant la plus grande quantité d'inoculant initiale, soit 100 spores de DAOM197198. Ce faisant, il n'y a pas d'effet de compétition inter-espèces dans les pots contenant ce traitement. Il serait donc attendu que ce pot soit le plus fortement mycorrhizé. Selon les résultats obtenus à l'aide du marqueur de DAOM227022, la pomme de terre semble être plus susceptible d'être mycorrhizée que le soya. C'est pour cela que le marqueur de DAOM197198 est d'abord testé sur les échantillons de racines et de sol de pommes de terre du traitement 2. Les résultats de l'expérience sont présentés à la figure 15 et au tableau 32.



Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	cox3-rnl	-3.345	36.429	0.999	99.026

Figure 15. Quantification du marqueur spécifique à DAOM197198 dans les échantillons de sol et de racines de pomme de terre du traitement 2.

Tableau 32. Quantification du marqueur spécifique à DAOM197198 dans les échantillons de sol et de racines de pomme de terre du traitement 2.

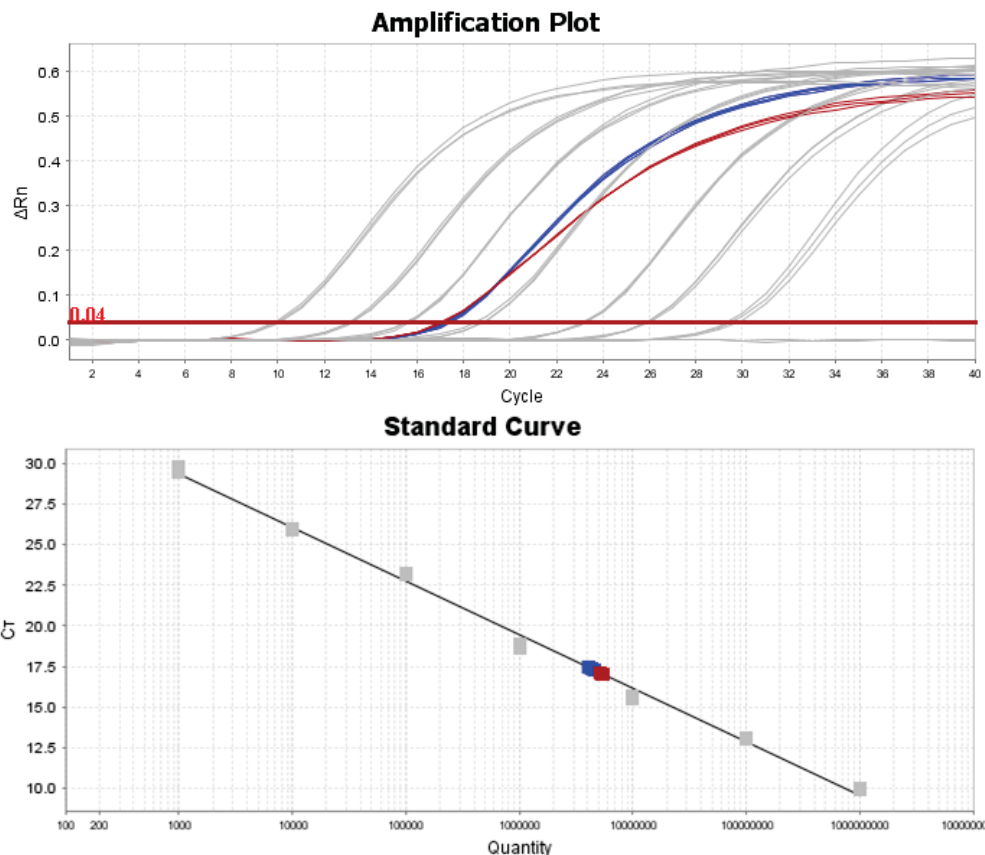
Racines	Numéro de pot	Ct de sortie moyen	Nombre de copies moyen	Nombre de spores dans 20 mg de racines broyées à l'azote liquide	Nombre de spores dans 400 mg de racines	Coefficient de variation (%)
	3	33,926	250	0,08	2	55,5
4	33,981	262	0,08	2	77,6	
5	32,497	601	0,19	3	41,5	
Sol	Numéro de pot	Ct de sortie moyen	Nombre de copies moyen	Nombre de spores dans 250 mg de fraction fine de sol	Nombre de spores dans tout le sol du pot	Coefficient de variation (%)
	3	35,159	153	0,05	3	97,7
4	34,480	163	0,05	4	77,6	
5	32,739	491	0,16	8	41,5	

L'ADN des échantillons de racines des pots 3, 4 et 5 amplifie en moyenne au cycle 33,468, ce qui se traduit en moyenne par 2 spores dans 400 mg de racines broyées à

l'azote liquide. L'ADN des échantillons de sol des pots 3, 4 et 5 amplifié en moyenne au cycle 34,015, ce qui équivaut en moyenne à 2 spores dans 100 g de sol.

Les données obtenues selon l'analyse du traitement 2 à l'aide du marqueur spécifique à DAOM197198 démontrent que l'ADN des échantillons de 250 mg de fraction fine du sol extraits à l'aide du *NucleoSpin soil kit* de chez Macherey-Nagel amplifient tous après le dernier point de la courbe standard. Il est possible d'ajouter une dilution 1:10 pour obtenir un point de plus dans la courbe standard, mais le nombre de copies contenues dans le volume d'ADN plasmidique dans la réaction est alors si dilué que le cycle seuil varie grandement pour trois répétitions techniques analysés sur une même plaque. Il faut donc trouver une manière d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour que l'amplification se produise plus tôt au cours des cycles de la qPCR, ou du moins assez tôt pour être inclus dans la courbe standard, afin que les résultats obtenus soient assez fiables. De plus, trois échantillons de 250 mg de fraction fine de sol peuvent difficilement être représentatifs des 10g en moyenne de fraction fine, étant donné l'hétérogénéité du sol, et l'importance de l'effort d'échantillonnage soulignée par Whitcomb¹⁷³.

Pour augmenter la concentration de l'ADN des échantillons ainsi que leur représentativité, le *PowerMax Soil DNA isolation kit* de chez Mo Bio est utilisé pour extraire l'ADN de deux échantillons de 10 g de fraction fine de sol du traitement 2, soient le pot 4 contenant un plant de pomme de terre, et le pot contenant un plant de soya #3. L'élution de l'ADN se fait dans 2 mL de tampon d'élution. Dans leur article de 2012, Thonar et al. utilisent un plasmide qui contient un insert non-cible comme témoin pour vérifier la qualité de l'extraction d'ADN¹⁷⁴. C'est la raison pour laquelle 10 000 000 000 copies de plasmide contenant l'insert spécifique à DAOM220722 sont ajoutées à l'échantillon avant l'extraction de l'ADN. Cela s'appelle un «ACP» (ADN Contrôle Positif), et cela permet de mesurer l'efficacité de l'extraction d'ADN et la perte d'ADN subie lors de l'extraction d'ADN. Avant de tenter de concentrer davantage l'ADN de ces extractions, ceux-ci sont analysés en qPCR. Les résultats de cette expérience sont présentés aux figures 16 et 17, et dans les tableaux 33 et 34.



Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	nad1-cox2	-3.293	39.211	0.996	101.239

Figure 16. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de pomme de terre du 4^e pot du traitement 2 (PS2.4) et du sol de plant de soya du 3^e pot du traitement 2 (SS2.3) dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM220722. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.

Tableau 33. Pourcentage de l'ACP retrouvé après l'extraction d'ADN des échantillons de pomme de terre et de soya.

Échantillon	Cycle d'amplification moyen	Nombre de copies de marqueur dans 10 g de fraction fine de sol	Nombre de copies marqueur attendu dans l'échantillon de	Pourcentage du nombre de copies attendu retrouvé (%)	Coefficient de variation (%)
PS2.4	17,072	2,9 E + 06	1,4 E +07	20,9	2,6
SS2.3	17,361	2,4 E + 06	1,4 E +07	16,9	5,7

Plus précisément, la figure 20 et le tableau 36 présentent les résultats obtenus avec le marqueur de DAOM220722. La plupart des kits d'extraction d'ADN permettent de retrouver entre 70 et 95% de l'ADN d'un échantillon. C'est donc ce qui est attendu comme

pourcentage de recouvrement de l'ACP. L'ACP consiste en un ajout de 100 μL de plasmide contenant la séquence spécifique à DAOM220722 concentré à $10 \text{ E} + 08$ copies/ μL dans l'échantillon avant l'extraction d'ADN, ce qui constitue $10 \text{ E} + 10$ copies de plasmide ajoutés dans l'échantillon. Entre $7,0 \text{ E} + 09$ et $9,5 \text{ E} + 09$ copies du plasmide devraient être retrouvées après l'extraction d'ADN, selon les indications du fabricant. Traditionnellement, le premier point de la courbe standard du marqueur de DAOM220722 contient $10 \text{ E} + 07$ copies de plasmides. Vu la quantité de plasmide attendue, deux points ont été ajoutés à la courbe. Le premier point de la courbe ainsi ajustée représente $10 \text{ E} + 09$ copies de marqueur, et le 2e, $10 \text{ E} + 08$ copies de marqueur. L'ACP devrait amplifier entre le 1er et le 2e point de la courbe, mais il amplifie plutôt entre le 3e et le 4e point de la courbe. Le tableau 36 indique d'ailleurs que seul 20,9% et 16,9% des plasmides inclus dans l'ACP sont respectivement retrouvés pour les échantillons PS2.4 et SS2.3.

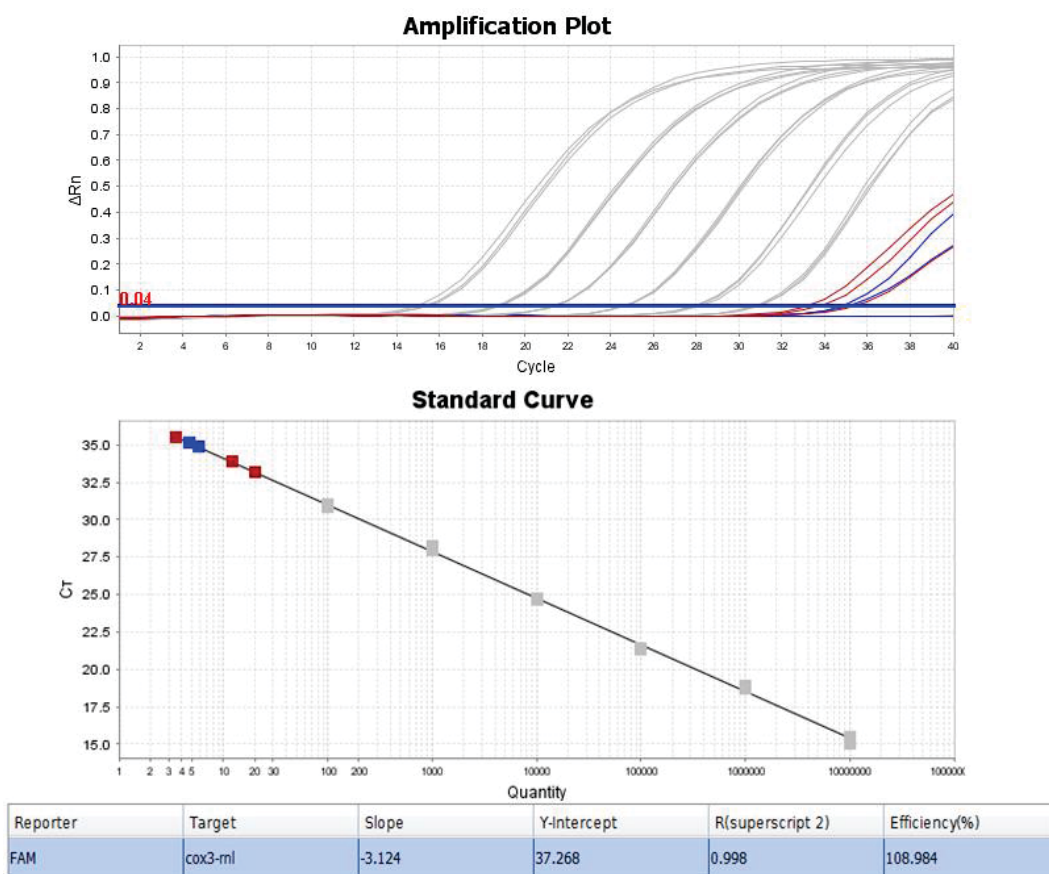


Figure 17. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.4 et SS2.3 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide

du marqueur spécifique à DAOM197198. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.

