

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

LE CONSORTIUM DE PGPR ERA BOOST PRO AMÉLIORE LA RÉSISTANCE
À LA SÉCHERESSE CHEZ *LACTUCA SATIVA* VIA UNE DÉRÉGULATION
SPÉCIFIQUE DE TROIS AQUAPORINES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
MATHIAS BISAILLON

JANVIER 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Hugo Germain de m'avoir offert l'opportunité de faire partie de son équipe de recherche, et ce, depuis le début de mes études universitaires. Être dans ce milieu pendant mon baccalauréat est ce qui m'a donné le goût de faire de la recherche après tout. Son accessibilité, son soutien et son écoute ont été grandement appréciés lors de la réalisation de ce projet. L'équipe de recherche est une petite équipe dynamique et agréable à côtoyer, ce qui a rendu la réalisation du projet d'autant plus agréable.

J'aimerais ensuite remercier l'entreprise Ulysse Biotech de m'avoir accueilli comme stagiaire au début de mon baccalauréat et de m'avoir proposé un projet de maîtrise lorsqu'ils ont su que j'étais intéressé par les études graduées. Considérant que j'aimerais poursuivre ma carrière avec eux, cela est flatteur et je les remercie énormément de leur confiance. Un très gros merci à mes patrons Yves Hurtubise et François Gagné-Bourque pour leur présence et accessibilité lors de ce projet. Leur soutien et leurs connaissances dans leur domaine ont vraiment été inspirants et appréciés. J'ai vraiment hâte d'être officiellement un employé!

J'aimerais remercier Mélodie B. Plourde, l'équipe du laboratoire d'Hugo et l'équipe du laboratoire d'Ulysse pour leur support et leur aide lors de ce projet. Leur présence et leurs conseils ont été grandement appréciés et vont me suivre toute ma carrière.

J'aimerais remercier ma famille qui malgré la distance a toujours été présente dans les moments un peu plus difficiles comme dans les plus beaux. Ils n'ont jamais cessé de m'encourager à persévérer, ce qui a été une grande motivation. Un immense merci à ma copine qui pendant ses années a réussi à m'endurer et qui m'a aidé à persévérer. Je t'aime LOL.

RÉSUMÉ

Le stress hydrique associé à la sécheresse est l'un des stress les plus dommageables pour les végétaux. Sommairement, le stress hydrique entraîne une forte augmentation des espèces réactives d'oxygène (ROS) et du calcium cytosolique, ce qui mène ultimement à la fermeture des stomates, l'inhibition de la photosynthèse et la mort. Il existe des programmes d'amélioration génétique, mais ceux-ci, ainsi que les plantes les mieux adaptées, ne sont pas capables de suivre la cadence menée par les changements climatiques. Les « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (PGPR) ont été identifiés il y a longtemps comme étant des bactéries capables de promouvoir la croissance des plantes en conditions normales et de stress abiotiques. Cependant, les mécanismes d'action et la persistance des PGPR dans la rhizosphère, qui est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les microorganismes associés qui font partie du microbiote des plantes, sont souvent méconnus ou alors leur efficacité est souvent peu démontrée. Ulysse Biotech, une entreprise de biotechnologies située à Trois-Rivières a développé un consortium de cinq PGPR qui semble permettre aux plantes de mieux résister à la sécheresse lors d'essais en conditions contrôlées et en champs. Le consortium semble être persistant dans la rhizosphère et l'effet observé est la modulation de l'expression du transcriptome végétal, menant à la turgescence, à l'expression de facteurs de transcription affectant les stomates et à l'expression de gènes de réponse à la sécheresse. En considérant les connaissances déjà établies sur les mécanismes d'actions et la persistance dans la rhizosphère, nous présentons une approche moléculaire de qRT-PCR permettant d'observer la modulation de 3 gènes de la laitue (*Lactuca sativa*) (parmi 14 gènes testés) en conditions de sécheresse avec présence du consortium. Les informations acquises par ce projet permettront d'atteindre le plein potentiel du consortium bactérien en plus d'asseoir sur des bases scientifiques les allégations d'Ulysse en ce qui concerne l'augmentation de la tolérance au stress hydrique procuré par l'application du produit Era Boost Pro. Ces informations pourront par la suite servir à la communauté scientifique en ce qui concerne la compréhension des mécanismes d'action des PGPR en conditions de stress hydrique.

Mots-clés : Bacillus, PGPR, Consortium bactérien, qRT-PCR, Sécheresse

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La relation plante/Eau.....	1
1.1.1 Les différents rôles de l'eau au sein des végétaux.....	2
1.2 Le stress hydrique et ses effets	3
1.2.1 Effet sur la morphologie	4
1.2.2 Effet sur la physiologie	6
1.2.3 Mécanismes d'atténuation de la sécheresse.....	11
1.2.4 Gènes et protéines exprimés lors de la réponse face au stress hydrique.	18
1.3 Les PGPR	20
1.3.1 <i>Bacillus velezensis</i>	20
1.3.2 <i>Bacillus megaterium</i>	21
1.3.3 <i>Bacillus paralicheniformis</i>	21
1.3.4 Consortium bactérien.....	21
1.4 Mécanismes d'action des PGPR.....	22
1.4.1 Changements dans l'activité phytohormonale.....	22
1.4.2 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACCd)...	23
1.4.3 Accumulation d'osmolytes.....	23
1.4.4 Production d'exopolysaccharides bactériens (EPS).....	24
1.4.5 Induction de gènes sensibles au stress par PGPR.....	25
1.5 Les aquaporines	25
1.6 La laitue	28

1.7	Le but du projet de recherche	29
1.8	Objectifs et hypothèses	30
CHAPITRE II		
MATÉRIELS ET MÉTHODES		31
2.1	Réalisation de l'expérience de sécheresse	31
2.2	Extraction d'ARN total et synthèse du cDNA.....	32
2.3	Conception des amorces et conditions de qRT-PCR.....	32
2.4	Analyses statistiques.....	34
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		35
3.1	Paramètres agronomiques.....	35
3.1.1	Taille des laitues	35
3.1.2	Masse humide	36
3.1.3	Conductance stomatique	37
3.2	Modification de l'expression des gènes de la laitue	38
3.3	Modification de l'expression d'autres gènes d'aquaporines	40
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		44
4.1	Paramètres agronomiques.....	44
4.1.1	Masse humide	44
4.1.2	Conductance stomatique	46
4.2	Modification de l'expression de gènes d'aquaporines	47
4.3	Améliorations	48
4.3.1	Conditions expérimentales.....	48
4.3.2	Gènes de références	50
4.4	Perspectives	50
CHAPITRE IV		
CONCLUSION.....		51
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		52
ANNEXE A		
CONDITIONS DE SÉCHERESSE ÉVALUÉES PAR LES TENSIOMÈTRES.		64

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation de l'état de la vacuole en condition hyper, iso et hypotonique.....	2
1.2	Représentation des cellules de gardes et des stomates.....	7
1.3	Fonctionnement des stomates et échanges ioniques au niveau de la membrane des cellules de garde (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019)	8
1.4	Mécanisme de dérégulation de la photosynthèse proposé par Farooq et al. 2012.....	9
1.5	Évolution de la quantité en ROS dans le temps versus la capacité de la défense antioxydante lors d'un stress hydrique	11
1.6	Mécanismes d'actions de la plante sous un stress hydrique	13
1.7	Modifications intracellulaires médiées par l'ABA	15
1.8	Schéma présentant le mécanisme de transduction des signaux hormonaux/métaboliques menant à la fermeture des stomates sous l'effet d'un stress hydrique	16
1.9	Enzymes principales, ainsi que leur cible, dans la défense antioxydante enzymatique (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019)	17
1.10	Principales molécules impliquées lors de la défense antioxydante non enzymatique (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019)	17
1.11	Mécanisme de la perception d'un stress hydrique chez les plantes (Bhatla et Lal 2018)	18
1.12	Représentation de la structure et du fonctionnement d'une aquaporine	26
1.13	Représentation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau en phase liquide	28
3.1	Illustration faites sous différentes conditions au T2	35
3.2	Évolution de la masse humide moyenne dans le temps	36
3.3	Évolution de la conductance stomatique dans le temps.....	37

3.4	Évaluation du niveau d'expression des gènes <i>SOD</i> , <i>DHN3</i> , <i>PIP</i> et <i>CAT1</i> chez les laitues traitées.....	38
3.5	Évaluation du niveau d'expression des gènes <i>SOD</i> , <i>DHN3</i> , <i>PIP</i> et <i>CAT1</i> chez les laitues traitées et stressées.....	39
3.6	Évaluation du niveau d'expression des gènes <i>SOD</i> , <i>DHN3</i> , <i>PIP</i> et <i>CAT1</i> chez les laitues non traitées et stressées.....	40
3.7	Évaluation du niveau d'expression des d'aquaporines <i>PIP</i> , <i>TIP</i> et <i>TIP2;1</i> chez les laitues traitées.....	41
3.8	Évaluation du niveau d'expression des d'aquaporines <i>PIP</i> , <i>TIP</i> et <i>TIP2;1</i> chez les laitues traitées et stressées.....	42
3.9	Évaluation du niveau d'expression des d'aquaporines <i>PIP</i> , <i>TIP</i> et <i>TIP2;1</i> chez les laitues non traitées et stressées.....	42
A1	Évolution de l'humidité du sol dans le temps pendant la durée complète de l'expérience.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
A.1	Amorces utilisées lors de ce projet	64
A.2	Évolution de la masse humide des plantes dans le temps.....	65
A.3	Évolution de la conductance stomatique dans le temps.....	66
A.4	Liste des gènes sélectionnés pour l'étude	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

**	Significatif au seuil $p \geq 0,05$
ABA	Acide abscissique
ACCd	Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Paire de bases
Ca	Calcium
CAT1	Catalase peroxidase 1
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CO ₂	Dioxyde de carbone
DHN3	Dehydrine
DREB2B	Dehydration-responsive element-binding protein 2A-related
EPS	Exopolysaccharides bactériens
erd15	Early responsive to dehydration 15
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
LEA-14-A	Desiccation-related protein LEA14-related
MET1B	Cytosine-specific methyltransferase 1
Mg	Magnésium
mVOC	Composés organiques volatils microbiens
N ₂	Azote atmosphérique

NADP-ME	Enzyme malique à NADP
NOS	Espèces réactives d'azote
O2	Oxygène gazeux
P5CDH	Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase
P5CR	Pyrroline-5-carboxylate reductase
P5CS1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérase enchainée
PDH1	Proline dehydrogenase 1
PEPCase	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PGPR	Plant Growth Promoting Bacteria
PIP	Plasma membrane intrinsic protein
PPDK	Pyruvate phosphate dikinase
PT	Non traité
PTS	Non traité-stressé
qPCR	Réaction de polymérase enchainée quantitative
qRT-PCR	Réaction de polymérase enchainée quantitative avec rétrotranscription
RD29A	Responsive to desiccation 20A
RD29B	Responsive to desiccation 20B
RIDER	Rhizobacterial-induced drought endurance and resilience
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RT	Rétrotranscription ou rétrotranscriptase
Rubisco	Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase
RuBP	Ribulose bisphosphate
sHSP17.4	Small heat-shock protein 17.4

Si	Silicium
SOD	Superoxide dismutase
T	Traité
TIP	Tonoplast intrinsic protein
TIP2;1	Delta tonoplast integral protein
TM	Température de fusion
TP	Pression de turgescence
TS	Traité-stressé
IAA	Indole-3-acétique acide
IAM	Indole-3-acétamide
IAQx	Indole-3-acétaldoxime
TAM	Tryptamine
IPA	Acide indole-3-pyruvique
ILA	Acide indole-3-lactique
ICA	Acide indole-3-carboxylique
MJ	Acide jasmonique
AITC	Isocyanate d'allyle
POX	Peroxydase
AS	Acide salicylique
ASA	Acide acétylsalicylique
PA	Acide phosphatidique
S1P	Sphingosine-1-phosphate
PAs	Polyamines
CuAO	Cuivre amine oxydase
PAO	Polyamine oxydase

GR	Glutathionne réductase
GST	Glutathionne-S-transférèse
GPX	Glutathionne peroxydase
APX	Ascorbate peroxydase

LISTE DES SYMBOLES

MPa	Mégapascal
Ψ_w	Potentiel Hydrique
Ψ_s	Potentiel de soluté
Ψ_p	Potentiel de pression
Ψ_g	Potentiel gravitationnel
Ψ_m	Potentiel matriciel
°C	Degrés Celsius
Ψ_s (interne)	Potentiel de soluté interne
Ψ_s (externe)	Potentiel de soluté externe
μ	Micro
M	Molaire
μM	Micromolaire
μL	Microlitre
mL	Millilitre
g	Gramme
mm	Millimètre
pH	Potentiel hydrogène
mM	Millimolaire
%	Pourcentage
L	Litre
°K	Degrés Kelvin
$p \geq$	Valeur de p plus petite ou égale à
mL/L	Millilitres par litre

kPa	Kilopascal
mg	Milligramme
ng/uL	Nanogramme par microlitre
s	Secondes

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La relation plante/Eau

L'eau est l'un des constituants les plus importants pour la vie. Elle est considérée comme un solvant universel (Bhatla et Lal 2018) et permet la mise en solution de composés, tels les sucres, les ions, les protéines et autres molécules qui sont essentielles à la viabilité et à la croissance des végétaux. Elle sert aussi de milieu où la grande majorité des réactions métaboliques se produisent, telles la réduction, l'oxydation, la production d'énergie, la photosynthèse et beaucoup d'autres. De plus, elle est à la base du transport des nutriments. Les plantes étant autotrophes et immobiles, elles dépendent de l'apport en eau et en minéraux présents dans le sol.

À l'intérieur d'une cellule, le potentiel de pression est responsable du maintien de la turgescence, aussi référée à la pression de turgescence (TP). Cette dernière est la différence entre les pressions hydrostatiques intérieures et extérieures à travers la membrane plasmique et la paroi cellulaire. La pression de turgescence, dans des conditions d'équilibre, sera égale à la différence de potentiel de soluté interne et externe à la cellule, correspondant à l'équation suivante : $TP = \Psi_{s(\text{interne})} - \Psi_{s(\text{externe})}$. La pression de paroi est une pression résultant de la pression exercée sur le contenu d'une cellule végétale par la paroi cellulaire qui est égale en force et opposée en direction de la TP. La présence de paroi cellulaire végétale permet à ces cellules de résister à une large gamme de variations osmotiques. Dans l'eau pure ou dans une solution hypotonique, les cellules végétales gonflent, mais n'éclatent pas. Le potentiel osmotique négatif provoque le mouvement de l'eau uniquement dans la cellule. En raison de l'entrée d'eau, la membrane plasmique est pressée contre la paroi cellulaire, ce qui produit l'état de turgescence. Pour l'état de plasmolyse (inverse de turgescence), il y a perte d'eau due à une concentration de solutés extracellulaire plus grande que la concentration de soluté

intracellulaire (Figure 1.1). Cela résulte en un dégonflement de la vacuole (Bhatla et Lal 2018).

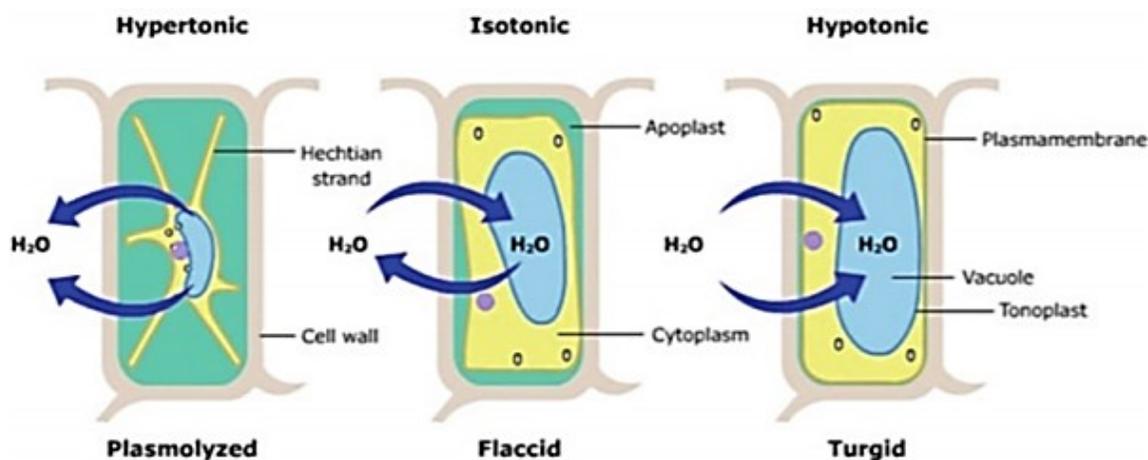


Figure 1.1 Représentation de l'état de la vacuole en condition hyper, iso et hypotonique.

1.1.1 Les différents rôles de l'eau au sein des végétaux

Dans les plantes, l'eau a six rôles cruciaux à remplir. Ces derniers sont les rôles de solvant, de réactif, de transport, de croissance cellulaire, de turgescence et de stabilité thermique (Meidner et Sheriff 1976, Kramer et Boyer 1995). Le rôle de réactif est assumé à deux endroits, soit lors de la photosynthèse et dans les réactions d'hydrolyse. Dans la photosynthèse, l'eau contribue aux électrons utilisés dans les réductions de carbone en glucides, et des protons qui jouent un rôle dans la production d'ATP et dans le dégagement d'oxygène. En fait, l'oxygène dégagé sous forme d' O_2 provient de l'oxydation de molécules d'eau. L'hydrolyse est une réaction (enzymatique ou chimique) où une liaison covalente est rompue par l'action d'une molécule d'eau. C'est grâce à ce type de réactions que les sucres stockés sous forme d'amidon peuvent être converti en sucres simples pouvant être utilisés par la plante (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018).

Le rôle de transport est assuré en distribuant les minéraux absorbés dans le sol à partir des racines partout dans la plante. Les glucides, formés lors de la photosynthèse, les protéines et l'arsenal immunitaire sont également distribués à travers la plante par l'eau.

Lors de la division cellulaire, les vacuoles des cellules nouvellement formées sont dispersées et petites. Les minéraux absorbés sont déposés dans ces petites vacuoles. Cela provoque la diffusion de l'eau dans les petites vacuoles, et elles s'élargissent créant une pression intracellulaire. Cette pression dilate les parois plastiques des jeunes cellules, ce qui conduit à la croissance cellulaire. Ces petites vacuoles finissent par fusionner en une vacuole centrale, et les parois deviennent si épaisses qu'elles perdent leur plasticité, de sorte qu'à maturité la cellule ne se dilate plus, mais maintient la pression de l'eau à l'intérieur de la cellule (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018).

Le rôle de l'eau dans la turgescence est très simple : générer une pression intracellulaire dans les cellules matures afin qu'elles maintiennent leur forme. C'est d'ailleurs la turgescence qui donne la forme à de nombreux tissus tels que les feuilles et les plantes annuelles qui n'ont pas de tissus ligneux ou d'autres tissus renforçant. Finalement, l'eau est la substance ayant besoin de la plus grande quantité d'énergie (calories) afin d'augmenter sa température d'un degré Kelvin ($^{\circ}\text{K}$). Pour cette raison, les plantes, qui sont principalement constituées d'eau, peuvent absorber une quantité considérable de chaleur sans drastiquement augmenter en température. De ce fait, le même nombre de calories doit être perdu pour que la température de la plante soit abaissée. Tout cela permet aux plantes de conserver une température relativement constante tout au long de la journée (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018).

1.2 Le stress hydrique et ses effets

Le stress hydrique associé à la sécheresse est l'un des stress abiotiques les plus dommageables pour les végétaux (Xiong, Schumaker et al. 2002, Golldack, Li et al. 2014). La sévérité de ce stress est difficile, voire impossible à prédire, car elle dépend de plusieurs facteurs, comme la distribution des pluies, l'évaporation de l'eau et la capacité de rétention d'eau des sols (Wery, Silim et al. 1994). L'imposition de la sécheresse provoque des changements morpho-physiologiques, anatomiques et moléculaires dans les plantes affectées (Poudel, Mendes et al. 2021) et peut provoquer une perte des récoltes allant

fréquemment jusqu'à 70 %, et ce, parmi une grande variété de cultures (Kaur, Behl et al. 2008, Akram, Ali et al. 2013).

1.2.1 Effet sur la morphologie

Le stress hydrique a la possibilité d'affecter la plante dans son entièreté et ce peu importe le stade de développement. Les conséquences principales de la sécheresse sont la réduction du taux de division et d'expansion cellulaire, de la taille des feuilles, de la tige et des racines, la perturbation de l'oscillation des stomates, un débalancement de l'apport en eau et en nutriments, une diminution l'efficacité d'utilisation de l'eau et ultimement la diminution de la productivité des cultures (Farooq, Basra et al. 2009, Li, Ye et al. 2009).

Les graines sont à un stade développemental où il est nécessaire d'avoir la bonne quantité d'eau pour la croissance. Même si toutes les autres conditions requises à la germination sont présentes, un manque d'eau va empêcher les graines de s'en imbiber et de germer (Poudel, Mendes et al. 2021). Un faible taux de germination et un mauvais établissement des cultures sont un des premiers signes d'une carence hydrique (Harris, Tripathi et al. 2002).

Un système racinaire bien développé est essentiel pour que la plante soit solidement ancrée au sol et pour une absorption optimale de l'eau et des nutriments dans l'environnement immédiat d'une plante. La sécheresse provoque des modifications apparentes à l'architecture des racines et des caractères morphologiques dans les plantes cultivées en masse. Il a été montré qu'un faible stress n'affecte pas la croissance racinaire du maïs (Sacks, Silk et al. 1997) tandis qu'un stress plus important réduit grandement la croissance racinaire dans le tournesol (Tahir, Imran et al. 2002). Le stress hydrique semble également diminuer le poids sec des racines de manière significative (Mohammadian, Moghaddam et al. 2005) et augmenter le ratio racine/tige pour une multitude d'espèces (Wu et Cosgrove 2000). D'autres traits agronomiques, comme la longueur des racines, de la tige, le contenu relatif en eau, la longueur des panicules, la quantité de grains par panicule et la biomasse sèche ont été démontrés comme affectés par le stress hydrique (Manickavelu, Nadarajan et al. 2006).

La croissance de la surface foliaire est le facteur principal affectant la photosynthèse et rendement en cultures (Jaleel, Manivannan et al. 2009). La croissance dépend principalement de la pression de turgescence des feuilles, de la température de la canopée et de la disponibilité des photo-assimilats (Rucker, Kvien et al. 1995, Fahad, Bajwa et al. 2017). Le stress hydrique a été identifié comme réduisant significativement l'expansion des feuilles, ce qui affecte négativement les processus associés à la photosynthèse et qui réduit la surface foliaire de plusieurs espèces de plantes (Denčić, Kastori et al. 2000, Zhang, Duan et al. 2004, Nahar, Kalita et al. 2016).

Plusieurs mécanismes interviennent pour mener à terme la croissance d'une plante; la division et l'agrandissement cellulaire, l'enracinement et plusieurs autres événements écologiques, physiologiques et morphologiques. Le stress hydrique affecte négativement ces événements auxquels la croissance des plantes est dépendante. Une réduction de la pression de turgescence cellulaire, une absorption d'eau réduite, une interruption de l'écoulement de l'eau du xylème vers les cellules environnantes et une réduction d'efficacité de photosynthèse et de la quantité de photo-assimilats requis pour la division cellulaire, la mitose et l'agrandissement cellulaire ont été observés lors d'un stress hydrique (Nonami 1998, Kaya, Okçu et al. 2006, Hussain, Malik et al. 2008). Cela mène à des cellules plus petites, une réduction de la taille de la plante et de la surface foliaire, et une grande diminution du rendement des cultures (Kaya, Okçu et al. 2006).

Un approvisionnement en eau limité déclenche un signal provoquant un passage précoce du stade de développement végétal à la phase de reproduction (Desclaux et Roumet 1996). Les effets du stress sont moins dévastateurs lors la période végétative que lors de la période de reproduction. Ces effets sont phase-spécifique et surviennent intensément lors de la floraison, du développement du grain ou de graines (Hussain, Men et al. 2019), du stade pré-anthèse, où la taille, la quantité de grains et la floraison sont réduits (Majid, Asghar et al. 2007, Dickin et Wright 2008), ou du stade post-anthèse (Estrada-Campuzano, Miralles et al. 2008). Une sécheresse à la floraison est critique, car elle peut augmenter stérilité du pollen entraînant une diminution de la quantité en grains (Hussain, Malik et al. 2008). Le développement du grain est particulièrement

affecté, car les enzymes participants à ce processus (amidon synthase, adénosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, enzyme ramifiant l'amidon et sucrose synthase) sont grandement affectées par le stress hydrique (Ahmadi et Baker 2001, Taiz et Zeiger 2006).

1.2.2 Effet sur la physiologie

Le stress hydrique est un processus très complexe affectant les plantes au niveau physio-morphologique (Rahdari et Hoseini 2012). Au niveau physiologique, le premier signe d'une carence hydrique est une accélération de la biosynthèse d'acide abscissique (ABA) par les racines (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006). Cette molécule est une hormone majoritairement accumulée lors d'un stress hydrique dont la synthèse déclenche une reprogrammation majeure de l'activité transcriptomique menant à la fermeture stomatique, une diminution de la conductance stomatique et une réduction des pertes d'eau dues à la transpiration (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006, Zhang, Jia et al. 2006). Les liens unissant ABA et stress hydrique sont concrets depuis un moment puisqu'il a été observé que la concentration en ABA diminue de manière dépendante de l'intensité du stress hydrique (Zhang, Jia et al. 2006).

1.2.2.1 Les échanges gazeux

Les échanges gazeux photosynthétiques ont pour origine le déroulement simultané d'un ensemble de processus donnant lieu à la production ou à la fixation de CO₂ et d'O₂ (Pratt et Cornely 2019). L'activité photosynthétique consiste en la fixation du CO₂ catalysée par l'activité carboxylase de la Rubisco accompagnée d'une émission d'oxygène due à l'oxydation de l'eau. Ces échanges sont assurés par des structures nommées stomates (Morot-Gaudry et Farineau 2018, Pratt et Cornely 2019).

Les stomates sont constitués de deux cellules de garde qui sont logées dans l'épiderme (Figure 1.2). Elles présentent au niveau de leur partie commune un épaissement cellulosique qui rend possible leur déformation lorsque l'eau afflue après

une augmentation de pression osmotique dans le milieu cellulaire. Elles sont naturellement à l'état de plasmolyse et se déforment à l'état de turgescence, ce qui forme une sorte de pore appelé stomate, qui est l'endroit par où les échanges gazeux se réalisent.