Tableau 34. Nombre de spores retrouvées dans 10g de fraction fine de sol de PS2.4 et SS2.3 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM197198.

Échantillon	Cycle de sortie moyen	Nombre de copies de marqueur retrouvées dans 200 g de sol	Nombre de copies de marqueur par spores	Nombre de spores retrouvées dans 200 g de sol	Nombre de spores ajusté selon le pourcentage du spike retrouvé après l'extraction d'ADN	Coefficient de variation (%)
PS2.4	34,206	44 590	3172	14	67	67,0
SS2.3	35,031	20 572	3172	6	38	14,4

La figure 18 et le tableau 34 représentent les résultats obtenus à l'aide du marqueur de DAOM197198. L'ADN des deux échantillons n'amplifie qu'après le dernier point de la courbe, malgré le nouveau kit d'extraction d'ADN utilisé. Par ailleurs, pour PS2.4, l'ADN est amplifié en moyenne au cycle 34,206, ce qui représente en moyenne 14 spores dans 200 g de sol. Par contre, considérant que seul 20,9% de l'ACP est retrouvé après le protocole d'extraction, la quantité réelle de spores dans 200 g de sol du pot 4 contenant un plant de pommes de terre inoculé avec le traitement 2 pourrait plutôt avoisiner les 67 spores. Le coefficient de variation relatif à ces mesures est de 67% ce qui est toutefois très élevé. Cela est dû à l'ADN d'une des répétitions technique qui est amplifié beaucoup plus tard que les autres. L'ADN de l'échantillon SS2.3 est amplifié en moyenne au cycle 35,031, ce qui correspond à 6 spores dans 200g de sol. En ajustant cette quantité selon le pourcentage de l'ACP retrouvé à l'aide du marqueur de DAOM220722, la quantité réelle de spores dans 200 g de sol de l'échantillon SS2.3 pourrait avoisiner les 38 spores. Le coefficient de variation est moins élevé ici, mais seules deux répétitions techniques sur trois ont amplifié. Il est à noter que cette variation parmi les répétitions techniques d'une réaction n'est observée que pour les échantillons, et non pour les points de la courbe standard.

Afin d'obtenir des amplifications plus rapidement au cours de l'analyse qPCR, l'ADN des échantillons PS2.4 et SS2.3 a été concentré dans un volume final de 100 µL (l'éluion du protocole d'extraction d'ADN se faisait dans 2 mL, ce qui constitue un facteur de concentration de 20X). Les résultats de cette expérience sont présentés aux figures 18 et 19. L'ADN d'aucun des échantillons n'a été amplifié avec aucun des deux

marqueurs.

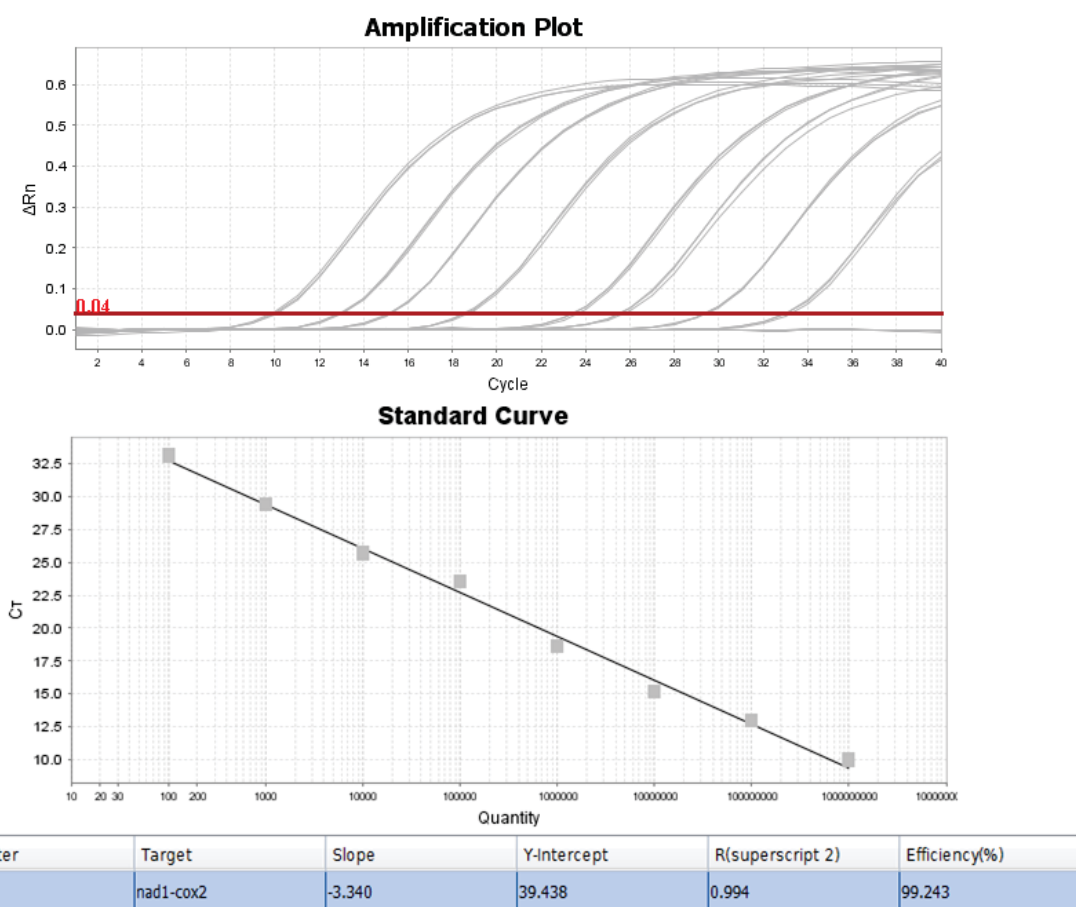


Figure 18. Résultats de l'analyse qPCR de l'ADN concentré 20X des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.4 et de SS2.3 à l'aide du marqueur spécifique à DAOM220722. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.

À partir de ce moment, la présence d'inhibiteurs dans les échantillons d'ADN provenant des fractions fines de sol est suspectée. En concentrant l'ADN, les inhibiteurs présents seraient également concentrés. Pour cette raison, une petite expérience sans courbe standard est menée pour vérifier si un échantillon connu, soit le premier point de la courbe du marqueur de DAOM197198, est amplifié normalement lorsque mêlé à l'ADN concentré 20X de PS2.4 et lorsque mêlé à l'ADN concentré 20X de SS2.3. Aucun ADN n'est amplifié sous ces conditions.

Cependant, l'une des méthodes pour diminuer l'effet des inhibiteurs du sol lorsque l'ADN des échantillons est très concentré est tout simplement de diluer l'ADN des échantillons¹⁵³. C'est pour cela que l'ADN du premier point de la courbe standard est

utilisé comme témoin positif d'une dernière expérience, lors de laquelle 2,7 μ L d'ADN du premier point de la courbe est ajouté à 2,7 μ L de diverses dilutions des versions originales et concentrées 20X de l'ADN des échantillons PS2.4 et SS2.3. Cette expérience est également testée à l'aide d'un nouveau mix, soit le *Taqman Environnemental Mastermix* de chez LifeTechnologies. Les résultats sont présentés au tableau 35. Le premier point de la courbe utilisé seul amplifie au cycle 14,303 avec le mix de Lifetechnologies, et au cycle 14,017 avec le mix de Biorad. D'emblée, on remarque que les échantillons concentrés 20X n'amplifient pas lorsque l'on utilise le *Taqman universal probes supermix* de Biorad, et amplifient de 2 à trois cycle plus tard que le témoin avec le *Taqman Environnemental Mastermix* de chez LifeTechnologies. Clairement, la concentration de 20X de l'ADN des échantillons PS2.4 et SS2.3 inhibe la réaction de qPCR. Par contre, l'efficacité de la réaction de qPCR est retrouvée pour toutes les autres formes de dilution, car le premier point de la courbe est à peu de chose près toujours amplifié aux alentours du 14e cycle.

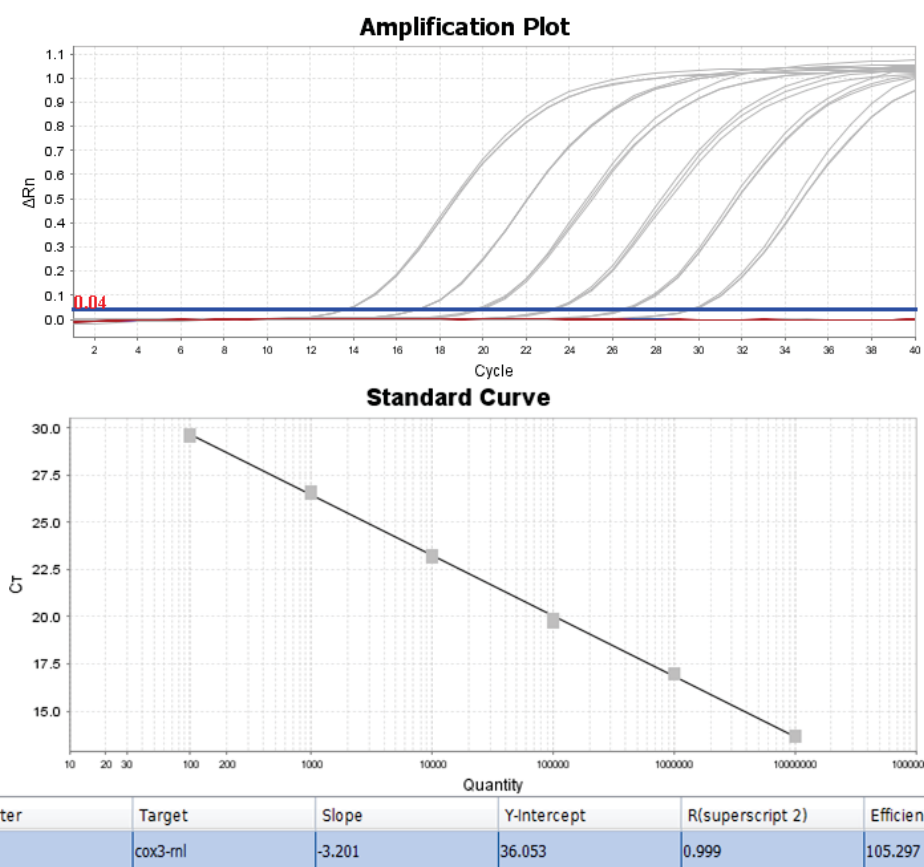


Figure 19. Résultats de l'analyse qPCR de l'ADN concentré 4X des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.4 et de SS2.3 à l'aide du marqueur spécifique à

DAOM197198. En gris, les points de la courbe standard; en rouge, les échantillons de PS2.4 et en bleu, les échantillons de SS2.3.

Tableau 35. Vérification de la présence d'inhibiteurs dans les échantillons de PS2.4 et SS2.3: efficacité de la réaction de qPCR contenant 2,7 µL du premier point de la courbe du marqueur de DAOM197198 en combinaison avec 2,7 µL d'eau (témoin), et avec 2,7 µL de diverses dilutions des versions originales et concentrées 20X de l'ADN de PS2.4 et SS2.3.

Échantillon		Mix de qPCR				
		Taqman Environmental Mastermix (Lifetechnologies)		Taqman universal probes supermix (Biorad)		
		Ct de sortie moyen	Coefficient de variation (%)	Ct de sortie moyen	Coefficient de variation (%)	
Témoin		14,303	0,23	14,017	0,66	
Plante hôte	Soya (SS2.3)	20X	17,941	3,97	N/A	N/A
		1X	14,290	0,08	13,585	0,68
		20X (1:5)	14,202	0,25	13,390	0,23
		1X (1:5)	14,192	0,23	14,043	0,02
		20X (1:10)	14,240	0,16	13,701	0,02
		1X (1:10)	14,222	0,43	14,068	0,36
	Pomme de terre (PS2.4)	20X	16,084	0,97		
		1X	14,314	0,04	13,550	0,43
		20X (1:5)	14,149	0,04	13,305	0,14
		1X (1:5)	14,171	0,37	13,987	0,06
		20X (1:10)	14,082	0,35	13,423	0,24
		1X (1:10)	14,171	0,28	13,986	0,08

Finalement, le *PowerMax Soil DNA isolation kit* est utilisé pour extraire l'ADN de 10g de fraction fine de sol des échantillons PS2.5 et SS2.6, afin de vérifier si les résultats précédents sont attribuables simplement aux échantillons PS2.4 et SS2.3 ou à tous les échantillons du traitement 2. Les résultats sont présentés aux figures 20 et 21 et aux tableaux 36 et 37.

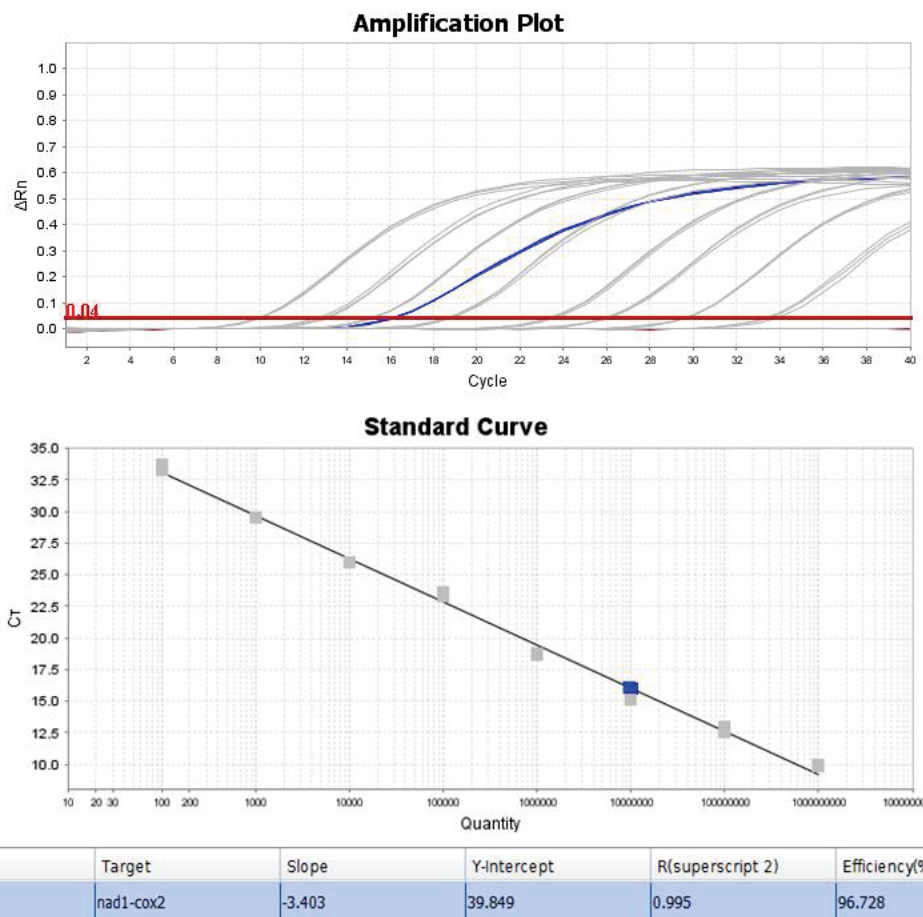


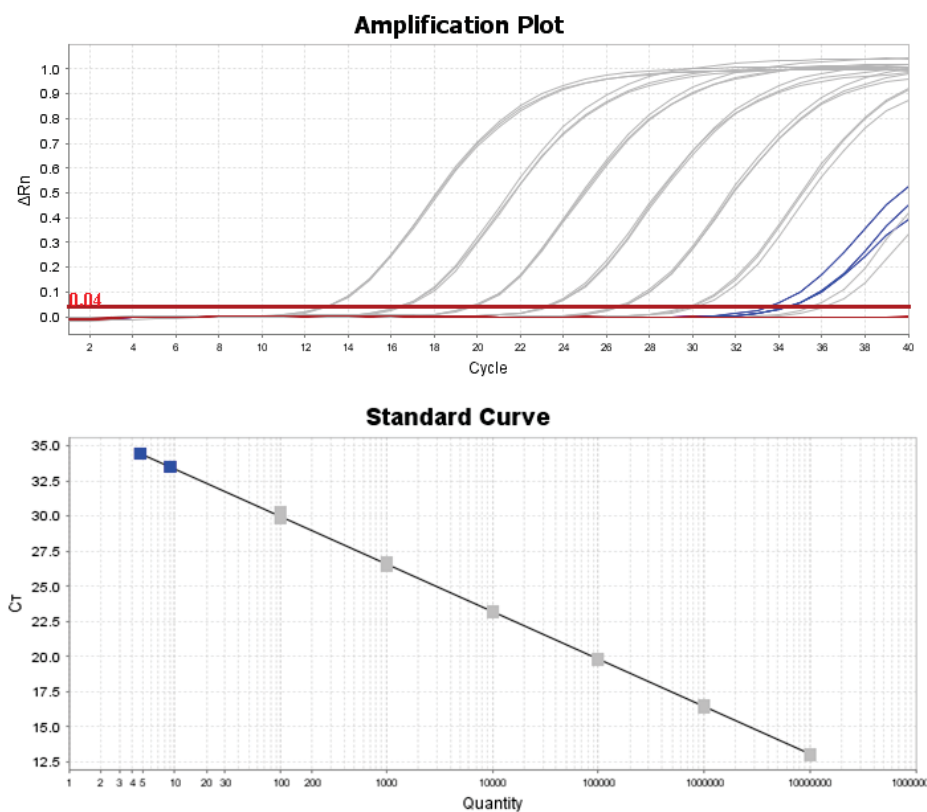
Figure 20. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.6 et SS2.6 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM220722. En gris, les points de la courbe standard, en bleu, les échantillons SS2.6, en rouge, les échantillons PS2.5

Tableau 36. Pourcentage de l'ACP retrouvé après l'extraction d'ADN des échantillons de PS2.5 et de SS2.6. «N/A» signifie «non-amplifié».

Échantillon	Cycle d'amplification moyen	Nombre de copies de marqueur dans 10 g de fraction fine de sol	Nombre de copies marqueur attendu dans l'échantillon de	Pourcentage du nombre de copies attendu retrouvé (%)	Coefficient de variation (%)
PS2.5	N/A	N/A	1,4 E + 07	N/A	N/A
SS2.6	16,023	1,0 E + 07	1,4 E + 07	74,3	2,3

Plus précisément, le tableau 36 indique que l'extraction d'ADN de l'échantillon PS2.5 a dû échouer, puisque l'ACP n'est pas amplifié avec le marqueur de DAOM220722. Pour l'échantillon SS2.6, on retrouve 74,3% de l'ACP, ce qui correspond aux valeurs attendues. L'échec de l'extraction d'ADN de l'échantillon PS2.5 est confirmé

par l'analyse avec le marqueur de DAOM197198, puisqu'avec ce dernier également, aucune amplification n'est obtenue. Dans l'échantillon SS2.6, on retrouve en moyenne 3 spores pour 200 g de sol, un chiffre qui devient 4 spores pour 200 g de sol en ajustant selon le pourcentage de l'ACP retrouvé après l'extraction d'ADN.



Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	cox3-rtl	-3.397	36.796	1.000	96.948

Figure 21. Analyse en qPCR des échantillons de 10 g de fraction fine de sol de PS2.6 et SS2.6 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM197198.

Tableau 37. Nombre de spores retrouvées dans 10 g de fraction fine de sol de PS2.5 et SS2.6 dont l'ADN est extrait à l'aide du *PowerMax Soil DNA isolation kit* à l'aide du marqueur spécifique à DAOM197198.

Échantillon	Cycle de sortie moyen	Nombre de copies de marqueur retrouvées dans 200 g de sol	Nombre de copies de marqueur par spores	Nombre de spores retrouvées dans 200 g de sol	Nombre de spores ajusté selon le pourcentage du spike retrouvé après l'extraction d'ADN	Coefficient de variation (%)
PS2.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SS2.6	34,174	8 201	3172	3	4	40,2

Peu importe le pot d'où provient l'échantillon de sol du traitement 2, on constate les mêmes énormes coefficients de variation ainsi que les mêmes cycles d'amplification tardifs, et ce malgré l'efficacité confirmée de l'inoculation de la culture *in vivo*. Les inhibiteurs se retrouvent en trop grande concentration lorsque l'ADN des échantillons est concentré 20X, mais le signal qPCR est retrouvé lorsque l'ADN concentré est dilué 1:5 ou 1:10. Peut-être qu'en ajoutant une étape de purification à la fin de la concentration d'ADN, il serait possible de réduire l'effet des inhibiteurs sur l'ADN concentré, mais puisque les dilution 1:10 et 1:5 de l'ADN concentré 20X donnent des résultats similaires à ceux obtenus avec l'ADN non concentré, et ce malgré leur concentration de deux à quatre fois plus élevée, l'effet des inhibiteurs ne doit pas être la cause principale de ces cycles d'amplification bas.

L'extraction d'ADN des communautés microbiennes du sol constitue un défi. En effet, les protocoles d'extraction d'ADN de sol, maison ou commerciaux, ont pour la plupart été standardisés davantage pour les bactéries que pour les Fungi^{153,154}. En effet, les spores fongiques possèdent une paroi cellulaire plus robuste¹⁵⁴. Il est possible que l'étape de lyse cellulaire ne soit pas optimale. En effet, l'utilisation d'une méthode de lyse similaire pour les spores de DAOM197198 et de DAOM220722 n'est pas le choix idéal. Les spores de DAOM197198 sont significativement plus grosses que les spores de DAOM220722, et il semble que ces dernières parviennent à se glisser dans les interstices entre les billes lors de la lyse cellulaire, ce qu'il est possible d'observer à la figure 22. La figure 22 représente l'observation à la loupe binoculaire du lysat. On y remarque des spores non-lysées, mais aussi des spores qui semblent avoir été lysées mais dont le cytoplasme ne semble pas s'être dissout dans le mélange, lesquelles seront décrites comme «partiellement lysées». Il semble également que les spores non-lysées, les spores partiellement lysées et les débris cellulaires s'agrègent ensemble. Par conséquent, il faut ré-ajuster le protocole de lyse cellulaire selon l'espèce de CMA ciblée, mais idéalement également selon la matrice dans laquelle ils se trouvent. Plusieurs méthodes de lyse différentes existent, physiques ou chimiques. Parmi les méthodes physiques, on retrouve les cycles de congélation/décongélation, la sonification et le battage à billes^{154,175} (la méthode privilégiée ici). Le battage à billes semble être la méthode la plus efficace parmi les lyses physiques, mais elle doit être ajustée, car le temps de battage, l'intensité du

battage et la taille et la constitution des billes utilisées fera varier l'efficacité de la lyse¹⁵⁴. Parmi les méthodes de lyse chimiques, on compte l'ajout de détergents tels que le SDS à 1% ou l'ajout d'enzyme de dégradation ou de lysozymes, et la concentration des sels à 1M ou plus. Il faut cependant être prudent avec la digestion enzymatique, laquelle peut résulter en une dégradation de l'ADN. Des résultats optimaux sont souvent obtenus en combinant plusieurs méthodes de lyse cellulaire^{153,154,175}.