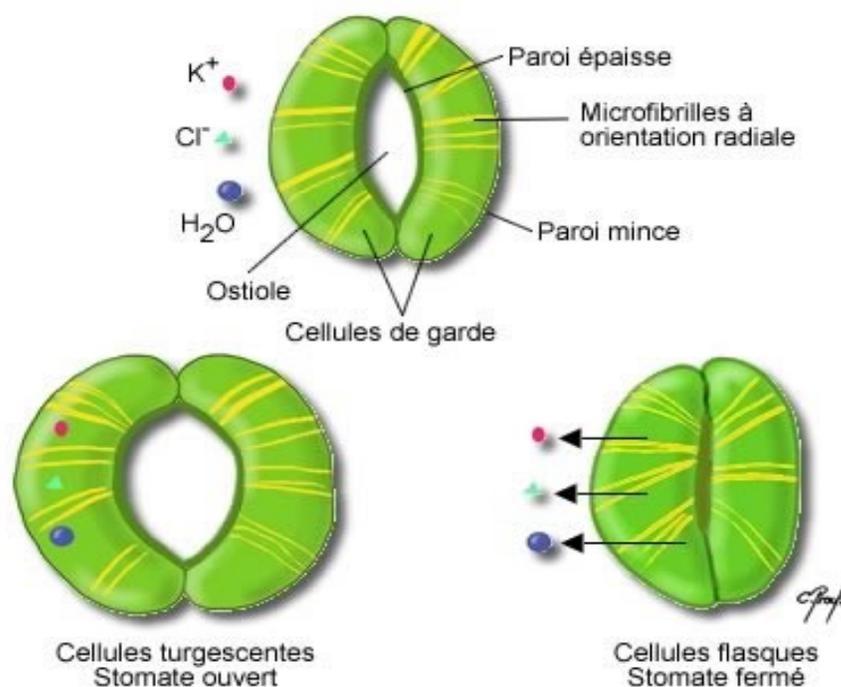


Figure 1.2 Représentation des cellules de gardes et des stomates.

Les stomates sont fermés la nuit et s'ouvrent au début de la photopériode. Leur ouverture dépend aussi de la concentration atmosphérique en CO_2 (une forte concentration les ferme), et ce à tout moment du cycle circadien. L'acide abscissique, peut provoquer la fermeture des stomates en se fixant à son récepteur présent sur la membrane des cellules de garde. Cela déclenche une entrée de calcium et une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} , ce qui déclenche l'entrée des ions Cl^- et la sortie des ions K^+ (Morot-Gaudry et Farineau 2018).

Le potassium et les anions correspondants sont la cause principale des variations de pression osmotique observées dans les cellules de garde. L'ouverture des stomates est dépendante de la concentration en potassium; plus elle baisse, moins ils sont ouverts. L'accumulation du potassium dans le cytosol et dans la vacuole des cellules de garde est

stimulée par les radiations bleues et est accompagnée d'une sortie de protons issus du fonctionnement d'une ATPase localisée sur la membrane du plasmalemme (Figure 1.3). La fermeture et l'ouverture des stomates dépendent donc aussi de la lumière (Morot-Gaudry et Farineau 2018).

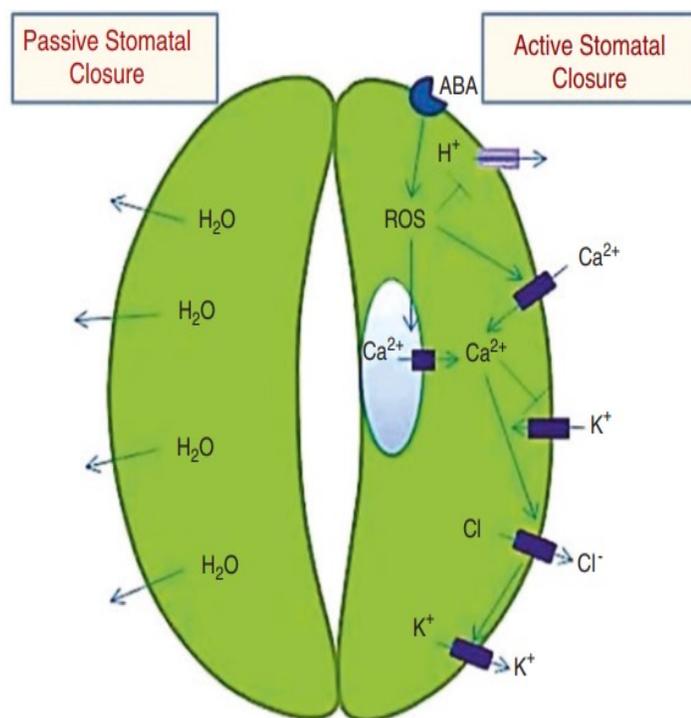


Figure 1.3 Fonctionnement des stomates et échanges ioniques au niveau de la membrane des cellules de garde (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019).

En parallèle, la quantité limitée d'eau dans le sol et la réduction du taux de transpiration due à un déficit hydrique font en sorte que l'absorption des nutriments par les racines et l'efficacité d'utilisation par la plante diminuent, car la baisse du potentiel sol-eau, ralentit le taux de diffusion des nutriments entre la matrice du sol et la surface des racines (Farooq, Wahid et al. 2009). Ainsi, la diffusion et le débit massique des nutriments hydrosolubles tels que le nitrate, le sulfate, le Ca, le Mg et le Si sont diminués (Selvakumar, Panneerselvam et al. 2012). Le taux de transpiration régule aussi l'apport et l'afflux en CO_2 , et la température des feuilles, ce qui fait que ces processus sont dérégulés lors d'un stress hydrique; la température des feuilles augmente tandis que l'apport et l'afflux en CO_2 diminuent (de Campos, de Carvalho et al. 2011).

La photosynthèse est un autre processus complexe qui est grandement affecté par les effets d'une carence hydrique, car elle est associée de près ou de loin à tous les éléments et processus mentionnés ci-haut. Elle se déroule dans les cellules foliaires, qui elles contiennent les chloroplastes, organites indispensables au déroulement de la photosynthèse (Morot-Gaudry et Farineau 2018). Le chloroplaste est l'organite où les pigments photosynthétiques et les thylacoïdes sont retrouvés. La chlorophylle est le composant principal du chloroplaste qui joue un rôle important dans la photosynthèse. Les pigments chlorophylliens sont essentiels pour que les plantes captent la lumière et l'utilisent pour le fonctionnement de la photosynthèse (Praba, Cairns et al. 2009). Il a été montré que le stress hydrique diminue considérablement la quantité et la fonctionnalité de la chlorophylle a et b en raison d'un stress oxydatif accru ou d'une photo-oxydation accrue (Farooq, Wahid et al. 2009, Anjum, Ashraf et al. 2017), (Figure 1.4). Ces réductions peuvent aussi être attribuées à la réduction de la synthèse des précurseurs des pigments chlorophylliens (Anjum, Yaseen et al. 2003).

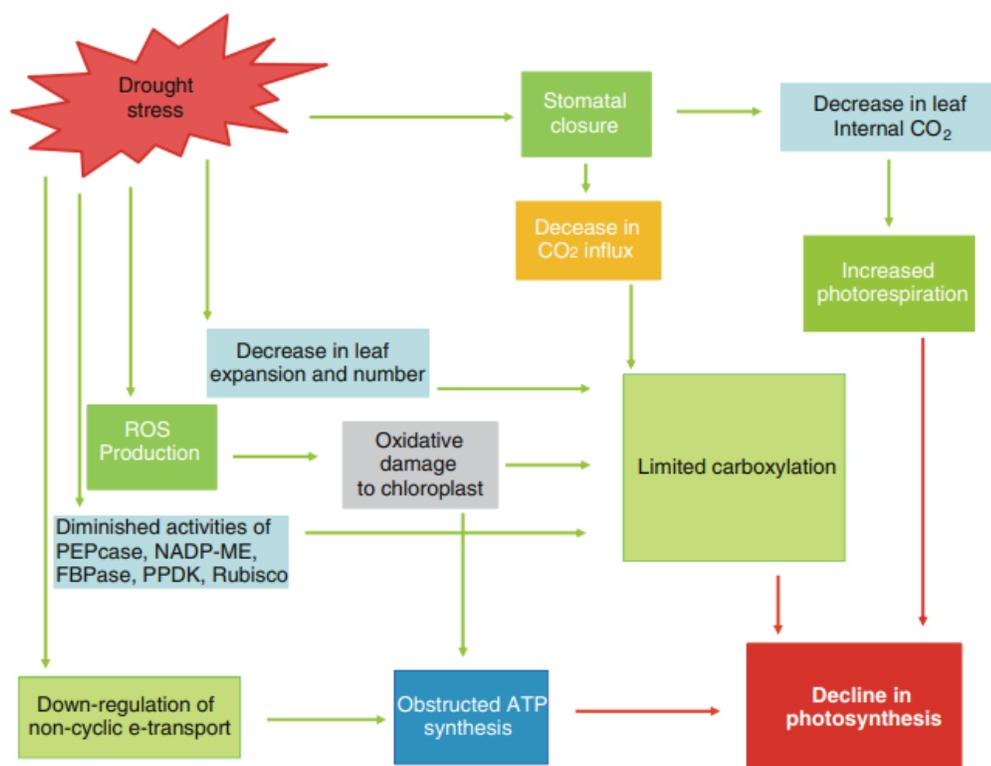


Figure 1.4 Mécanisme de dérégulation de la photosynthèse proposé par Farooq et al. 2012.

Lors de la réception d'une grande quantité d'énergie lumineuse avec une réserve de CO₂ limité sous les effets d'un stress hydrique, il y a réduction du nombre d'accepteurs d'électrons dans les chloroplastes, et la ferrédoxine reste dans un état de forte réduction, ce qui ralentit la régénération du NADP⁺. Le contenu de la cellule devient plus visqueux, ce qui engendre la dégradation des membranes et de l'appareil photosynthétique. Au même moment, l'efficacité la carboxylation et de la fixation du CO₂ est réduite, ce qui augmente énormément le taux de photorespiration (ensemble des réactions mises en œuvre par les organismes photosynthétiques suite à l'activité de la RuBisCO) (Farooq, Wahid et al. 2009, Farooq, Hussain et al. 2012, Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). La résultante est la réduction du transport des électrons, qui lui réduit la production d'ATP, qui à son tour altère la régénération du RuBP, déjà affectée par le ralentissement de la RuBisCO, et l'augmentation de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS), qui sont produits lors du transfert d'électrons hautement énergétiques vers le photosystème I. De plus, le stress hydrique cause un déséquilibre entre la lumière capturée et sa consommation, ce qui modifie la photochimie des chloroplastes du photosystème II par l'action d'oxygène singulet, augmentant la production de ROS (Farooq, Wahid et al. 2009, Farooq, Hussain et al. 2012, Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019).

1.2.2.2 Les espèces réactives d'oxygènes (ROS)

De plus, le stress hydrique entraîne la production de radicaux libres et de ROS. Le processus par lequel les ROS causent problème se nomme stress oxydatif (Farooq, Wahid et al. 2009), qui est une agression des cellules via l'action des ROS. Les éléments conduisant à leur production ne sont pas encore très bien compris, mais il est supposé que le tout commence par leur accumulation dans le noyau cellulaire, le peroxyosome, la mitochondrie et le chloroplaste (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). Deux types d'enzymes ont été identifiées comme productrices de ROS : la NADPH oxydase, qui est une protéine produisant les ROS dans l'apoplaste et dans les membranes plasmiques, et les peroxydases apoplastiques (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). Les ROS les plus communs sont les radicaux superoxyde (O₂⁻), les radicaux hydroxyles ([•]OH), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, dont 70 % est produit par la photorespiration), les radicaux alkyles

(RO⁻) et les oxygènes singulets (^{1/2}O₂) (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). Il existe des mécanismes de nettoyage pour éliminer les ROS (la défense antioxydante, entre autres), mais ils ont une capacité limitée (Figure 1.5) (Farooq, Wahid et al. 2009).

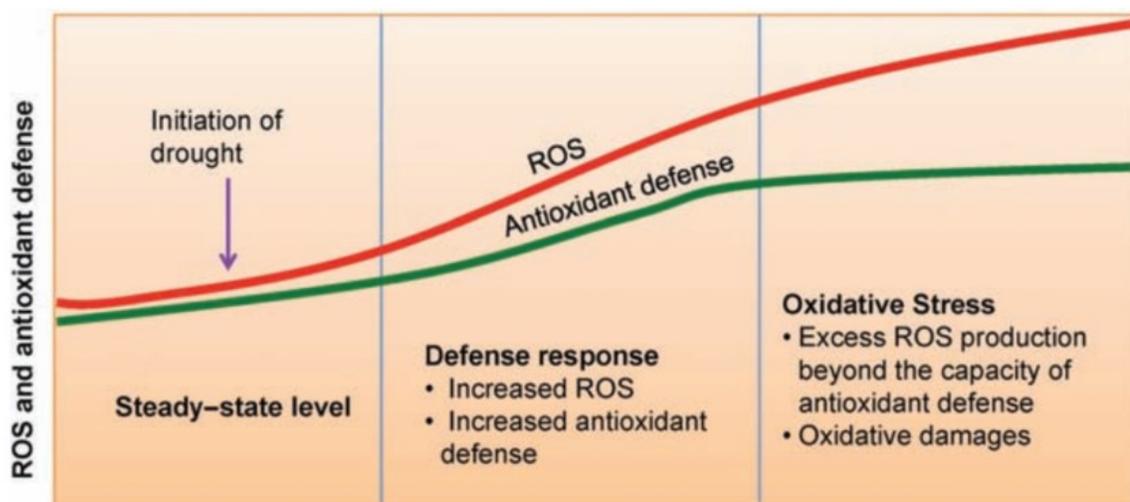


Figure 1.5 Évolution de la quantité en ROS dans le temps versus la capacité de la défense antioxydante lors d'un stress hydrique.

Lorsque la production de ROS est supérieure à celle-ci, les ROS peuvent dégrader les acides nucléiques (oxydation, bris de la double hélice, excision d'un brin), les protéines (oxydation des résidus d'acides aminés, clivage des liaisons peptidiques et agrégation entre les protéines) et les membranes cellulaires/nucléaires par peroxydation lipidique, menant ultimement à la mort cellulaire (Juan, Pérez de la Lastra et al. 2021).