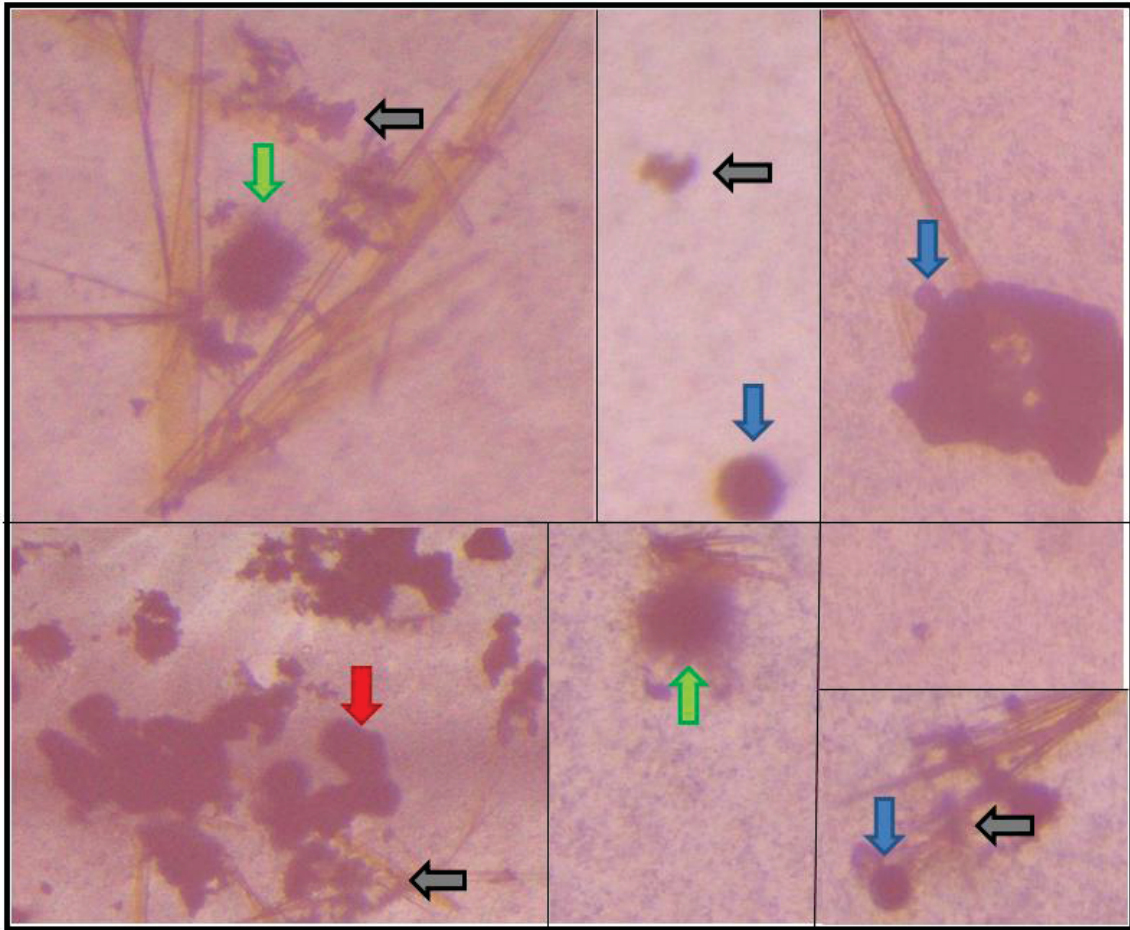


Figure 22. Vérification de la lyse cellulaire à l'aide du kit d'extraction d'ADN de chez Mo Bio. Les flèches bleues indiquent des spores non-lysées; les flèches vertes indiquent des spores partiellement lysées; les flèches grises indiquent des débris cellulaires; la flèche rouge indique un agrégat de spores non-lysées et partiellement lysées.

Toutefois, avant l'extraction, l'une des causes qui pourraient expliquer les cycles d'amplification tardifs est la dégradation de l'ADN due aux conditions d'entreposage. En effet, l'article d'Almakarem & al. de 2012 explique qu'après le transport des échantillons des champs aux laboratoires, ainsi qu'après le transport inter-laboratoires, la dégradation

des acides nucléiques est souvent observée¹⁷⁶. Les communautés microbiennes du sol varient sur de petites échelles temporelles et spatiales. En fait, la meilleure manière de conserver les échantillons est de les mettre dans la glace sèche aussitôt prélevés sur le terrain ou d'en extraire l'ADN sur place. L'entreposage sur la paille ou à 4°C n'est pas suggéré, puisqu'il peut résulter en une prolifération des micro-organismes qui tolèrent mieux le froid présents dans les échantillons de sol, tels que les *Pseudomonades*. Les échantillons de sol ont été entreposés à -20°C. Apparemment, ce n'est pas optimal. Par contre, la conservation des échantillons à -80°C pourrait compliquer le tamisage pré-extraction. Les conditions de tamisage doivent être également calibrées, en faisant varier le temps de tamisage des échantillons. Toutefois, en utilisant le *PowerMax Soil DNA isolation kit* de chez Mo Bio, il serait peut-être possible de simplement éliminer l'étape de tamisage et de prélever directement 10 g de sol sur le terrain. En utilisant ce kit, il faut pouvoir concentrer l'ADN et surtout le purifier après concentration. Il existe plusieurs manières d'améliorer le signal fluorescent lié à l'ADN lors de l'analyse quantitative subséquente à l'extraction d'ADN de sol. Parmi celles-ci, on compte la chromatographie hydroxyapatite; la chromatographie d'échange d'ions; le gradient de concentration au césium chloride ethidium bromide; la concentration d'ADN à l'aide de filtration sélective et lavage; la précipitation de l'ADN à l'éthanol ou au propanol suivie de lavages, l'adsorption des inhibiteurs par l'ajout de polyvinylpyrrolidone (PVPP) soluble ou de protéines telles que du bovine sérum albumine; l'électrophorèse avec le découpage de la bande d'ADN. Pour sauver du temps, certains protocoles sélectionnent, précipitent et adsorbent chaque inhibiteur indépendamment durant le protocole d'extraction en ajoutant du cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) ou de l'acétate d'ammonium, ou du polyéthylène glycol (PEG) pour la précipitation^{153,154,176}. Il est possible de combiner ces méthodes, et en général, plus le protocole de purification est long et coûteux, meilleure est son efficacité. La plupart des kits commerciaux ont 2 sur trois des qualités suivantes, abordable, efficace, rapide. Ils tendent à combiner les méthodes de lyse chimique et de lyse physique (par battage à billes), et utilisent la floculation chimique contre les inhibiteurs phénoliques, ainsi qu'une précipitation à l'ammonium d'acétate et des lavages sur colonne de silicate. Schneegurt et al. et Koide et al. ont tenté de développer des

protocoles d'extraction d'ADN du sol qu'il serait intéressant d'explorer, même s'ils sont longs et potentiellement dispendieux.

Pour pouvoir bien évaluer l'efficacité des protocoles d'extraction d'ADN de sol, un nombre de copies de mitochondries par spore doit être disponible. Or, comme l'activité du CMA peut varier d'une saison à l'autre, des échantillonnages de spores devraient être effectués sur le terrain à intervalles d'un mois durant la période comprenant le printemps, l'été et l'automne. Il serait alors possible, à chaque mois, de tester la linéarité entre le nombre de copies de marqueur sur une série de nombre élevés de spores (50, 100, 200, 400, 600 et 800 spores) en utilisant un kit commercial et sur une série de nombre de spores plus bas (1, 5, 10, 25 et 50 spores) en utilisant le protocole de Schwarzott. Cela permettrait de comparer et de valider le nombre de mitochondries par spores de DAOM220722 et de DAOM197198 à chaque saison. Certes, le processus serait long, parce qu'il faudrait rapidement tamiser le sol et diluer la fraction fine pour compter les spores sous le binculaire, mais il suffirait de le faire une fois pour détenir de l'information précieuse qui permettrait d'établir un suivi de la quantité moyenne de spores dans le sol pour les années subséquentes.

Conclusion

Le projet de quantification des CMA dans le sol constitue une nouvelle méthode bio-analytique qui diffère de la plupart des méthodes bio-analytiques conventionnelles. En effet, l'unité de base de quantification du composé cible est généralement connue. Par exemple, il peut s'agir d'une concentration d'un composé chimique par volume d'un liquide ou par gramme d'un tissu organique. Dans le cas du protocole de quantification des CMA, cette unité n'est pas encore définie et c'est ce que nous avons tenté de faire lors du présent projet. Vu l'inefficacité et l'imprécision des méthodes traditionnelles de quantification des CMA, il faut se tourner vers les marqueurs moléculaires ciblant l'ADN, et comme l'ADN nucléaire présente trop de variations pour constituer une unité de quantification fiable, l'ADN mitochondrial est la meilleure option pour l'instant. Par contre, à cause de sa nature même, l'ADN mitochondrial constitue une unité de quantification qui risque de varier selon le métabolisme de l'hôte et selon les saisons. De plus, il est bien important de comprendre que le nombre de copies de marqueur mitochondrial par spore peut différer d'une espèce à l'autre, comme c'est le cas pour *Glomus irregulare* DAOM197198 et *Glomus cerebriforme* DAOM227022. Premier Tech a déjà établi un protocole de quantification des spores de DAOM197198 validé dans les matrices que sont le milieu *simple* et le milieu *complexe*, parce qu'un nombre de copies de marqueur par spore assez stable a été retrouvé pour cet isolat. Pour DAOM227022, le nombre de copies de marqueur par spore retrouvé en appliquant un protocole de quantification similaire à celui de DAOM197198 est variable. Cela indique qu'il n'est pas possible de traiter deux espèces de CMA différentes de la même manière. En effet, les spores de DAOM197198 sont beaucoup plus grosses que les spores de DAOM227022, ce qui explique qu'une lyse optimisée pour DAOM197198 puisse ne pas convenir aux petites spores de DAOM22702, lesquelles pourraient s'agglomérer dans les interstices des billes 1,4 mm lors de la lyse.

Pour parvenir à déterminer l'unité de quantification la plus précise que possible, nous avons testé deux méthodes différentes de compte de spores de DAOM227022. Bien que l'une des deux méthodes mène à une meilleure corrélation linéaire entre la quantité de

spores dans un échantillon et le nombre de copies de marqueur retrouvé, les coefficients de variation sont élevés, et ce peu importe la méthode de compte de spores. Donc, indépendamment de la méthode de compte, et en utilisant la même technique d'extraction d'ADN, le nombre de copies de marqueur par spore est variable pour DAOM227022. Or, pour le marqueur de DAOM197198, un nombre de copies par spore assez stable a été trouvé. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'isolat DAOM197198 est le modèle le plus utilisé par Premier Tech, alors que l'isolat DAOM227022 n'a pas encore fait l'objet d'études et de commercialisation. Par conséquent, les spores fournies pour DAOM197198 passent peut-être par des procédures de cultures plus standardisées avant d'arriver à notre laboratoire que les spores de DAOM227022. En effet, rien n'indique que les spores de DAOM227022 en soient toutes au même cycle vital, ce qui est plus probable pour les spores de DAOM197198 fournies par Premier Tech. La quantification d'un isolat précis à l'aide d'un marqueur mitochondrial ne peut se faire si le métabolisme n'est pas pris en ligne de compte, c'est pourquoi l'unité de quantification demeure variable à ce jour.

Outre le besoin de déterminer une unité de quantification, le protocole de quantification des CMA diffère des méthodes bio-analytiques traditionnelles, parce qu'il implique des étapes intermédiaires, telles que le compte de spores et l'extraction d'ADN. Ces étapes intermédiaires qui doivent être effectuées pour la quantification des CMA ont aussi un impact sur le cycle seuil de fluorescence émise lors de l'analyse qPCR. Elles induisent de la variation dans l'unité de quantification de base qu'est le nombre de copies par spore, au même titre que les variations d'ordre métabolique. Le résultat des étapes préliminaires à l'analyse qPCR dépend de la matrice dans lesquelles les spores se trouvent. En effet, un protocole d'extraction d'ADN peut avoir une efficacité différente pour l'extraction d'ADN d'une même quantité de spores dans deux matrices différentes. C'est ce qui a été observé avec le kit E.Z.N.A. lors du test des trois différents kits d'extraction d'ADN. Les résultats obtenus pour 100 spores en milieu *simple* étaient alors significativement différents de ceux obtenus pour 100 spores en milieu *complexe*. Si l'efficacité de l'extraction d'ADN d'un kit dépend de la matrice, est-ce judicieux de ne standardiser qu'un seul kit pour chaque matrice? Plusieurs articles utilisent le *DNeasy plant mini kit* de chez QIAGEN^{34,104} pour extraire l'ADN de CMA des racines mycorhizées. Or, les racines mycorhizées constituent elles aussi une matrice à tester. En

effet, les témoins positifs extraits à l'aide du *DNeasy plant mini kit* de chez QIAGEN présentaient des cycles seuil beaucoup plus tardifs que les témoins positifs extraits à l'aide du *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Mo Bio, CA). Si les racines mycorhizées doivent être analysées à l'aide du marqueur, alors leur ADN doit être extrait selon le protocole optimal. En fait, les résultats des expériences liées à l'application des marqueurs sur des échantillons de racines et de sol indiquent que chaque matrice nécessite son protocole personnalisé d'extraction d'ADN. Bien qu'elles ne soient pas significatives, des différences entre les résultats obtenus pour une même quantité de spores en milieu *simple* et en milieu *complexe* extraite à l'aide d'un même kit ont été observées. En effet, certaines matrices, telles que le milieu *simple* et le milieu *complexe*, vont permettre l'obtention d'un signal plus intense que la matrice du sol pour un kit donné, et ce, que ce soit pour les spores de DAOM197198 ou pour les spores de DAOM227022. Il se peut que la lyse se fasse moins bien dans une matrice dense comme le sol que dans une matrice telle que les milieux liquides simple et complexe, lesquelles offrent moins de résistance au mouvement des billes. De plus, des billes plus grosses, lorsque compressées entre elles, créent des interstices pouvant laisser suffisamment d'espace où peuvent se loger des spores plus petites d'un isolat différent. C'est pourquoi il est important d'optimiser le protocole des étapes intermédiaires pour chaque isolat pour lequel un marqueur spécifique est développé, et pour chaque matrice qui sera étudiée à l'aide de ce marqueur.

Perspectives

Une procédure d'optimisation des marqueurs selon l'isolat ciblé et selon la matrice étudiée doit être développée. Une fois cette procédure d'optimisation au point, il sera possible d'étudier la distribution spatio-temporelle de DAOM197198 et de DAOM227022 dans le sol. La procédure d'optimisation pourra être utilisée également pour développer des marqueurs spécifiques pour des isolats différents ou même pour des groupes phylogénétiques. La quantification précise des CMA dans le sol permettra d'établir un suivi des inoculants commerciaux dans les champs à chaque saison, pour offrir un meilleur service aux agriculteurs. Cela permettra également des avancées significatives de l'étude des dynamiques des populations de CMA *in vivo*. En utilisant ces outils de quantification, il sera possible de déterminer les combinaisons de mycorhizes les plus performantes selon divers milieux, ce qui présente un intérêt énorme dans le monde de l'agronomie. Qui plus est, éventuellement, ces marqueurs permettront d'associer certains isolats mycorhiziens à certains types de sol, ce qui pourrait éventuellement constituer un outil très important pour connaître quels individus permettraient de repousser la désertification, ou de décontaminer des sites pollués. La symbiose mycorhizienne pourrait en fin de compte contenir des éléments de solution à des problèmes graves auxquels fait face le monde aujourd'hui. En attendant, les marqueurs qui ont fait l'objet de cette études peuvent être utilisés comme contrôle de qualité des inoculants commerciaux.

Remerciements

Je dois remercier les Drs. Hijri, Badri et Stefani pour leur soutien pédagogique et professionnel de mon projet, Denis Beaudet et Maryam Nadimi pour l'annotation des génomes mitochondriaux et pour leur participation dans l'alignement des séquences et leur aide pédagogique en bioinformatique, ainsi que pour le soutien qu'ils m'ont apporté lors de la détermination des régions spécifiques, Stéphane Daigle pour son aide précieuse pour mes analyses biostatistiques, les membres de Premier Tech, de Biopterre et du CRBM pour leur participation au projet de collaboration universitaire et industrielle et pour m'avoir fourni les échantillons de spores et de sols. Je remercie Franck Stefani, Stéphane Daigle, Mohamed Hijri, Amine Badri et Mireille Nadeau pour leur présence et pour le partage de leurs connaissances.

Bibliographie

- 1 Vandenkoornhuyse, P., Ridgway, K. P., Watson, I. J., Fitter, A. H. & Young, J. P. W. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular ecology* **12**, 3085-3095, doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01967.x (2003).
- 2 Clapp, J. P., Young, J. P. W., Merryweather, J. W. & Fitter, A. H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* **130**, 259-265, doi:10.1111/j.1469-8137.1995.tb03047.x (1995).
- 3 Kruger, M., Stockinger, H., Kruger, C. & Schussler, A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *The New phytologist* **183**, 212-223, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x (2009).
- 4 Redecker, D., Morton, J. B. & Bruns, T. D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular phylogenetics and evolution* **14**, 276-284, doi:10.1006/mpev.1999.0713 (2000).
- 5 Singh, P. K., Singh, M. & Tripathi, B. N. Glomalinalin: an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein. *Protoplasma* **250**, 663-669, doi:10.1007/s00709-012-0453-z (2013).
- 6 Curl, E. A. & Truelove, B. *The rhizosphere*. (Springer-Verlag, 1986).
- 7 van der Heijden, M. G. A. *et al.* Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**, 69-72 (1998).
- 8 Artursson, V., Finlay, R. D. & Jansson, J. K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental microbiology* **8**, 1-10, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x (2006).
- 9 Lecomte, J., St-Arnaud, M. & Hijri, M. Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology letters* **317**, 43-51, doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02209.x (2011).
- 10 Bianciotto, V. & Bonfante, P. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 365-371, doi:10.1023/A:1020544919072 (2002).
- 11 Iffis, B., St-Arnaud, M. & Hijri, M. Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS microbiology letters*, n/a-n/a, doi:10.1111/1574-6968.12533 (2014).
- 12 de la Providencia, I. E., de Souza, F. A., Fernandez, F., Delmas, N. S. & Declerck, S. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *The New phytologist* **165**, 261-271, doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01236.x (2005).
- 13 Croll, D. *et al.* Nonselving vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New phytologist* **181**, 924-937, doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02726.x (2009).
- 14 Burrows, R. L. & Pflieger, F. L. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Canadian Journal of Botany* **80**, 120-130, doi:doi:10.1139/b01-138 (2002).
- 15 Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H. & Young, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394**, 431-431 (1998).
- 16 Hijri, I. *et al.* Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular ecology* **15**, 2277-2289, doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02921.x (2006).

- 17 Del Val, C., Barea, J. M. & Azcón-Aguilar, C. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Applied and environmental microbiology* **65**, 718-723 (1999).
- 18 Tsai, S. M. & Phillips, D. A. Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Promote Development of Symbiotic Glomus Spores In Vitro. *Applied and environmental microbiology* **57**, 1485-1488 (1991).
- 19 Bécard, G. & Piché, Y. Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Applied and environmental microbiology* **55**, 2320-2325 (1989).
- 20 Bucking, H. *et al.* Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of Glomus intraradices. *The New phytologist* **180**, 684-695, doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02590.x (2008).
- 21 Smith, S. E. & Gianinazzi-Pearson, V. Physiological Interactions Between Symbionts in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 221-244, doi:doi:10.1146/annurev.pp.39.060188.001253 (1988).
- 22 Harrison, M. J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in Plant Science* **2**, 54-60, doi:10.1016/S1360-1385(97)82563-0.
- 23 Borstler, B., Thiery, O., Sykorova, Z., Berner, A. & Redecker, D. Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of Glomus intraradices in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular ecology* **19**, 1497-1511, doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04590.x (2010).
- 24 Long, L. K. *et al.* Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. *European Journal of Soil Biology* **46**, 288-294, doi:10.1016/j.ejsobi.2010.06.003 (2010).
- 25 Schüßler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**, 1413-1421, doi:10.1017/s0953756201005196 (2001).
- 26 Corradi, N. *et al.* Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Applied and environmental microbiology* **73**, 366-369, doi:10.1128/AEM.01574-06 (2007).
- 27 Marschner, H. & Dell, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil* **159**, 89-102 (1994).
- 28 Gilbert, N. Environment: The disappearing nutrient. *Nature* **461**, 716-718, doi:10.1038/461716a (2009).
- 29 St-Arnaud, M. & Vujanovic, V. in *Mycorrhiza in Crop Production* (ed C Hamel and C Plaenchette) (Haworth's Food Production Press, 2007).
- 30 St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. & Fortin, J. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycol Res* **100**, 328 - 332 (1996).
- 31 Corkidi, L. A., B. A. Merhaut, D. Allen, M. F. Downer, J. Bohn, J. Evans, M. Assessing the Infectivity of Commercial Mycorrhizal Inoculants in Plant Nursery Conditions *J. Environ. Hort.* **22**, 149-154 (2004).
- 32 Ruiz-Lozano, J., Azcón, R. & Gomez, M. Effects of arbuscular-mycorrhizal glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and environmental microbiology* **61**, 456-460 (1995).
- 33 Davies Jr, F., Potter, J. & Linderman, R. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants

- independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiology* **139**, 289-294 (1992).
- 34 Geue, H. & Hock, B. Determination of Acaulospora longula and Glomus subgroup Aa in plant roots from grassland using new primers against the large subunit ribosomal DNA. *Mycological Research* **108**, 76-83, doi:10.1017/s0953756203009080 (2004).
- 35 Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G. & Bending, G. D. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **113**, 17-35, doi:10.1016/j.agee.2005.09.009 (2006).
- 36 Zhang, X. H. *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Fungi Contribute to Resistance of Upland Rice to Combined Metal Contamination of Soil. *Journal of Plant Nutrition* **28**, 2065-2077, doi:10.1080/01904160500320871 (2005).
- 37 Zarei, M. *et al.* Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental pollution* **158**, 2757-2765, doi:10.1016/j.envpol.2010.04.017 (2010).
- 38 Tonin, C., Vandenkoornhuyse, P., Joner, E. J., Straczek, J. & Leyval, C. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of Viola calaminaria and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* **10**, 161-168, doi:10.1007/s005720000072 (2001).
- 39 Helgason, T. *et al.* Selectivity and Functional Diversity in Arbuscular Mycorrhizas of Co-Occurring Fungi and Plants from a Temperate Deciduous Woodland. *Journal of Ecology* **90**, 371-384 (2002).
- 40 Beaugregard, M. S. *et al.* Various forms of organic and inorganic P fertilizers did not negatively affect soil- and root-inhabiting AM fungi in a maize-soybean rotation system. *Mycorrhiza* **23**, 143-154, doi:DOI 10.1007/s00572-012-0459-6 (2013).
- 41 Bever, J. D., Morton, J. B., Antonovics, J. & Schultz, P. A. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology*, 71-82 (1996).
- 42 Beaugregard, M. S., Hamel, C., Nayyar, A. & St-Arnaud, M. Long-Term Phosphorus Fertilization Impacts Soil Fungal and Bacterial Diversity but not AM Fungal Community in Alfalfa. *Microb Ecol* **59**, 379-389, doi:DOI 10.1007/s00248-009-9583-z (2010).
- 43 Herrera-Peraza, R. A., Hamel, C., Fernandez, F., Ferrer, R. L. & Furrázola, E. Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza* **21**, 183-193, doi:10.1007/s00572-010-0322-6 (2011).
- 44 Gianinazzi, S. & Vosátka, M. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Canadian Journal of Botany* **82**, 1264-1271, doi:doi:10.1139/b04-072 (2004).
- 45 Schüßler, A. & Walker, C. in *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms Vol. 14 The Mycota* (eds Stefanie Pöggeler & Johannes Wöstemeyer) Ch. 7, 163-185 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
- 46 Kruger, M., Kruger, C., Walker, C., Stockinger, H. & Schussler, A. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *The New phytologist* **193**, 970-984, doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x (2012).
- 47 Schüßler, A. & Walker, C. (2010).
- 48 King, C., Fielding, N. & O'Keefe, T. Observations on the life cycle and behaviour of the predatory beetle, *Rhizophagus grandis* Gyll.(Col., Rhizophagidae) in Britain. *Journal of Applied Entomology* **111**, 286-296 (1991).