1.2.3 Mécanismes d'atténuation de la sécheresse

Le stress hydrique étant un problème complexe, les plantes nécessitent une réponse tout aussi complexe pour leur permettre d'atténuer les effets néfastes entraînés par ce stress. Tout comme les sections ci-haut, les mécanismes d'atténuations de la sécheresse sont présents au niveau morphologique et physiologique.

1.2.3.1 Évitement de la sécheresse et flexibilité phénotypique

La capacité des plantes à maintenir un état élevé d'hydratation cellulaire sous sécheresse se nomme évitement de la sécheresse (drought avoidance) et elle consiste en une adaptation permettant d'aller chercher plus d'eau dans le sol qu'en conditions normales et en minimisant les pertes d'eau par transpiration (Blum 2005). Le système racinaire étant le seul organe pouvant extraire l'eau du sol, un système racinaire plus large et plus profond est un trait observé de manière importante dans les plantes ayant une tolérance naturellement accrue face au stress hydrique. La plasticité racinaire est la capacité d'un génotype à réguler sa croissance racinaire selon les contraintes en vigueur (Yamauchi, Pardales Jr et al. 1994). À titre d'exemple, les génotypes *Arachis hypogaea L* avec une masse de racines sèche et une densité de racine plus profonde ont produit plus de grains que les génotypes ayant ces caractéristiques moins développées (Jongrunklang, Toomsan et al. 2011).

La réduction de la perte d'eau par transpiration se traduit par une multitude d'adaptation morphologique comprenant un ratio tige-racine plus élevé, une quantité de feuilles réduites et des feuilles plus petites (Lei, Yin et al. 2006). Une résistance cuticulaire et stomatale accrue, un nombre de stomates réduit et une orientation verticale des feuilles sont aussi des traits importants du mécanisme d'évitement de la sécheresse (Figure 1.6) (Wang 2006).

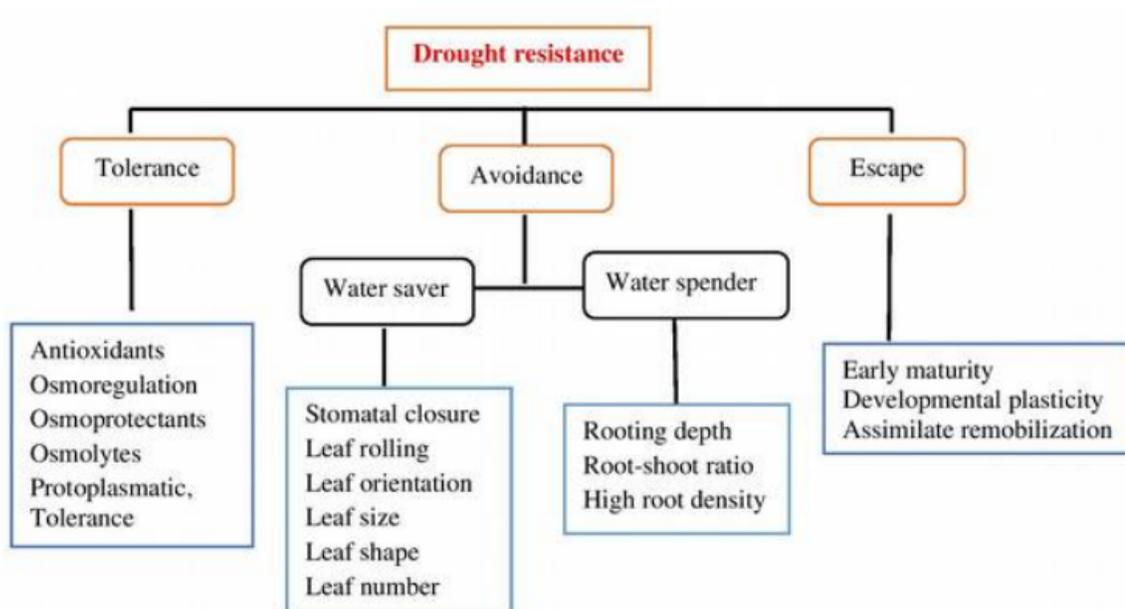


Figure 1.6 Mécanismes d’actions de la plante sous un stress hydrique.

1.2.3.2 Mécanisme d’action de l’acide abscissique et fermeture stomatique

La fermeture stomatique est l'une des premières réponses en cas de sécheresse concomitante avec la réduction du potentiel hydrique et la perte de turgescence associée à la diminution de la teneur relative en eau. Elle peut être considérée comme la première ligne de défense contre le stress hydrique, car elle est beaucoup plus rapide que les autres réponses (Agurla, Gahir et al. 2018). Sous conditions de sécheresse légère, la fermeture stomatique joue un rôle protecteur pour réduire la perte et augmenter l'efficacité de son utilisation, mais en cas de forte sécheresse, cela devient dangereux. Elle est dépendante de plusieurs facteurs qui sont également modifiés par le stress hydrique parmi lesquels se trouvent la disponibilité de l'eau du sol, le déficit de pression de vapeur, les précurseurs de l'acide abscissique (ABA) ou des cytokinines, la composition minérale et le pH du xylème (Agurla, Gahir et al. 2018).

L’ABA agit comme un régulateur important et permet de raffiner le spectre de fonctions pour permettre aux plantes pour faire face au stress hydrique. Sa présence favorise un efflux d’anions et de potassium résultant en une baisse de la turgescence et en la fermeture des stomates (Agurla, Gahir et al. 2018). Cette fermeture est aussi médiée par

les d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et d'azote (NOS), la concentration cytosolique en Ca^{2+} , les protéines G, des protéines kinases, des phosphatases et des phospho/sphingolipides (Figure 1.7) (Agurla, Gahir et al. 2018). Les ROS, NOS, le Ca^{2+} la kinase OST1 et les phosphatases ABI1/ABI2 forment le centre du réseau de signalisation induisant la fermeture stomatique (Agurla, Gahir et al. 2018). La fixation de l'ABA sur les récepteurs RCAR/PYR1/PYL induit des changements de conformations facilitant la liaison réversible des phosphatases ABI1/ABI2. Leur liaison libère l'effet inhibiteur des PP2C (phosphatase de type 2C) sur SNF1 conduisant à l'activation de la NADPH oxydase et à la libération de ROS (Agurla, Gahir et al. 2018). Ceux-ci, avec l'ABA, ont pour rôle l'élévation de la concentration en NOS, en Ca^{2+} et du pH cytosolique. Les NOS ont pour rôles la régulation des enzymes produisant les ROS/NOS et la régulation des canaux ioniques (Agurla, Gahir et al. 2018). Le Ca^{2+} active les canaux anioniques de type S et ferme les canaux potassiques, conduisant à la fermeture stomatique. L'élévation de Ca^{2+} active des kinases calcium dépendantes (CDPKs), comme la OST1, activent les canaux anioniques lents (SLAC). Au final, toute cette cascade de signalisation mène à la baisse de la concentration ionique intracellulaire des cellules de gardes et ultimement à la fermeture des stomates (Figure 1.8) (Agurla, Gahir et al. 2018).

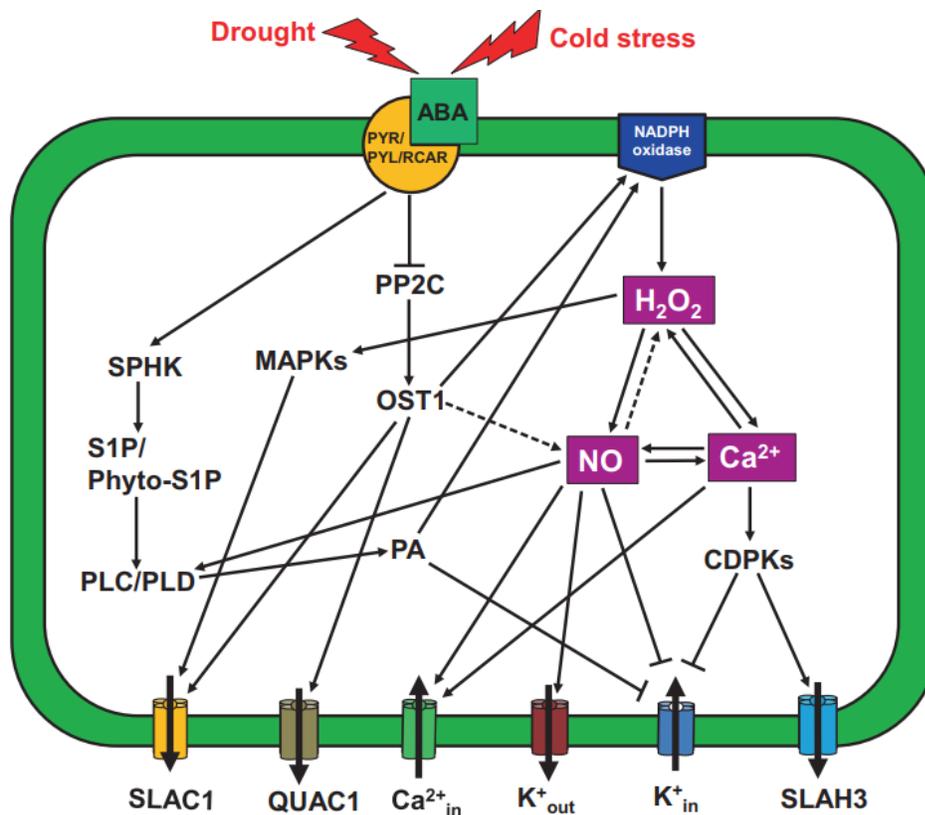


Figure 1.7 Modifications intracellulaires médiées par l'ABA.

L'ABA a aussi été observé ayant une multitude d'effets chez la laitue. Son accumulation augmente la concentration de proline et d'acides aminés (Al Muhairi, Cheruth et al. 2015). Des modifications causées par l'ABA sur la concentration de molécules antioxydantes (α -tocophérol et acide ascorbique) ainsi que sur l'activité d'enzymes antioxydantes (SOD, CAT, POX) ont aussi été observées (Al Muhairi, Cheruth et al. 2015).

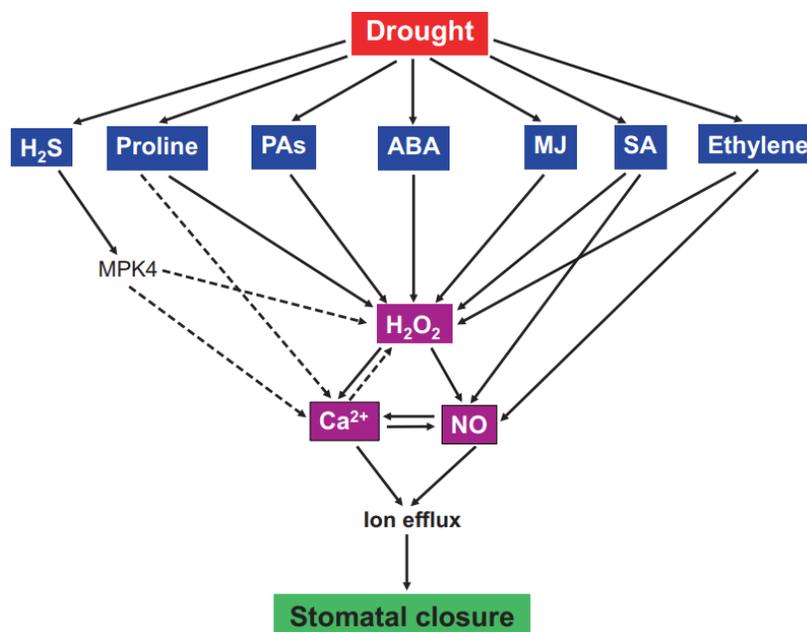


Figure 1.8 Schéma présentant le mécanisme de transduction des signaux hormonaux/métaboliques menant à la fermeture des stomates sous l'effet d'un stress hydrique.

En réponse à la surproduction des ROS, les végétaux ont développé un mode de défense, la défense antioxydante, se divisant en deux sections, soit enzymatique (Figure 1.9) et non enzymatique (Figure 1.10). La défense enzymatique se compose de sept enzymes, qui sont la superoxyde dismutase, la peroxydase, la catalase, la glutathionne réductase (GR), la glutathionne-S-transférase (GST), la glutathionne peroxydase (GPX) et l'ascorbate peroxydase (APX) (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). L'enzyme antioxydante SOD est localisée dans tous les compartiments cellulaires susceptibles aux dommages médiés par les ROS et sa cible principale est l' O_2^- , qui est réduit en H_2O_2 et en O_2 (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). La POD est normalement impliquée dans la signalisation médiée par les ROS dans l'apoplaste, mais lorsque ceux-ci sont en trop grand nombre, elle réduit l' O_2^- en O_2 (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). La CAT est une enzyme importante dans la réponse antioxydante et elle peut dégrader environ 6 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène par seconde en eau et en oxygène gazeux (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). La GR, une enzyme chloroplastique, a un rôle important dans le cycle de l'acide ascorbique et de la glutathionne, qui est un cycle aidant à la détoxification des effets des ROS (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). La GPX est une enzyme utilisant la glutathionne pour réduire le peroxyde d'hydrogène en eau et en

oxygène gazeux (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). La GST a pour implication principale dans la réponse antioxydante la réduction des hydroperoxydes (Dixon et Edwards 2010, Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). L'APX est une autre enzyme impliquée dans le cycle de l'acide ascorbique et de la glutathionne. Elle est chargée de capter et de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, ce qui en fait une enzyme importante dans la défense antioxydante enzymatique (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019).

Enzymatic scavenging system	Enzyme symbol; EC	Reacts with
Superoxide dismutase	SOD; EC 1.15.1.1	O ₂ ^{•-}
Peroxidase	POD; EC 1.11.1.x	ROS (detoxification)
Catalase	CAT; EC 1.11.1.6	H ₂ O ₂
Glutathione reductase	GR; EC 1.6.4.2	GSH cycle
Glutathione S-transferases	GST; EC 2.5.1.18	Hydroperoxide
Glutathione peroxidase	GPX; EC 1.11.1.9	H ₂ O ₂
Ascorbate peroxidase	APX; EC 1.11.1.11	H ₂ O ₂

Figure 1.9 Enzymes principales, ainsi que leur cible, dans la défense antioxydante enzymatique (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019).

La défense antioxydante non enzymatique est composée de sept molécules, soit la proline, la glycine bêtaïne, l' α -tocophérol, l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les flavonoïdes et la glutathionne. Le mécanisme général de cette défense est le don d'électrons des antioxydants aux ROS, ce qui a pour but de les rendre moins toxiques (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019). Un bon antioxydant est une molécule dont la forme oxydée n'est pas toxique, en plus d'être une molécule recyclable (Gest, Garchery et al. 2012).

Nonenzymatic scavenging system	Class of compound	Reaction with ROS
Proline	Osmolyte	Helps to preserve drought tolerance
Glycine betaine	Osmolyte	Helps to preserve drought tolerance
α -Tocopherols	Vitamin E	Helps to maintain cell homeostasis
Ascorbic acid	Vitamin C	Helps to maintain cell homeostasis
Carotenoids	Tetraterpenoid	Photoprotective role in ROS scavenging
Flavonoids	Secondary metabolite	Neutralizes free radicals
Glutathione	Glutathione	Protects the photosynthetic apparatus from ROS

Figure 1.10 Principales molécules impliquées lors de la défense antioxydante non enzymatique (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019).

1.2.4 Gènes et protéines exprimés lors de la réponse face au stress hydrique

Une multitude de gènes et de protéines sont exprimés en réponse face au stress hydrique (Figure 1.11). Des gènes d'osmosenseurs, qui codent pour des protéines détectant la pression des membranes plasmiques, sont impliqués dans la perception rapide d'un stress hydrique (Bhatla et Lal 2018). La transcription de *ATHK1*, un osmosenseur, est régulée à la hausse chez *Arabidopsis*, menant à l'activation de ses fonctions cytoplasmiques. Sa portion cytoplasmique agit comme une kinase, stimulant le durcissement des tissus végétaux via une chaîne de transduction médiée par phosphorylation protéique (Bhatla et Lal 2018).

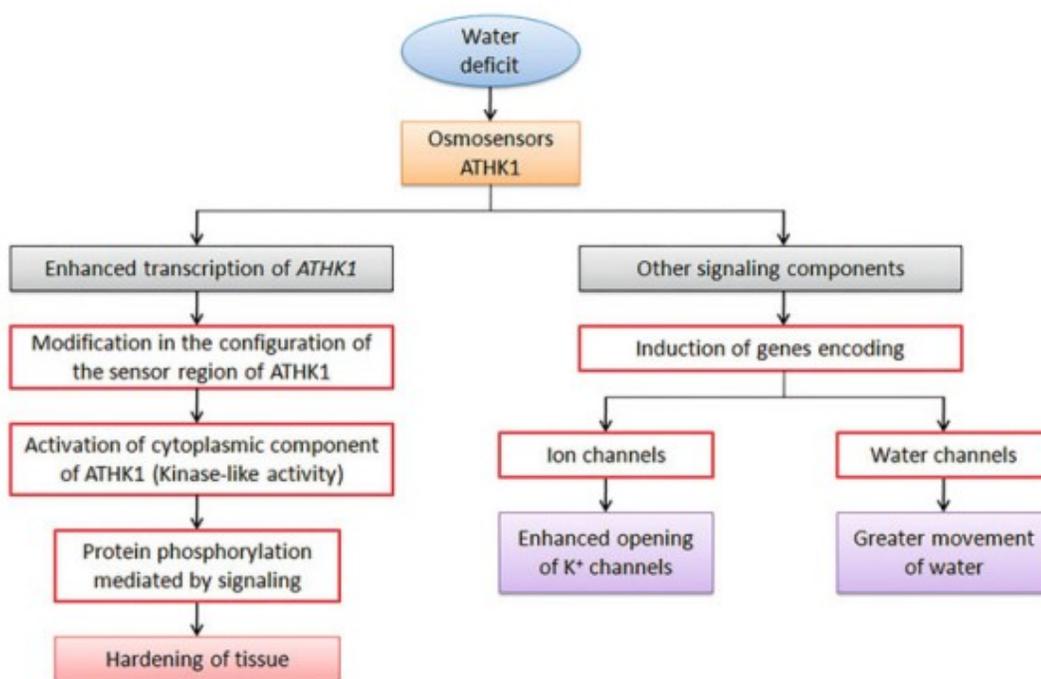


Figure 1.11 Mécanisme de la perception d'un stress hydrique chez les plantes (Bhatla et Lal 2018).

Le gène de l'enzyme P5CDH est régulé à la hausse et est impliqué dans la régulation des ROS et dans le catabolisme de la proline vers le L-glutamate (Rizzi, Monteoliva et al. 2015). Elle régule la quantité de proline présente, permettant d'éviter une toxicité associée à une trop grande quantité (Rizzi, Monteoliva et al. 2015). Les aquaporines (PIP, TIP, SIP, NIP) sont des protéines facilitant le transport membranaire médié par les protéines et

facilitant le transport de l'eau d'un compartiment cellulaire à l'autre (Farooq, Wahid et al. 2009). Il a été observé que ces protéines jouent un rôle important dans la défense face au stress hydrique. Elles contrôlent l'absorption d'eau par les racines en déclinant la conductivité hydraulique (Javot et Maurel 2002) et jouent un rôle majeur dans l'osmorégulation cellulaire (Javot, Lauvergeat et al. 2003).

Plusieurs autres familles de protéines sont aussi impliquées dans la réponse face au stress hydrique. Il y a induction du gène *DREB2B* (*DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING GENE 2*), qui est un gène impliqué dans les voies de signalisation sous conditions de stress. La manipulation de ce gène peut améliorer la tolérance à la sécheresse (Choi, Rodriguez et al. 2002, Agarwal, Agarwal et al. 2006). La famille des « *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION* » (*PDHI*, *erd15*) est une autre famille importante. Ces gènes sont définis comme rapidement activés par le stress hydrique. Les protéines codées présentent une grande diversité structurelle et fonctionnelle, avec une classe particulière de protéines agissant comme connecteurs des voies de réponse au stress (Alves, Fontes et al. 2011).

L'expression de certaines déshydrines (DHN3) et de certains gènes abondants de l'embryogenèse tardive (ou late embryogenesis abundant genes, *LEA-14-A*) ont également été observés sous stress hydrique (Zhao, Ren et al. 2007). Bien que l'effet des déshydrines ne soit pas totalement compris, il est supposé qu'elles stabilisent les interactions hydrophobes à grande échelle, telles les structures membranaires ou des plaques hydrophobes de protéines, en s'y liant de manière non-spécifique (Borovskii, Stupnikova et al. 2002). Il a aussi été observé qu'elles peuvent lier des ions métalliques, l'ADN, les phospholipides et qu'elles peuvent directement capter des radicaux libres pour limiter les effets de stress abiotiques (Liu, Song et al. 2017). Les protéines de choc thermique de faible poids moléculaire (sHSP) jouent également un rôle dans l'amélioration de la capacité des plantes à faire face à des stress abiotiques (Wahid, Gelani et al. 2007, Hussain, Khan et al. 2016, Hussain, Yin et al. 2016). Elles facilitent le repliement natif des protéines et jouent un rôle important en empêchant l'agrégation irréversible des protéines dénaturées (Sarkar, Kim et al. 2009). Les enzymes antioxydantes (SOD, CAT1) sont

particulièrement importantes puisqu'elles interagissent et dégradent directement les ROS et diminuent l'intensité du stress oxydatif initié par la sécheresse. Elles font partie de la réponse antioxydante enzymatique et sont surexprimées en condition de stress hydrique (Hasanuzzaman, Hakeem et al. 2019).

1.3 Les PGPR

Les études récentes commencent tout juste à dresser le rôle des communautés microbiennes lors de la lutte contre le stress hydrique. Ces dernières influencent non seulement la plante, mais les communautés bactériennes elles-mêmes en induisant la formation de biofilms (Khan et Bano 2019), d'osmoprotectants (Vurukonda, Vardharajula et al. 2016) et des changements morphologiques au niveau racinaire et aériens (Francisco, Ma et al. 2019). Dans l'ensemble, la sécheresse a un impact sur l'hétérogénéité du sol, limite la mobilité et l'accès aux nutriments, et augmente l'oxygène du sol, produisant souvent une diminution substantielle de la biomasse microbienne (Naylor et Coleman-Derr 2018, Jansson et Hofmockel 2020). Parmi les Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), les espèces du genre *Bacillus* sont considérées comme des PGPR importants, produisant une vaste gamme de métabolites secondaires biologiquement actifs qui peuvent potentiellement inhiber la croissance des agents pathogènes des plantes et des micro-organismes rhizosphériques délétères en plus d'améliorer la croissance des plantes en condition normales ou de sécheresse (Ongena et Jacques 2008).

1.3.1 *Bacillus velezensis*

Bacillus velezensis est une bactérie aérobique, Gram-positif, formant des endospores qui favorise la croissance des plantes (Rabbee, Ali et al. 2019). De nombreuses souches de cette espèce ont été signalées comme inhibant la croissance des agents pathogènes microbiens, y compris les bactéries, les champignons et les nématodes, en plus de produire des biofilms, des sidérophores, des composés organiques volatiles et de stimuler la résistance systémique induite (Rabbee, Ali et al. 2019).

1.3.2 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium est une bactérie sporulant en forme de bâtonnet, Gram positif, principalement aérobique et présente dans des habitats très divers (Vos, Garrity et al. 2011). Elle est reconnue pour faiblement fixer l'azote atmosphérique (N₂), comme agent de biocontrôle, pour sa capacité à produire un large éventail d'enzyme en grande quantité et pour sa production de molécules surfactantes appartenant à la famille des surfactines (Vary, Biedendieck et al. 2007, Vos, Garrity et al. 2011).

1.3.3 *Bacillus paralicheniformis*

Bacillus paralicheniformis est une espèce de *Bacillus* anaérobique facultatif et motile à Gram positif (Du, Ma et al. 2019). Elle est reconnue pour sa production d'enzymes très variées et d'antibiotiques, permettant un biocontrôle autour des racines (Rey, Ramaiya et al. 2004).

1.3.4 Consortium bactérien

Un consortium bactérien est défini comme étant un groupe d'au moins deux bactéries (ou microorganismes) vivant en symbiose et travaillant ensemble permettant des effets plus prononcés que si elles étaient seules (Madigan, Brender et al. 2019). Un consortium peut apporter une multitude d'effets bénéfiques pour la plante, allant de changements de l'activité phytohormonale au biocontrôle et à la réduction des effets de stress abiotique, comme le stress hydrique (Ongena et Jacques 2008, Kaushal et Wani 2016). L'écosystème de la rhizosphère est un très bon exemple de consortium naturel. Cependant, il est maintenant possible d'isoler spécifiquement des PGPR et de les combiner pour former un nouveau consortium. Le Era Boost Pro est un consortium bactérien composé de 5 souches de *Bacillus* (deux souches de *Bacillus velezensis*, deux souches de *Bacillus megaterium* et une de *Bacillus paralicheniformis*) qui est commercialisé par Ulysse Biotech. Plusieurs études de cas en champs ou chambre de croissance chez Ulysse ont permis de montrer que le consortium a un effet bénéfique sur

la croissance et les rendements de la laitue, du chou, des fraises, des pommes de terre, du maïs et des tomates en serre.

1.4 Mécanismes d'action des PGPR

Les PGPR peuvent être retrouvées dans la rhizosphère, dans les racines (aussi nommées endophytes), à la surface des sols et sur les différents tissus végétaux (Martins, Soares et al. 2015). Elles peuvent induire la production de composé antimicrobiens, de phytohormones et de sidérophores, ce qui permet de modifier la réponse immunitaire de la plante pour une croissance optimale (Kim, Glick et al. 2012). Le processus par lequel ces bactéries induisent une tolérance au stress hydrique est nommé Rhizobacterial-induced drought endurance and resilience (RIDER) et il implique 7 mécanismes : (1) des changements dans l'activité phytohormonale; (2) production d'aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACCd) pour réduire le niveau d'éthylène dans les racines; (3) accumulation d'osmolytes qui confèrent aux plantes une tolérance à la sécheresse; (4) production d'exopolysaccharides bactériens (EPS); (5) production de composés organiques volatils microbiens (mVOC); (6) défense antioxydante (Porcel, Zamarreño et al. 2014, Kumar et Verma 2018) et (7) induction de gènes sensibles au stress par PGPR (Poudel, Mendes et al. 2021).