- 49 Martin, F. *et al.* The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* **180**, 747-750, doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02671.x (2008).
- 50 Munkvold, L., Kjølner, R., Vestberg, M., Rosendahl, S. & Jakobsen, I. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **164**, 357-364, doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x (2004).
- 51 Danesh, Y., Goltapeh, E. M., Alizadeh, A. & Sanavy, M. M. Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. *J. Biol. Sci* **6**, 87-91 (2006).
- 52 Cranenbrouck, S. *et al.* in *In Vitro Culture of Mycorrhizas* Vol. 4 *Soil Biology* (eds Stéphane Declerck, J. André Fortin, & Désiré-Georges Strullu) Ch. 18, 341-375 (Springer Berlin Heidelberg, 2005).
- 53 Sanders, I. R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T. & Wiemken, A. Identification of Ribosomal DNA Polymorphisms Among and Within Spores of the Glomales: Application to Studies on the Genetic Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities. *New Phytologist* **130**, 419-427 (1995).
- 54 Merryweather, J. & Fitter, A. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta* I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist* **138**, 117-129, doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00888.x (1998).
- 55 Moreira, M., Nogueira, M. A., Tsai, S. M., Gomes-da-Costa, S. M. & Cardoso, E. J. Sporulation and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil Pine in the field and in the greenhouse. *Mycorrhiza* **17**, 519-526 (2007).
- 56 Morton, J. B. Variation in Mycorrhizal and Spore Morphology of *Glomus occultum* and *Glomus diaphanum* as Influenced by Plant Host and Soil Environment. *Mycologia* **77**, 192-204 (1985).
- 57 Stürmer, S. L. & Morton, J. B. Developmental Patterns Defining Morphological Characters in Spores of Four Species in *Glomus*. *Mycologia* **89**, 72-81 (1997).
- 58 McGee, P. A. Further sporocarpic species of *Glomus* (Endogonaceae) from South Australia. *Transactions of the British Mycological Society* **87**, 123-129, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80011-0 (1986).
- 59 Clapp, J. P., Fitter, A. H. & Young, J. P. Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Molecular ecology* **8**, 915-921 (1999).
- 60 GIOVANNETTI, M. & Mosse, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist* **84**, 489-500 (1980).
- 61 Jason, D. A., Hetrick, B. A. D. & Jurgenson, J. E. Isolate Specific Detection of Mycorrhizal Fungi Using Genome Specific Primer Pairs. *Mycologia* **88**, 939-946, doi:10.2307/3761056 (1996).
- 62 Dodd, J. C. *et al.* Inter- and intraspecific variation within the morphologically-similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. *New Phytologist* **133**, 113-132, doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb04347.x (1996).
- 63 Croll, D. *et al.* Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New phytologist* **178**, 672-687, doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02381.x (2008).
- 64 Yokoyama, K., Tateishi, T., Saito, M. & Marumoto, T. Application of a molecular method for the identification of a *Gigaspora margarita* isolate released in a field. *Soil Science & Plant Nutrition* **51**, 125-128 (2005).

- 65 Redecker, D., Hijri, I. & Wiemken, A. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica* **38**, 113-124, doi:10.1007/bf02803144 (2003).
- 66 Lee, J., Lee, S. & Young, J. P. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology ecology* **65**, 339-349, doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x (2008).
- 67 Furlan, V. & Fortin, J. A. Effects of Light Intensity on the Formation of Vesicular-Arbuscular Endomycorrhizas on *Allium cepa* by *Gigaspora calospora*. *New Phytologist* **79**, 335-340 (1977).
- 68 Stockinger, H., Kruger, M. & Schussler, A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *The New phytologist* **187**, 461-474, doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x (2010).
- 69 Jansa, J. *et al.* Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* **12**, 225-234, doi:10.1007/s00572-002-0163-z (2002).
- 70 Redecker, D. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**, 67-73, doi:10.1023/a:1020283832275 (2002).
- 71 Gamper, H. & Leuchtmann, A. Taxon-specific PCR primers to detect two inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungi from temperate agricultural grassland. *Mycorrhiza* **17**, 145-152, doi:10.1007/s00572-006-0092-3 (2007).
- 72 Helgason, T., Fitter, A. & Young, J. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular ecology* **8**, 659-666 (1999).
- 73 Hepper, C. M., AZCON-AGUILAR, C., Rosendahl, S. & Sen, R. Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). *New Phytologist* **110**, 207-215 (1988).
- 74 Husband, R., Herre, E. A., Turner, S. L., Gallery, R. & Young, J. P. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular ecology* **11**, 2669-2678 (2002).
- 75 Becker, W. N. & Gerdemann, J. W. COLORIMETRIC QUANTIFICATION OF VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL INFECTION IN ONION. *New Phytologist* **78**, 289-295, doi:10.1111/j.1469-8137.1977.tb04832.x (1977).
- 76 Sanders, I. R., Ravolanirina, F., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. & Lemoine, M. C. Detection of specific antigens in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Acaulospora laevis* using polyclonal antibodies to soluble spore fractions. *Mycological Research* **96**, 477-480, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81093-9 (1992).
- 77 Kozlova, N. V., Strunnikova, O. K., Labutova, N. M. & Muromtsev, G. S. Production and specificity of polyclonal antibodies against soluble proteins from the arbuscular mycorrhizal fungus <i>Glomus intraradices</i>. *Mycorrhiza* **10**, 301-305, doi:10.1007/pl00009999 (2001).
- 78 Wright, S. F., Morton, J. B. & Sworobuk, J. E. Identification of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Applied and environmental microbiology* **53**, 2222-2225 (1987).
- 79 Rosier, C. L., Hoyer, A. T. & Rillig, M. C. Glomalinal-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 2205-2211, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.021 (2006).
- 80 Tisserant, B., Brenac, V., Requena, N., Jeffries, P. & Dodd, J. C. The detection of *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) forming mycorrhizas in three plants, at different

- stages of seedling development, using mycorrhiza-specific isozymes. *New Phytologist* **138**, 225-239, doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00112.x (1998).
- 81 Giovanetti, M. A., L. in *Applied Mycology and Biotechnology* Vol. 2 (ed G. G. & Arora Khachatourians, D. K.) Ch. 11, 291 (Elsevier, 2002).
- 82 Graham, J. H., Hodge, N. C. & Morton, J. B. Fatty Acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Applied and environmental microbiology* **61**, 58-64 (1995).
- 83 Spedding, T. A., Hamel, C., Mehuys, G. R. & Madramootoo, C. A. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 499-512, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.026 (2004).
- 84 (!!! INVALID CITATION !!!).
- 85 Ruess, L. & Chamberlain, P. M. The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 1898-1910, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.020 (2010).
- 86 Shi, Y. *et al.* Seasonal variation of microbial biomass, activity, and community structure in soil under different tillage and phosphorus management practices. *Biol Fert Soils* **49**, 803-818, doi:10.1007/s00374-013-0773-y (2013).
- 87 Olsson, P. A. & Johansen, A. Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycological Research* **104**, 429-434, doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0953756299001410 (2000).
- 88 Vestal, J. R. & White, D. C. Lipid analysis in microbial ecology: quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience* **39**, 535-541 (1989).
- 89 Joergensen, R. G. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 647-652, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00191-1 (2000).
- 90 Olsson, P. A., Larsson, L., Bago, B., Wallander, H. & Van Aarle, I. M. Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **159**, 7-10, doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00810.x (2003).
- 91 Calonne, M. *et al.* The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid biosynthesis to cope with the benzo[a]pyrene oxidative stress. *Phytochemistry* **97**, 30-37, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.014 (2014).
- 92 Garcia, A. A. F. *et al.* Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology* **27**, 579-588 (2004).
- 93 Piepho, H. P. & Koch, G. Codominant analysis of banding data from a dominant marker system by normal mixtures. *Genetics* **155**, 1459-1468 (2000).
- 94 Vos, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* **23**, 4407-4414, doi:10.1093/nar/23.21.4407 (1995).
- 95 Hassan, S. E. D., Boon, E., St-Arnaud, M. & Hijri, M. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Molecular ecology* **20**, 3469-3483, doi:DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x (2011).
- 96 Guo, L.-D. in *Molecular identification of Fungi* (ed Y. Voight Gherbawy, K.) Ch. 13, 277-295 (2010).
- 97 Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. & Bonierbale, M. W. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. *Nat Biotech* **7**, 257-264 (1989).
- 98 Hayashi, K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome research* **1**, 34-38 (1991).

- 99 Lepoivre, P. *Phytopathologie*. De Boeck Université edn, 390 (2003).
- 100 Gadkar, V., Adholeya, A. & Satyanarayana, T. Randomly amplified polymorphic DNA using the M13 core sequence of the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Gigaspora gigantea*. *Can J Microbiol* **43**, 795-798, doi:doi:10.1139/m97-115 (1997).
- 101 Rosendahl, S. & Taylor, J. W. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. *Molecular ecology* **6**, 821-829, doi:10.1111/j.1365-294X.1997.tb00136.x (1997).
- 102 Waterton, C. a. *Barcoding Nature: shifting cultures of taxonomy in an age of biodiversity loss*. Routledge edn, (Routledge, 2013).
- 103 Hosny, M., Hijri, M., Passerieux, E. & Dulieu, H. rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (glomales, zygomycetes). *Gene* **226**, 61-71 (1999).
- 104 Borstler, B., Raab, P. A., Thiery, O., Morton, J. B. & Redecker, D. Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *The New phytologist* **180**, 452-465, doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02574.x (2008).
- 105 Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D. & Taylor, J. W. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* **69**, 180-190, doi:doi:10.1139/b91-026 (1991).
- 106 Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C. & Werner, D. Restriction Analysis of PCR-Amplified Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA as a Tool for Species Identification in Different Genera of the Order Glomales. *Applied and environmental microbiology* **63**, 1756-1761 (1997).
- 107 Stockinger, H., Walker, C. & Schussler, A. 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *The New phytologist* **183**, 1176-1187, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x (2009).
- 108 Jansa, J., Mozafar, A., Banke, S., McDonald, B. A. & Frossard, E. Intra- and intersporal diversity of ITS rDNA sequences in *Glomus intraradices* assessed by cloning and sequencing, and by SSCP analysis. *Mycological Research* **106**, 670-681, doi:10.1017/s0953756202006032 (2002).
- 109 Kjølner, R. & Rosendahl, S. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* **226**, 189-196, doi:10.1023/a:1026499923717 (2000).
- 110 Pringle, A., Moncalvo, J.-M. & Vilgalys, R. High Levels of Variation in Ribosomal DNA Sequences within and among Spores of a Natural Population of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Acaulospora colossica*. *Mycologia* **92**, 259-268 (2000).
- 111 Simon, L., Lalonde, M. & Bruns, T. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and environmental microbiology* **58**, 291-295 (1992).
- 112 Redecker, D. & Raab, P. Phylogeny of the glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* **98**, 885-895 (2006).
- 113 Silva, G., Lumini, E., Maia, L., Bonfante, P. & Bianciotto, V. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* **16**, 183-189, doi:10.1007/s00572-005-0030-9 (2006).
- 114 Van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. & Gianinazzi-Pearson, V. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular

- mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular ecology* **7**, 879-887, doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x (1998).
- 115 Pellegrino, E. *et al.* Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. *New Phytologist* **194**, 810-822 (2012).
- 116 Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H. & Schüßler, A. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* **193**, 970-984, doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x (2012).
- 117 Corradi, N., Hijri, M., Fumagalli, L. & Sanders, I. R. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) harbour ancient fungal tubulin genes that resemble those of the chytrids (Chytridiomycota). *Fungal genetics and biology : FG & B* **41**, 1037-1045, doi:10.1016/j.fgb.2004.08.005 (2004).
- 118 Sokolski, S., Dalpe, Y. & Piche, Y. Phosphate transporter genes as reliable gene markers for the identification and discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *glomus*. *Applied and environmental microbiology* **77**, 1888-1891, doi:10.1128/aem.00919-10 (2011).
- 119 Marleau, J., Dalpe, Y., St-Arnaud, M. & Hijri, M. Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC evolutionary biology* **11**, doi:Artn 51
Doi 10.1186/1471-2148-11-51 (2011).
- 120 Kuhn, G., Hijri, M. & Sanders, I. R. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **414**, 745-748, doi:10.1038/414745a (2001).
- 121 Pawlowska, T. E. & Taylor, J. W. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **427**, 733-737, doi:10.1038/nature02290 (2004).
- 122 Stukenbrock, E. H. & Rosendahl, S. Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. *Molecular ecology* **14**, 743-752, doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02453.x (2005).
- 123 Hijri, M. & Sanders, I. R. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* **433**, 160-163, doi:10.1038/nature03069 (2005).
- 124 Boon, E., Zimmerman, E., Lang, B. F. & Hijri, M. Intra-isolate genome variation in arbuscular mycorrhizal fungi persists in the transcriptome. *Journal of evolutionary biology* **23**, 1519-1527, doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02019.x (2010).
- 125 Raab, P. A., Brennwald, A. & Redecker, D. Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of *Glomus* (arbuscular mycorrhizal fungi, Glomeromycota). *Mycol Res* **109**, 1315-1322 (2005).
- 126 Franz Lang, B. & Hijri, M. The complete *Glomus* intraradices mitochondrial genome sequence – a milestone in mycorrhizal research. *New Phytologist* **183**, 3-6, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02885.x (2009).
- 127 Lee, J. & Young, J. P. The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* intraradices isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *The New phytologist* **183**, 200-211, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02834.x (2009).
- 128 Sykorova, Z. *et al.* Long-term tracing of *Rhizophagus irregularis* isolate BEG140 inoculated on *Phalaris arundinacea* in a coal mine spoil bank, using mitochondrial large subunit rDNA markers. *Mycorrhiza* **22**, 69-80, doi:10.1007/s00572-011-0375-1 (2012).