1.4.1 Changements dans l'activité phytohormonale

Les PGPR sont reconnus pour manipuler les taux d'hormones de croissance végétales comme les cytokines (Liu, Xing et al. 2013), l'ABA (Egamberdieva, Wirth et al. 2017), l'IAA (Indole-3-acétique acide) (Jochum, McWilliams et al. 2019, Namwongsa, Jogloy et al. 2019) et réduire la production d'éthylène (Namwongsa, Jogloy et al. 2019). Les auxines améliorent la tolérance au stress en augmentant la croissance des poils racinaires, des racines elles-mêmes et en les modifiant (Cassán, Vanderleyden et al. 2014) d'une manière permettant une meilleure absorption de l'eau et des nutriments présents dans le sol (Egamberdieva, Wirth et al. 2017). L'IAA est connue pour déclencher des voies de signalisation dépendantes de la sécheresse lors de l'exposition au stress hydrique

(Poudel, Mendes et al. 2021). De plus, l'application d'un consortium de *Rhizobium leguminosarum* (LR-30), *Mesorhizobium ciceri* (CR-30 and CR-39) et *Rhizobium phaseoli* (MR-2) sur du blé a amélioré la croissance, la biomasse et l'indice de tolérance à la sécheresse de cette culture (Hussain, Zahir et al. 2014).

1.4.2 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACCD)

L'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACCD) est le produit de PGPR le plus étudié (Danish, Zafar-ul-Hye et al. 2020). Avec des ressources en eau limitées, les plantes augmentent leur production d'éthylène, ce qui inhibe leur croissance en réduisant la taille des racines et des tiges (Liu, Xing et al. 2013). Ce stress stimule aussi la production d'un précurseur d'éthylène, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), ce qui augmente l'accumulation d'éthylène dans les plantes stressées (Gamalero et Glick 2015). Une production d'ACCD produite par la souche PGPR *Achromobacter piechaudii* ARV8 confère une tolérance contre le déficit hydrique dans la tomate et les poivrons se traduisant par une augmentation significative des poids humides et secs (Mayak, Tirosh et al. 2004). De plus, une augmentation des transcrits liés à la division et à la prolifération cellulaires, une régulation négative des gènes liés au stress (Hontzeas, Saleh et al. 2004), une régulation à la hausse des gènes sensibles à l'auxine et une régulation à la baisse des gènes du métabolisme de l'éthylène ont été observés suite à l'action de PGPR producteur d'ACCD en conditions de stress hydrique (Wang, Ohara et al. 2005).

1.4.3 Accumulation d'osmolytes

Une autre réponse des plantes est l'augmentation de la production de molécules et d'ions ayant des propriétés osmoprotectrices, tels que les sucres solubles, les bêtaïnes, les acides organiques, des acides aminés, le calcium, le potassium et le chlore (Huang, DaCosta et al. 2014). La proline, un osmolyte libéré par les PGRP dans la région racinaire, est un des plus importants et l'augmentation de sa production sous un stress hydrique résulte en une stabilisation des structures subcellulaires, un ajustement osmotique et la

capture des radicaux libres (Ngumbi et Kloepper 2016). Des niveaux de prolines de trois à quatre fois plus élevés ont été observés dans les feuilles de concombre (Wang, Yang et al. 2012) et dans les pois chiches (Sharma, Khanna et al. 2013) traités par un mélange de PGPR, dont des *Bacillus*.

L'accumulation d'autres molécules due à la présence de PGPR, telles que la choline et le glycine bêtaïne, résulte aussi en une tolérance accrue au stress hydrique (Gou, Tian et al. 2015). Bien que la glycine bêtaïne ne capte directement les ROS, sa synthèse produit du H₂O₂ qui active les enzymes captant les ROS et atténue ainsi le stress oxydatif. Une accumulation rapide de glycine bêtaïne dans *Oryza* inoculée avec *Pseudomonas pseudoalcaligenes* a été observée, conférant une tolérance accrue au stress hydrique (Jha, Subramanian et al. 2011). Le tréhalose, un disaccharide non réducteur, est un osmoprotectant très puissant produit par les PGPR sous des conditions de sécheresse extrêmes. Il stabilise les enzymes et les membranes déshydratées (Yang, Kloepper et al. 2009), en plus d'agir comme molécule signal. Cette fonction se fait par l'expression à la hausse du gène de la trehalose-6-phosphate synthase et cela permet la protection de l'intégrité des membranes cellulaires (Vílchez, García-Fontana et al. 2016).

1.4.4 Production d'exopolysaccharides bactériens (EPS)

Les PGPR sont reconnus pour produire des biofilms bactériens hydrophiles autour des racines. Ces derniers fonctionnent comme une couche de protection additionnelle protégeant les racines de la dessiccation et modifiant la structure du sol et ses propriétés d'agrégation (Rolli, Marasco et al. 2015). Ils sont principalement composés d'exopolysaccharides (EPS), molécules en matrice de polymère avec 97 % d'eau (Bhaskar et Bhosle 2005), et sont relâchés dans le sol sous forme de matériaux capsulaires ou visqueux et agissent comme des capsules protectrices autour des agrégats du sol en raison de la formation de ponts cationiques, de liaisons hydrogène, des forces de Van der Waals et des mécanismes d'adsorption d'anions. Ils améliorent la rétention d'eau de manière significative (pouvant aller de plus de 70 g d'eau par gramme d'EPS) et régulent la diffusion du carbone organique (Chandra, Wunnava et al. 2021). La production d'EPS par

des cellules bactériennes stressées se fait par la production de guanine cyclases, menant à la production de Di-GMP cyclique et de protéines adhérentes impliquées dans la formation de biofilms (Borlee, Goldman et al. 2010).

1.4.5 Induction de gènes sensibles au stress par PGPR

Il a été montré que les profils d'expression des gènes *DREB2B*, *P5CS*, *PIP* et *TIP* sont modifiés par suite d'un traitement de PGPR (Vaishnav et Choudhary 2019). Deux gènes de réponse à la dessiccation (*RD29A/RD29B*), un gène participant au métabolisme de la proline (*PDHI*), un participant à la stabilisation des membranes (*sHSP 17.8*), des gènes d'enzymes antioxydantes (*SOD*, *CAT1*) et un gène de réponse rapide (*erd15*) ont tous été identifiés comme régulés à la hausse par suite d'un traitement de PGPR (Sarma et Saikia 2014, Sukweenadhi, Kim et al. 2015, Ghosh, Sen et al. 2017, Vaishnav et Choudhary 2019, Liu, Li et al. 2021). Un effet sur les déshydrines (*DHN3*, *LEA-14-A*) et sur la méthylation de l'ADN (*MET1B*) ont aussi été notés (Gagne-Bourque, Mayer et al. 2015).

1.5 Les aquaporines

La plupart des membranes biologiques présentent un degré élevé de perméabilité à l'eau malgré leurs caractéristiques fondamentalement hydrophobes. Cependant, en conditions physiologiques, seulement une petite fraction de l'eau et des solutés entre les cellules par diffusion (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018). Pour compenser cela, il existe les aquaporines, qui sont des canaux protéiques spécialisés dans le transport de l'eau de part et d'autre des membranes, tout en empêchant certains ions d'y pénétrer. De plus, le transport se fait également via des protéines associées à d'autres fonctions, comme des uniporteurs ou des cotransporteurs (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018).

Les aquaporines sont des protéines très hydrophobes constituées de 250 à 300 acides aminés et de taille variant entre 26 et 35 kiloDalton (kDa) (Quigley, Rosenberg et al.

2001). À ce jour, plus de 500 aquaporines, divisées en quatre familles (PIP, TIP, SIP et NIP) ont été identifiées dans le règne végétal (Quigley, Rosenberg et al. 2001). Elles ont pour fonctions d'absorber, de conserver ou d'excréter l'eau et jouent un rôle majeur dans le contrôle et le maintien de l'hydratation des organismes vivants (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018). Elles sont totalement étanches aux protons, ce qui permet aux cellules de conserver leur potentiel électrochimique, et sont contrôlées de manière hormonale (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018).

Leur structure consiste en 6 hélices alpha s'insérant dans la bicouche lipidique membranaire (Quigley, Rosenberg et al. 2001). Ces hélices sont reliées entre elles par des boucles d'acides aminés et forment une structure fonctionnelle composée de quatre monomères. Chaque sous-unité du tétramère peut former un canal permettant le passage de l'eau; ils sont donc indépendants. Les extrémités C et N terminales des aquaporines sont localisés dans le cytosol (Quigley, Rosenberg et al. 2001). Les aquaporines possèdent un motif de trois acides aminés extrêmement conservés qui est au cœur du transport de l'eau (Quigley, Rosenberg et al. 2001). Ce dernier est le motif asparagine-proline-alanine, ou NPA, et il est situé sur les boucles de connexion des hélices II et V (Quigley, Rosenberg et al. 2001). Le pore est formé par ses deux boucles contenant les domaines NPA (Figure 1.12).

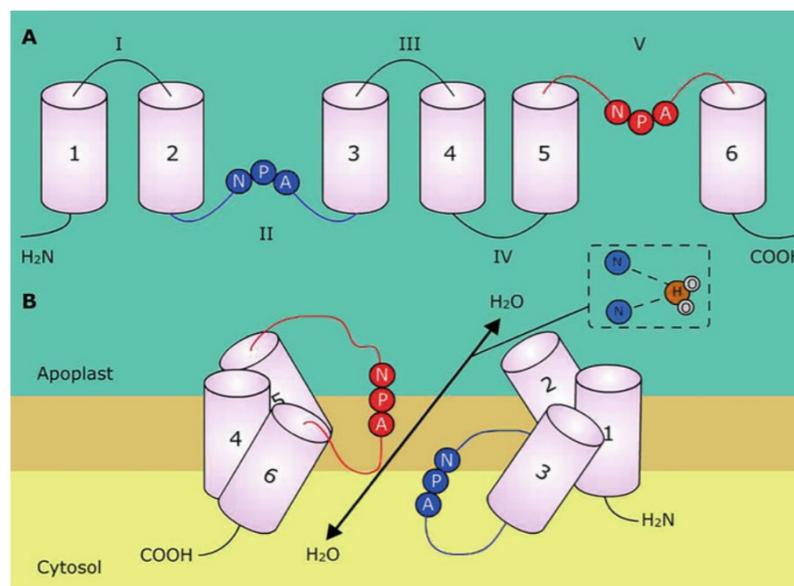


Figure 1.12 Représentation de la structure et du fonctionnement d'une aquaporine.

Lorsqu'un monomère est fonctionnel, les boucles hydrophiles se reconfigurent de sorte que les deux motifs NPA se font face à travers la membrane pour former un canal sélectif aux molécules d'eau (Quigley, Rosenberg et al. 2001). En fait, l'interaction de ces deux boucles forme une septième hélice créant un étranglement de 0,3 nm de diamètre dans le canal sélectif à l'eau. Des analyses par cristallographie à rayon X montrent que les aquaporines possèdent deux entrées coniques, qui, avec un angle d'ouverture bien choisi, permettraient une large augmentation de la vitesse de transport de l'eau (Quigley, Rosenberg et al. 2001).

La régulation du transport de l'eau par ces protéines n'est pas encore bien comprise, mais il est supposé que les liaisons hydrogène des groupes latéraux aminés des deux résidus Asn faisant face à la lumière du canal en sont responsable (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018). La sélectivité du canal se fait en partie par sa taille (3 Å), qui est très près de celle d'une molécule d'eau (2.8 Å). À mesure qu'une molécule d'eau approche le canal, son atome d'oxygène s'oriente vers les deux résidus Asn créant un champ électrostatique positif (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018). En conséquence, les molécules d'eau rompent leurs liaisons hydrogène entre elles et forment à la place des liaisons hydrogène avec les portions amine des résidus Asn. Cela permet la production d'une chaîne de liaisons hydrogène, permettant un transport rapide de l'eau (Figure 1.13). La vitesse de transport se situe généralement autour de $1 \cdot 10^9$ molécules d'eau par seconde (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018).

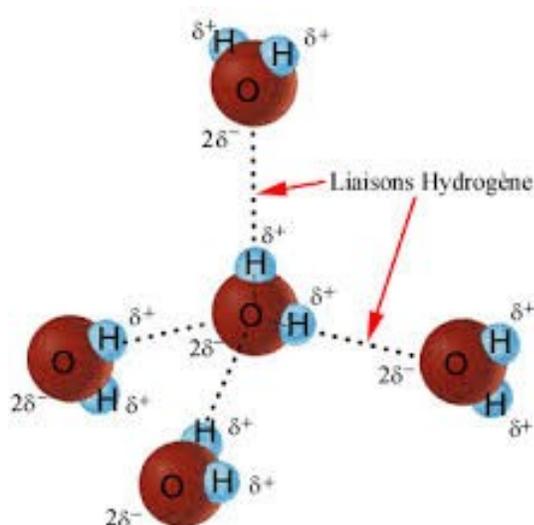


Figure 1.13 Représentation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau en phase liquide.

L'expression des gènes de l'aquaporine dans les plantes n'est pas constante, elle dépend d'une variété de facteurs environnementaux, comme la disponibilité de l'eau et des nutriments, le stress ionique, le stress hydrique, l'anoxie et la qualité/intensité de la lumière (Quigley, Rosenberg et al. 2001, Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018). Le pH cytosolique modifie également le mouvement de l'eau à travers les aquaporines. En conditions d'anoxie, le pH cytosolique devient très acide et mène à une grande réduction de la vitesse du transport de l'eau (Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018). Les aquaporines sont largement soumises aux modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et la méthylation des extrémités C et N terminales. La phosphorylation des aquaporines au niveau des résidus de sérine conduit également à la fermeture des canaux, ce qui en fait un point de régulation (Quigley, Rosenberg et al. 2001, Taiz, Zeiger et al. 2015, Bhatla et Lal 2018).

1.6 La laitue

La laitue *Lactuca sativa* est un légume de grande culture très important. Sur le plan nutritionnel, elle est faible parmi les autres cultures maraîchères; composée à 95 % d'eau avec des quantités variables de phosphore, de fer, de sodium et de potassium, selon le

cultivar. Les feuilles ont des niveaux plus élevés d'acide ascorbique, de vitamine A et de calcium (Martínez-Sánchez, Tudela et al. 2011). C'est une plante extrêmement sensible à la sécheresse en raison de son système racinaire peu profond (Kizil, Genc et al. 2012). D'ailleurs, cette caractéristique fait qu'elle est souvent utilisée comme modèle lors d'études impliquant le stress hydrique (Porcel, Azcón et al. 2005, Porcel, Aroca et al. 2006).