- 129 Krak, K., Janouskova, M., Caklova, P., Vosatka, M. & Storchova, H. Intraradical dynamics of two coexisting isolates of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* sensu lato as estimated by real-time PCR of mitochondrial DNA. *Applied and environmental microbiology* **78**, 3630-3637, doi:10.1128/AEM.00035-12 (2012).
- 130 Zhang, D. X. & Hewitt, G. M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology* **12**, 563-584 (2003).
- 131 Beaudet, D., Nadimi, M., Iffis, B. & Hijri, M. Rapid mitochondrial genome evolution through invasion of mobile elements in two closely related species of arbuscular mycorrhizal fungi. *PLoS one* **8**, e60768 (2013).
- 132 Barr, C. M., Neiman, M. & Taylor, D. R. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *The New phytologist* **168**, 39-50, doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01492.x (2005).
- 133 Santamaria, M. *et al.* Towards barcode markers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria. *BMC bioinformatics* **10 Suppl 6**, S15, doi:10.1186/1471-2105-10-S6-S15 (2009).
- 134 Tamasloukht, M. *et al.* Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant physiology* **131**, 1468-1478, doi:10.1104/pp.012898 (2003).
- 135 Sankoff, D. *et al.* Gene order comparisons for phylogenetic inference: evolution of the mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6575-6579 (1992).
- 136 Paquin, B. *et al.* The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Current genetics* **31**, 380-395 (1997).
- 137 Providencia, I. E., Nadimi, M., Beaudet, D., Rodriguez Morales, G. & Hijri, M. Detection of a transient mitochondrial DNA heteroplasmy in the progeny of crossed genetically divergent isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **200**, 211-221 (2013).
- 138 St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. & Fortin, J. Enhanced hyphal growth 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 (1996).
- 139 An, Z. Q. & Hendrix, J. W. Determining Viability of Endogonaceous Spores with a Vital Stain. *Mycologia* **80**, 259-261, doi:10.2307/3807805 (1988).
- 140 Joseph, M. *INVAM International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi*, 2014).
- 141 Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology* **63**, 3741 (1997).
- 142 Formey, D. *et al.* Comparative analysis of mitochondrial genomes of *Rhizophagus irregularis*-syn. *Glomus irregulare*-reveals a polymorphism induced by variability generating elements. *New Phytologist* **196**, 1217-1227 (2012).
- 143 Edgar, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* **5**, 113, doi:10.1186/1471-2105-5-113 (2004).
- 144 Tamura, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* **28**, 2731-2739, doi:10.1093/molbev/msr121 (2011).
- 145 Yolande Dalpé, Z. B. *Glomeromycota In vitro Collection (GINCO)*, 2013).

- 146 Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* **25**, 169-193 (2000).
- 147 Michael, W. P. in *A-Z of Quantitative PCR* (ed A. Bustin Stephen) Ch. 3, 881 (International University Line, 2004).
- 148 Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J. & Sohier, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food microbiology* **28**, 848-861 (2011).
- 149 Dhanasekaran, S., Doherty, T. M. & Kenneth, J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of immunological methods* **354**, 34-39, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.004 (2010).
- 150 Scherrer, B. *Biostatistique*. Vol. 1 (Gaëtan Morin, 2007).
- 151 Bélanger, A. *Validation de l'essai qPCR et critère d'acceptance pour la validation* (Premier Tech, La Pocatière, 2012).
- 152 Gamper, H. A., Young, J. P. W., Jones, D. L. & Hodge, A. Real-time PCR and microscopy: Are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance? *Fungal Genetics and Biology* **45**, 581-596, doi:10.1016/j.fgb.2007.09.007 (2008).
- 153 Koide, R. T. Nucleic acid isolation from ecological samples—fungal associations, mycorrhizae. *Methods in enzymology* **395**, 58-72 (2005).
- 154 Schneegurt, M. A., Dore, S. Y. & Kulpa Jr, C. F. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Current issues in molecular biology* **5**, 1-8 (2003).
- 155 Peters, F. T., Drummer, O. H. & Musshoff, F. Validation of new methods. *Forensic science international* **165**, 216-224, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021 (2007).
- 156 Tiwari, G. & Tiwari, R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharmaceutical methods* **1**, 25-38 (2010).
- 157 Wong, M. L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75 (2005).
- 158 Fu, J. *et al.* Absolute Quantification of Plasmid DNA by Real-time PCR with Genomic DNA as External Standard and Its Application to a Biodistribution Study of an HIV DNA Vaccine. *Analytical Sciences* **25**, 675-680, doi:10.2116/analsci.25.675 (2009).
- 159 Rutledge, R. & Cote, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic acids research* **31**, e93-e93 (2003).
- 160 Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L. & Lin, S. Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal pcna as the model gene. *PloS one* **5**, e9545 (2010).
- 161 Lin, C.-H., Chen, Y.-C. & Pan, T.-M. Quantification bias caused by plasmid DNA conformation in quantitative real-time PCR assay. *PloS one* **6**, e29101 (2011).
- 162 Whelan, J. A., Russell, N. B. & Whelan, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of immunological methods* **278**, 261-269 (2003).
- 163 Klein, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine* **8**, 257-260 (2002).
- 164 Hatch, A. C. *et al.* 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab on a chip* **11**, 3838-3845 (2011).
- 165 Hindson, B. J. *et al.* High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry* **83**, 8604-8610 (2011).

- 166 Pétry, F. *Guide pratique d'introduction à la régression en sciences sociales*. Univers edn, (Les Presses de l'Université Laval, 2003).
- 167 Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A. C. R. C., Cammue, B. P. A. & Thomma, B. P. H. J. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science* **171**, 155-165, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.03.009 (2006).
- 168 Schwarzott, D. & Schüßler, A. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* **10**, 203-207, doi:10.1007/PL00009996 (2001).
- 169 Alkan, N., Gadkar, V., Coburn, J., Yarden, O. & Kapulnik, Y. Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. *New Phytologist* **161**, 877-885, doi:10.1046/j.1469-8137.2004.00975.x (2004).
- 170 Gamper, H. A., van der Heijden, M. G. & Kowalchuk, G. A. Molecular trait indicators: moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology. *The New phytologist* **185**, 67-82, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03058.x (2010).
- 171 Haugland, R. A., Brinkman, N. & Vesper, S. J. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J Microbiol Meth* **50**, 319-323, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00037-4 (2002).
- 172 Smith, C. J. & Osborn, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology* **67**, 6-20 (2009).
- 173 Whitcomb, S. & Stutz, J. C. Assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a local community: role of sampling effort and spatial heterogeneity. *Mycorrhiza* **17**, 429-437, doi:10.1007/s00572-007-0118-5 (2007).
- 174 Thonar, C., Erb, A. & Jansa, J. Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities--marker design, verification, calibration and field validation. *Molecular ecology resources* **12**, 219-232, doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03086.x (2012).
- 175 Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N. & Veal, D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological procedures online* **1**, 40-47, doi:10.1251/bpo6 (1998).
- 176 Abu Almakarem, A., Heilman, K., Conger, H., Shtarkman, Y. & Rogers, S. Extraction of DNA from plant and fungus tissues in situ. *BMC research notes* **5**, 266 (2012).
- 177 Arikawa, E. *et al.* Cross-platform comparison of SYBR(R) Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC genomics* **9**, 328 (2008).
- 178 Leong, D. T. *et al.* Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials* **28**, 203-210 (2007).
- 179 Dhanasekaran, S., Doherty, T. M. & Kenneth, J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of immunological methods* **354**, 34-39, doi:10.1016/j.jim.2010.01.004 (2010).
- 180 Tichopad, A. *et al.* Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**, 1816-1823 (2009).

Annexe

PCR quantitative (qPCR)

L'arrivée de techniques telles que le PCR en temps réel permet désormais de quantifier l'ADN de divers échantillons¹⁴⁷. Cela est possible selon deux méthodes: soit par le SYBRGreen ou par des sondes TaqMan. Le processus SYBRGreen implique une molécule fluorescente qui se lie à l'ADN double-brin (fluorophore intercalaire) de manière non-spécifique, alors que les sondes TaqMan impliquent le relâchement d'un fluorophore, normalement relié à une séquence spécifique d'ADN (la sonde), via l'activité exonucléase de la *Taq* polymérase¹⁵⁷. Ces méthodes permettent de mesurer la fluorescence émise à chaque cycle ce qui est proportionnel à la quantité d'amplicons présents dans la réaction qPCR au fil des cycles¹⁴⁸. Il y a quatre phases lors de la réaction de qPCR: la phase linéaire, la phase exponentielle, la phase log-linéaire et la phase plateau. Lors de la phase linéaire, le niveau de fluorescence émis par les échantillons ne dépasse pas le niveau de base, les bruits de fonds. Durant la phase exponentielle, les fluorophores reliés aux sondes sont relâchés lors de la synthèse des amplicons. Le signal fluorescent augmente en même temps que la quantité d'amplicons présents dans le mélange, jusqu'au dépassement d'un seuil défini par l'écart-type des bruits de fonds. Au moment où la fluorescence franchi ce seuil, il est possible de calculer le nombre de copies de marqueur dans l'échantillon grâce à la courbe standard. La phase log-linéaire constitue la phase lors de laquelle l'amplification est optimale, ce qui se traduit par un dédoublement de la quantité initiale d'amplicons à chaque cycle si l'efficacité est de 100%. La quantité de composants dans le mix de la réaction de qPCR constitue toutefois une limite à l'émission de la fluorescence; lorsque cette limite est atteinte, c'est la phase plateau.

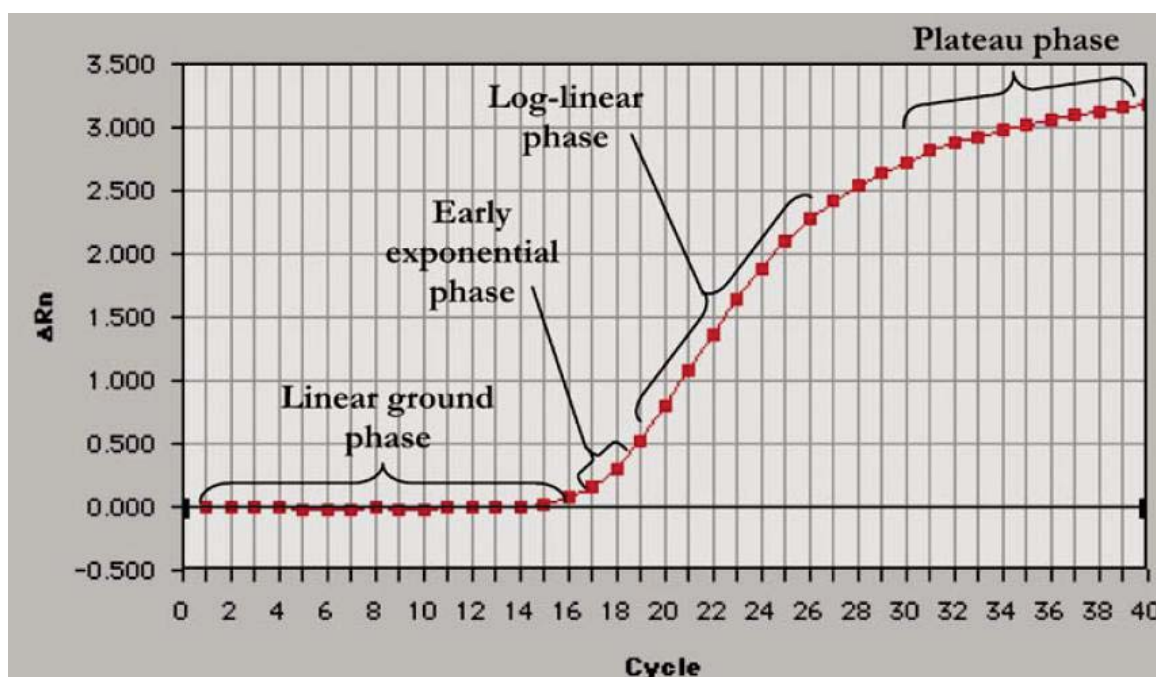


Figure 23. Les 4 phases de la réaction de qPCR (*Real-time PCR for mRNA quantitation* par Marisa L. Wong & Juan F. Medrano 2005¹⁵⁷).

Naturellement, pour quantifier une espèce ou un isolat précis de CMA, la technologie Taqman est à privilégier, étant beaucoup plus spécifique et présentant moins de chances de donner de faux positifs que le SYBRgreen, même si plus coûteux¹⁷⁷. Ces deux processus chimiques peuvent être utilisés pour deux méthodes: la quantification relative et la quantification absolue. La quantification relative compare l'expression d'un gène à l'expression d'un gène à copie unique à expression constante appelé gène de normalisation, et les résultats se présentent sous la forme d'un ratio copies de gènes dans l'échantillon/ copies du gène de ménage¹⁴⁸. La quantification absolue compare les valeurs de Ct de divers échantillons par rapport à une courbe standard établie à partir de quantités connues de copies de marqueur¹⁴⁸. Elle implique la synthèse d'une courbe standard dont chaque point représente une valeur connue de nombre de copies de marqueur. Cette courbe standard est le plus souvent obtenue par le clonage de la séquence cible. En effet, la masse d'un plasmide ainsi que la concentration de la plasmide purifié permettent de calculer le nombre exact de plasmides mis dans une réaction^{147,148,157,162,178}. La quantification absolue, pour être fiable, doit présenter une efficacité similaire pour

chaque courbe générée^{148,158,179}, car la plus petite variation entre les Ct de chaque point de la courbe peut avoir de grosses répercussions sur le calcul des résultats. C'est la raison pour laquelle la courbe standard générée doit être validée^{127,130,131}. Les sources de variations proviennent le plus souvent des bonnes pratiques de laboratoires¹⁴⁸, de la détermination de la concentration des points de la courbe standard^{147,180}, du type de séquence d'ADN utilisé pour la synthèse du standard (plasmide circulaire, plasmide linéarisé, produit PCR purifié, ADN recombinant)¹⁴⁹, ainsi que du processus d'extraction d'ADN des échantillons^{147,157}.

Calcul de la masse du plasmide dont l'insert constitue le marqueur moléculaire de G. cerebriforme

m=masse d'un plasmide (pg)

n=taille du plasmide (pb) inculant l'insert

n=3851 pb+148 pb

n=3999 pb

m=(n)(1,096e-09 pg/pb)

m=(3999) (1,096e-09 pg/pb)

m= 4,3829E-06 pg

Calcul de la masse d'ADN plasmidique (M) dans la réaction qPCR du P1

Sachant que la masse d'un seul plasmide est m= 4,3829E-06 pg,

et considérant que le P1 doit présenter 10000000 copies de ce plasmide,

alors la masse d'ADN plasmidique qui se retrouve dans P1 correspond à

M=(10000000)(m)

M=10000000(4,3829E-06) pg

M= 43,829 pg

Calcul de la concentration(c2) d'ADN plasmidique devant se trouver dans le volume de la dilution P1 pour avoir une masse correspondant à 10000000 plasmides (M)

Sachant que M= masse d'ADN plasmidique dans la réaction qPCR du P1=43,829 pg

et que $V =$ le volume prélevé de la dilution P1 pour la réaction de qPCR
 $P1 = 2,7 \mu L$

$$\text{et que } c2 = \frac{M}{V}$$

$$\text{alors } c2 = \frac{43,829 \text{ pg}}{2,7 \mu L}$$

$$\text{donc } c2 = 16,233 \text{ pg}/\mu L$$

Calcul de la dilution P1

Sachant que selon le Qubit, $c1 = [C10 \ 1:20] = 610 \text{ pg}/\mu L$

et que $c2 = [P1] = 16,233 \text{ pg}/\mu L$

et que $v2 =$ volume total de la dilution P1 = $200 \mu L$

$$\text{et que } c1v1 = c2v2$$

$$\text{alors, } v1 = \frac{c2v2}{c1}$$

$$\text{donc } v1 = \frac{\left(16,233 \frac{\text{pg}}{\mu L}\right) \cdot (200 \mu L)}{\left(610 \frac{\text{pg}}{\mu L}\right)}$$

$$\text{donc } v1 = 5,3 \mu L.$$

Ainsi, pour obtenir la dilution P1, on ajoute $5,3 \mu L$ de C10 1:20 à $194,7 \mu L$ d'eau distillée stérile.

Calcul des dilutions subséquentes

Pour les dilutions subséquentes, $20 \mu L$ de la dilution précédente est dilué dans $180 \mu L$ d'eau distillée standard.

Tableau 38. Poids total de sol dans chaque pot en grammes (g). La première lettre du nom de l'échantillon indique la plante-hôte (P= pomme de terre, S= soya); la seconde lettre indique s'il s'agit d'un échantillon de sol ou de racines (S= sol, R= racines); le premier chiffre dans le nom de l'échantillon représente le traitement appliqué; le dernier chiffre représente le # de pot.

Nom de l'échantillon	Poids du sol contenu dans le pot (g)
PS1.1	210,55
PS1.3	249,36
PS1.4	229,04
PS2.3	264,53
PS2.4	267
PS2.5	251,53
PS3.1	292,93
PS3.3	272,52
PS3.4	298,7
PS6.1	332,48
PS6.4	241,12
PS6.5	272,85
PS10.3	247,43
PS10.4	265,27
PS10.5	312,93
SS1.1	225,17
SS1.2	257,85
SS1.4	186,4
SS2.2	293,34
SS2.3	282,21
SS2.6	256,19
SS3.1	263,67
SS3.2	276,45
SS3.4	274,42
SS6.2	239,7
SS6.3	244,53
SS6.4	213,5
SS10.2	215,9
SS10.4	206,38
SS10.5	251,31

Tableau 39. Analyse des échantillons de racines des traitements 6 et 10 en qPCR à l'aide du marqueur moléculaire mitochondrial spécifique à DAOM220722.

Traitement	Plante hôte	Numéro de pot	Extraction	Nombre de répliquats qui amplifient	Ct de sortie moyen	Nombre de copies moyen	Nombre de spores maximal dans 20 mg de racines broyées à l'azote liquide	Nombre de spores minimal dans 20 mg de racines broyées à l'azote liquide	Nombre de spores maximal dans 400 mg de racines	Nombre de spores minimal dans 400 mg de racines
Traitement 6	Patates	1	1	0	40	0	0	0	0	0
		2	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	0	40	0	0	0	0	0	0
		4	1	0	40	0	0	0	0	0
		2	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	0	40	0	0	0	0	0	0
		5	1	0	40	0	0	0	0	0
		2	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	1	0	37,720	20,45	0,17	0,07	4	1
	Soya	2	1	0	40	0	0	0	0	0
		2	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	1	0	30,420	2783	22,81	9,0	347	137
		3	1	1	37,327	27	0,22	0,09	4	1
		2	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	0	40	0	0	0	0	0	0
		4	1	0	40	0	0	0	0	0
		2	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	0	40	0	0	0	0	0	0
Traitement 10	Patates	3	1	0	40	0	0	0	0	0
		2	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	0	40	0	0	0	0	0	0
		4	1	0	40	0	0	0	0	0
		2	1	0	33,988	252,1	2,07	0,82	48	19
		3	0	40	0	0	0	0	0	0
	5	1	0	40	0	0	0	0	0	
	2	1	0	37,493	23,82	0,20	0,08	4	2	
	3	0	40	0	0	0	0	0	0	
Soya	2	1	0	40	0	0	0	0	0	
	2	0	40	0	0	0	0	0	0	
	3	1	0	37,507	24	0,19	0,08	2	1	
	4	1	0	40	0	0	0	0	0	
	2	0	40	0	0	0	0	0	0	
	3	0	40	0	0	0	0	0	0	
	5	1	0	40	0	0	0	0	0	
	2	1	0	37,162	30	0,24	0,10	2	1	
	3	1	0	37,515	23	0,19	0,08	1	1	
6	1	0	40	0	0	0	0	0		
2	0	40	0	0	0	0	0	0		
3	0	40	0	0	0	0	0	0		

Tableau 40. Analyse des échantillons de sol des traitements 6 et 10 en qPCR à l'aide du marqueur moléculaire mitochondrial spécifique à DAOM220722.

Traitement	Plante hôte	Numéro de pot	Extraction	Nombre de réplicats qui amplifient	Ct de sortie moyen	Nombre de copies moyen	Nombre de spores maximal dans 250 mg de fraction fine	Nombre de spores minimal dans 250 mg de fraction fine	Nombre de spores maximal dans le sol total contenu dans le pot	Nombre de spores minimal dans le sol total contenu dans le pot	
Traitement 6	Patates	1	1	0	40	0	0	0	0	0	
			2	0	40	0	0	0	0	0	
			3	0	40	0	0	0	0	0	
		4	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
			3	0	40	0	0	0	0	0	0
		5	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
			3	0	40	0	0	0	0	0	0
						37,353	26	0,21	0,08	7	2,7
	Soya	2	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
			3	0	40	0	0	0	0	0	0
			4	0	40	0	0	0	0	0	0
			5	0	40	0	0	0	0	0	0
			6	0	40	0	0	0	0	0	0
		3	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
3			0	40	0	0	0	0	0	0	
4			0	40	0	0	0	0	0	0	
5			0	40	0	0	0	0	0	0	
6			0	40	0	0	0	0	0	0	
4		1	0	40	0	0	0	0	0	0	
		2	0	40	0	0	0	0	0	0	
		3	0	40	0	0	0	0	0	0	
		4	0	40	0	0	0	0	0	0	
		5	0	40	0	0	0	0	0	0	
		6	0	40	0	0	0	0	0	0	
Traitement 10	Patates	3	1	3	37,177	34	0,28	0,11	7	3	
			2	3	35,943	84	0,69	0,27	17	7	
			3	1	35,802	74	0,61	0,24	15	6	
		4	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	3	37,551	26	0,21	0,08	7	3	
			3	2	38,511	15	0,12	0,05	4	2	
		5	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
			3	0	40	0	0	0	0	0	0
						40	0	0	0	0	
	Soya	2	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
			3	1	38,508	12	0,10	0,04	3	1	
		4	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
			3	0	40	0	0	0	0	0	0
		5	1	0	40	0	0	0	0	0	0
			2	0	40	0	0	0	0	0	0
3			0	40	0	0	0	0	0	0	
6	1	0	40	0	0	0	0	0	0		
	2	0	40	0	0	0	0	0	0		
	3	0	40	0	0	0	0	0	0		