1.7 Le but du projet de recherche

Bien qu'il existe des programmes de développement de cultivars présentant une tolérance à la carence hydrique, les récents changements climatiques observés ont entraîné des sécheresses sans précédent auxquelles même les plantes les mieux adaptées à résister à ces stress ont grandement souffert. Ces changements se produisent à une vitesse telle que les plantes ne disposent pas du bagage génétique nécessaire pour résister (Diffenbaugh, Swain et al. 2015, Jiménez-Muñoz, Mattar et al. 2016). Ulysse Biotech est une jeune entreprise se spécialisant dans la formulation de consortium de PGPR. Un de leur produit, le Era Boost Pro (consortium de 5 *Bacillus*), semble permettre aux plantes de mieux résister à la sécheresse lors d'essais en conditions contrôlées et en champs. Des données préliminaires obtenues à partir de la lentille d'eau semblent indiquer que ce consortium module l'expression du transcriptome végétale et induit les phénomènes menant à la turgescence, à l'expression de facteurs de transcription affectant les stomates et induit l'expression de gènes de réponse à la sécheresse. Les gènes mentionnés précédemment sont tous des gènes ciblés par ce projet et sont tous présentés à l'annexe A « Tableau A4 ». Ainsi, le but de cette étude est d'asseoir sur des bases scientifiques les affirmations d'Ulysse quant à l'augmentation de la résistance à la sécheresse en répondant à la question suivante : comment le consortium agit-il sur différents gènes pour conférer une tolérance accrue au stress hydrique à un cultivar très sensible à ce stress? Ce dernier est la laitue (*Lactuca sativa*, cultivar Boston), car il s'agit d'une espèce particulièrement sensible à la sécheresse qui est souvent utilisée comme modèle dans les études de sécheresse (Porcel, Azcón et al. 2005, Porcel, Aroca et al. 2006). Pour ce faire, une expérience de stress hydrique divisée en quatre conditions a été réalisée sur la laitue

en chambre de croissance. Des échantillons de feuilles seront prélevés à trois différents points d'échantillonnage et leurs ARNs seront extraits, complétés par des mesures agronomiques. Une rétrotranscription (RT) sera réalisée, puis une analyse de PCR quantitative (qPCR) sera utilisée. Les gènes de références sont tirés de Borowski, Galli et al., 2014). La normalisation des résultats se fera selon la méthode décrite dans Taylor, Nadeau et al, 2019) tandis que l'analyse statistique sera le test de Student au seuil $p \leq 0,05$.

1.8 Objectifs et hypothèses

Les hypothèses sont que le consortium bactérien Era Boost Pro a un effet positif sur divers paramètres agronomiques (masse humide et conductance stomatique) de la laitue en conditions normales et de stress hydrique, et qu'il a un effet significatif sur l'expression des gènes de réponse au stress hydrique de la laitue. Les objectifs de ce projet sont : réaliser l'expérience de stress hydrique en maintenant un stress constant, mesurer les différents paramètres agronomiques, réaliser les extractions d'ARN, la RT et détecter la présence des ADNc des gènes à l'étude et déterminer l'impact du consortium bactérien sur les gènes de la laitue étudiés en conditions normales et de sécheresse.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Réalisation de l'expérience de sécheresse

Des graines de laitues (*Lactuca sativa*, cultivar Boston, obtenu de NORSECO, Montréal, QC, Canada) ont été plantées dans des rondelles Jiffys à raison de 3 à 5 graines par rondelle. Six bacs avec dôme contenant 100 rondelles chacun ont été préparés et de l'eau a été ajoutée jusqu'à la saturation des rondelles. Après 10 jours, les plantules excédentaires ont été retirées pour obtenir une seule plantule par rondelle puis la moitié des bacs ont été mis en contact avec 1 L d'Era Boost Pro à une concentration de 0,25 mL/L pendant 24 h, puis le liquide a été retiré. Au jour 14, 320 rondelles ont été transplantées dans des pots de 5 L contenant le terreau Lambert LM-HP à raison de deux rondelles par pot pour un total de 160 pots. L'humidité du sol été maintenu à un niveau optimal (entre 5 et 20 kPa) grâce aux mesures des tensiomètres IRROMETER LT (Dubois Agrinovation) et d'un arrosage manuel. L'expérience a été réalisée dans une chambre de croissance dans une disposition des pots randomisés consistant en quatre conditions (Traité T, non traité-non stressé PT, traité-stressé TS et non traité-stressé PTS) avec cinq réplicats biologiques par condition. Après 35 jours (T0), le stress hydrique a été appliqué en retirant complètement l'irrigation pour les deux conditions stressées, et ce, jusqu'à la fin de l'expérience (49 jours). L'humidité du sol pour les conditions non stressées a été maintenue à un niveau optimal comme mentionné ci-haut. L'expérience a été divisée en trois points d'échantillonnages (T0 à T2) à raison d'un échantillonnage par semaine. Des photos des laitues, ainsi que d'autres mesures, telle la température de la pièce (thermomètre mural), la conductance stomatique (SC-1 Leaf porometer), l'intensité lumineuse (Lcd. Mextech LX-101 Digital Lux Meter) et la masse humide des laitues à la récolte ont été prises à chaque point d'échantillonnage. Ces mesures ont été prises en suivant les instructions du fabricant fournies avec les appareils. Les échantillons de feuilles ont été récoltés sur les cinq réplicats biologiques de chaque condition à l'aide d'un

poinçon à raison de cinq poinçons par feuille (environ 100 mg) et immédiatement congelés à l'aide d'un bain (mélange d'alcool absolu et de glace sèche), puis entreposés à -80 °C jusqu'à l'extraction d'ARN.

2.2 Extraction d'ARN total et synthèse du cDNA

L'ARN total de trois réplicats biologiques par condition a été extrait à l'aide du Total Plant RNA Mini Kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) en suivant les instructions du fournisseur avec les modifications suivantes : les tissus ont été broyés pendant 30 secondes à l'aide du Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden, Allemagne), le tampon RB est utilisé à l'étape 1 et la digestion à la Dnase I est réalisée directement dans la colonne à l'étape 2. La concentration et la qualité de l'ARN ont été évaluées à l'aide des ratios A260/A280 et A260/A230 obtenus à partir du NanoPhotometer® N60/N50 (IMPLEN, Westlake Village, CA, États-Unis), puis l'intégrité de l'ARN a été évaluée par gel d'agarose 1 %. Tous les ARN ont été rétro-transcrit en utilisant le kit Sensifast cDNA synthesis (Meridian Bioscience, Memphis, Tennessee, USA) en suivant les instructions du fournisseur avec la méthode des oligo-dT. Un microlitre de chaque échantillon a été prélevé puis mélangé pour générer un pool d'ADNc servant à l'optimisation des conditions de qRT-PCR.

2.3 Conception des amorces et conditions de qRT-PCR

Trois gènes de référence (*APT1*, *TIP41* et *EIF4A1*) ayant été décrit comme étant stable en condition de stress hydrique (Borowski, Galli et al. 2014) ainsi que 14 gènes potentiellement impliqués dans la réponse face au stress hydrique (*SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)*, *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A-RELATED (DREB2B)*, *DEHYDRIN (DHN3)*, *DESICCATION-RELATED PROTEIN LEA14-RELATED (LEA-14-A)*, *CYTOSINE-SPECIFIC METHYLTRANSFERASE (MET1B)*, *AQUAPORIN TRANSPORTER (PIP)*, *AQUAPORIN TIP1-1 (TIP)*, *PEROXYGENASE (RD29A/RD29B)*, *PROLINE DEHYDROGENASE (PDH1)*, *PYRROLINE-5-CARBOXYLATE DEHYDROGENASE (P5CDH)*, *SMALL HEAT-SHOCK PROTEIN HSP20 FAMILY (sHSP)*,

PROTEIN EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (ERD1), *CATALASE PEROXIDASE (CAT1)* et *AQUAPORIN TRANSPORTER // AQUAPORIN TIP2-1 (TIP2;1)*. Certaines publications indiquent une modification de l'expression de ces gènes par les PGPR (Gagne-Bourque, Mayer et al. 2015, Poudel, Mendes et al. 2021).

Les séquences des transcrits des 14 gènes évalués ont été identifiées sur Phytozome à l'aide du logiciel BLASTn contre le génome de la laitue le plus récent à ce jour (*Lactuca sativa* V8) en utilisant les homologues d'*Arabidopsis* comme requête. Les amorces spécifiques (Tableau A.1) ont été conçues à l'aide séquences des transcrits des 14 gènes et du logiciel Primer3 (v. 0.4.0) pour les gènes *SOD*, *DHN3*, *PIP*, *LEA-14-A*, *PDHI*, *P5CDH*, *sHSP*, *ERD15* et *APT1* en utilisant les spécifications suivantes : Primer size : 20, primer TM : 60, product size range : 100-250, et de PrimerQuest Tool (IDT) pour les gènes *DREB2B*, *MET1B*, *RD29A/RD29B*, *TIP41*, *TIP*, *TIP2;1*, *CAT1* et *EIF4A1* en utilisant les spécifications suivantes : TM opt : 62 °C, GC% opt : 50 %, 3'GC clamp nt : 2, amplicon size opt : 200 bp. La région 3' des transcrits a été favorisée pour la conception de toutes amorces.

Des réactions PCR suivies de gels d'agarose 2 % ont été réalisés sur le pool d'ADNc avec toutes les paires d'amorces afin de détecter la présence des gènes étudiés et l'absence de dimères. L'amplification des ADNcs a été réalisée à une concentration de 100 ng/uL dans un volume final de 20 uL contenant 4 µL d'ADNc, 10 µL de SensiFAST SYBR® No-ROX Mix (Meridian Bioscience) et 400 nmol de chaque amorce. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur T100 (Bio-Rad) dans les conditions suivantes : 95 °C pendant 2 minutes suivi de 40 cycles de 5s à 95 °C, 10 secondes à 60-75 °C et 10 s à 72 °C. La spécificité des amplicons a été validée pour la présence de dimères d'amorces ou d'amplicons non spécifiques par la présence d'un seul pic dans la courbe de fusion et d'une seule bande avec la taille attendue dans le gel d'agarose 2 %. L'analyse de la courbe de fusion variait de 60 à 95 °C avec 0,5 °C d'augmentation progressive de la température sur 5 secondes. Les contrôles sans RT ont été inclus pour s'assurer qu'aucune contamination par le réactif ou l'ADN génomique ne s'est produite.

2.4 Analyses statistiques

Les données d'expression relatives ont été calculées selon la méthode décrite par (Taylor, Nadeau et al. 2019) et sont présentées en « fold changes » (Livak et Schmittgen 2001). Les échantillons provenant de plantes non stressées et non traitées (PT) ont été utilisés comme échantillons de référence. Un test de Student ($p \leq 0,05$) a été effectué à l'aide du logiciel Graphpad afin de déterminer si les résultats sont significatifs. Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Paramètres agronomiques

3.1.1 Taille des laitues

La première figure permet d'observer l'impact du traitement sur la taille des laitues. L'état d'humidité du sol est présenté en annexe « Figure A1 ». Il est possible d'observer que les laitues de la condition traitée non stressée sont beaucoup plus grosses que toutes les autres conditions. Les laitues traitées et stressées sont légèrement plus petites alors que les laitues non traitées et stressées sont les plus petites et les plus mal en point (Figure 3.1).

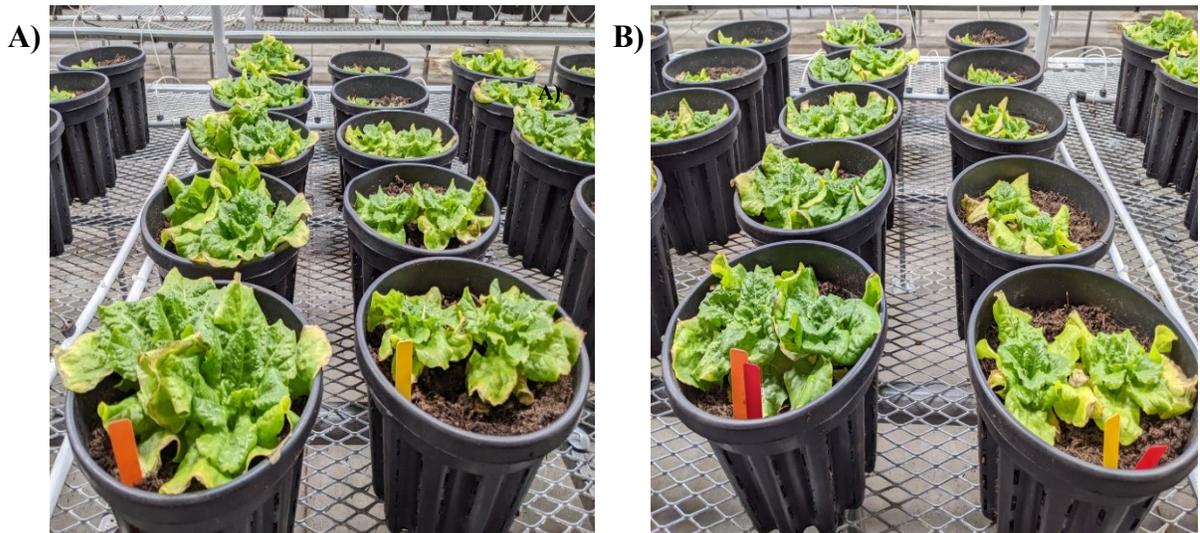


Figure 3.1 Illustration faites sous différentes conditions au T2.

A) La colonne de gauche correspond à la condition traitée T et la colonne de droite correspond à la condition non traitée- non stressée PT (contrôle).
B) La colonne de gauche correspond à la condition traitée et stressée TS et la colonne de droite correspond à la condition non traitée-stressée PTS.

3.1.2 Masse humide

La mesure des paramètres agronomiques (masse humide, conductance stomatique et taille des laitues) a permis d'observer si le produit a un effet au niveau morphologique dans les diverses conditions. Selon les observations prises à chaque sept jours pendant trois semaines, le produit semble augmenter de manière significative la masse humide des plants de laitues en conditions traitée et traité-stressée, et ce, à tous les points d'échantillonnages (Figure 3.2). Il est aussi possible d'observer une tendance à la hausse pour la condition traitée, ce qui semble montrer un effet positif du produit sur la croissance se traduisant par une masse humide plus élevée (Tableau A.2). Pour la condition traitée et stressée, il est possible de voir que la masse au T1 est presque aussi élevée que celle de la condition traitée non stressée. Cependant, elle ne montre que d'un seul gramme au T2 versus six grammes pour la condition traitée et non stressés, ce qui semble montrer que l'application du produit en condition stressée limite les effets négatifs du stress hydrique (Figure 3.2).

Pour ce qui est de la condition non traitée et stressée, il est possible de voir que la masse est plus élevée au T1 que la condition contrôle. Il est à noter que, le stress hydrique au T1 n'était pas particulièrement intense comparé au T2.

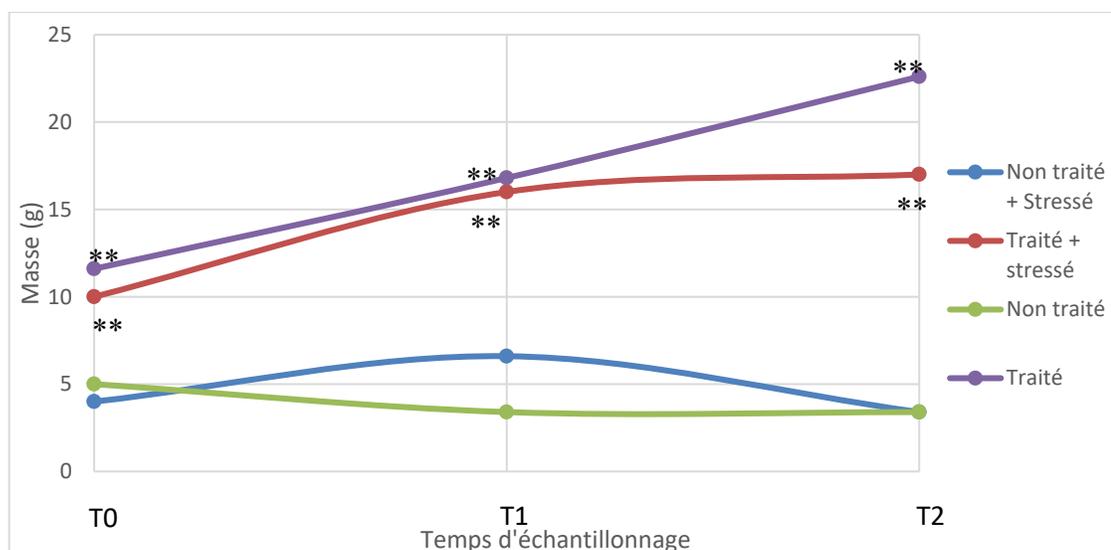


Figure 3.2 Évolution de la masse humide moyenne dans le temps. Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

3.1.3 Conductance stomatique

Des résultats similaires ont été obtenus en ce qui concerne la conductance stomatique (Tableau A.3). Cette dernière correspond à la quantité de CO₂ entrant ou de vapeur d'eau sortant par les stomates et permet d'obtenir un indice sur l'ouverture des stomates. Étant donné que la fermeture stomatique est une des premières réponses face au stress hydrique, ce paramètre peut fournir des informations concernant les échanges gazeux et l'état de la photosynthèse puisqu'elle dépend de l'apport en CO₂. Dans le cas présent, l'appareil utilisé mesure la quantité de vapeur d'eau sortant par les stomates, donc les résultats sont exprimés en mmol d'eau par mètre carré/seconde. Encore une fois, les résultats pour les conditions traitée et traitée-stressé sont beaucoup plus élevés comparé à la condition contrôle, ce qui semble indiquer que le produit affecte positivement l'ouverture des stomates (Figure 3.3). Cependant, ces résultats sont significatifs seulement à partir du T1, ce qui montre que l'effet n'est pas immédiat. Les conductances stomatiques les plus élevées ont été observées dans la condition traitée et stressée, montrant un effet accru du produit sur l'ouverture stomatique en condition stressée.

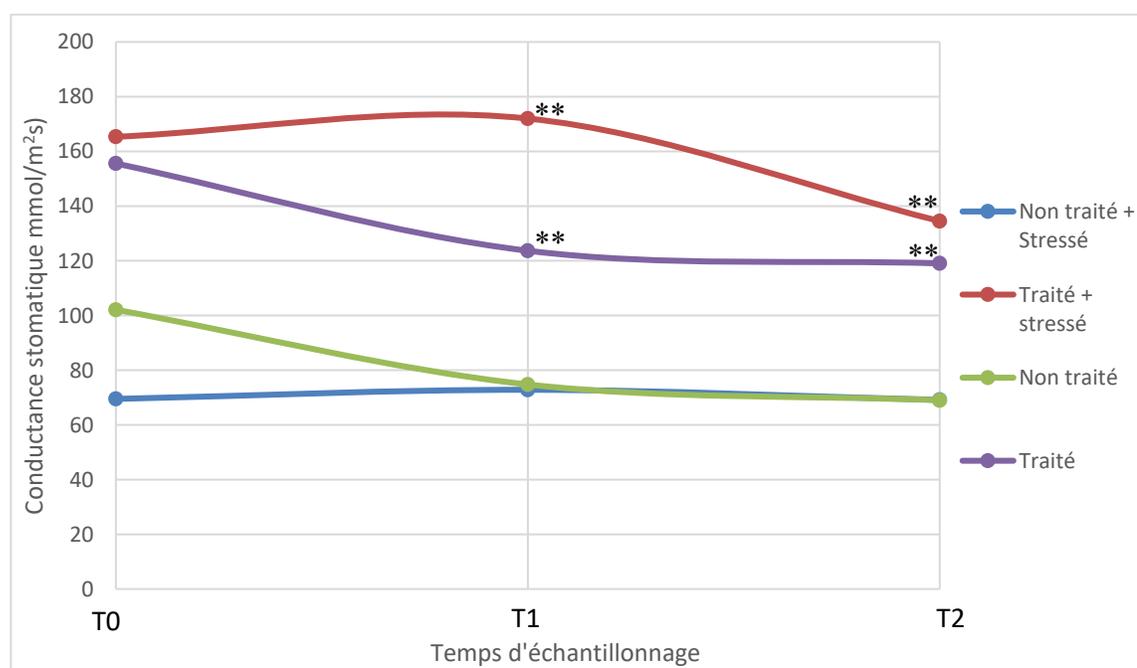


Figure 3.3 Évolution de la conductance stomatique dans le temps.
Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

3.2 Modification de l'expression des gènes de la laitue

Après avoir optimisé les conditions de PCR pour chaque amorce il été possible d'effectuer les analyses de qRT-PCR afin de déterminer le niveau d'expression de ces gènes dans les différentes conditions. Les résultats sont présentés sous forme de graphique à courbe. Les deux étoiles signifient des résultats significatifs à $p \leq 0,05$. La figure 3.4 présente les résultats de la condition traitée seulement. Il est possible d'observer qu'il n'y a aucune différence significative pour les gènes *SOD*, *DHN3* et *CAT1*, ce qui semble montrer qu'en conditions normales, l'application du consortium n'a aucun effet sur le niveau d'expression de ces gènes. Cependant, il est possible d'observer un niveau d'expression très à la hausse pour le gène *PIP*. Ce niveau se situe à près de 7,5 fois plus élevées que la normale et est significatif à 0,05, ce qui signifie que cette augmentation du niveau d'expression est attribuée à l'application du consortium.

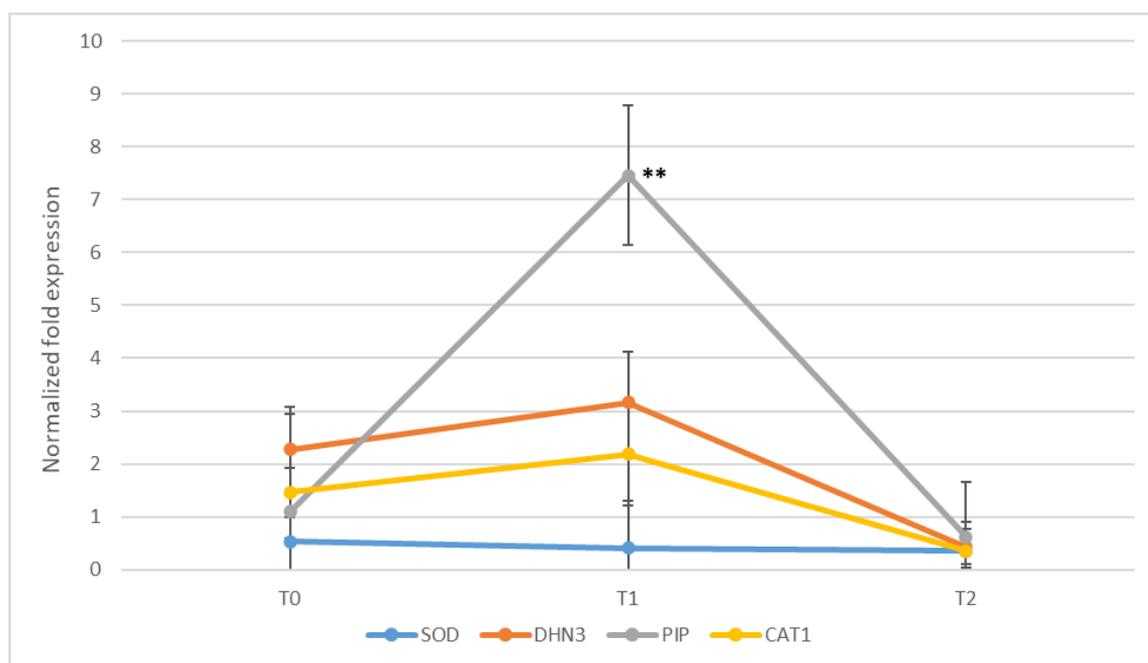


Figure 3.4 Évaluation du niveau d'expression des gènes *SOD*, *DHN3*, *PIP* et *CAT1* chez les laitues traitées.

Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

Des résultats très similaires sont obtenus pour les laitues en conditions traitées et stressées (Figure 3.5). En effet, il n'y a pas de différence significative pour *SOD*, *DHN3*

et *CAT1*. Encore une fois, le gène de *PIP* est fortement exprimé au T1, mais ici plus de 14 fois comparé à d'environ 7,5 fois pour les laitues seulement traitées. De plus, le résultat est significatif à 0,05, ce qui signifie que l'application du consortium affecte très fortement à la hausse l'expression du gène de l'aquaporine *PIP* en conditions stressées.

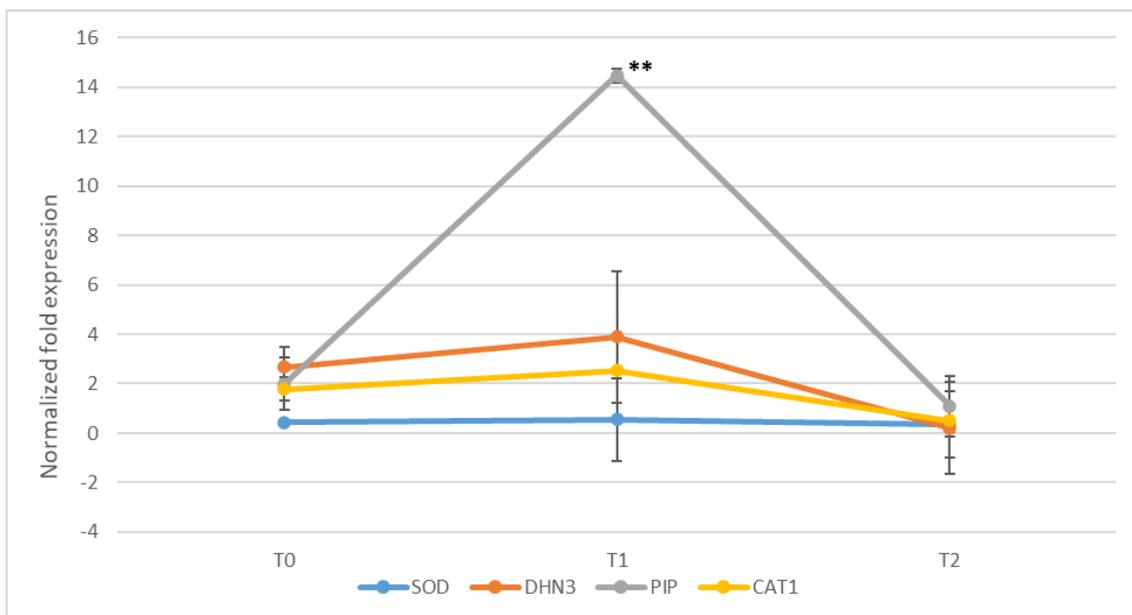


Figure 3.5 Évaluation du niveau d'expression des gènes *SOD*, *DHN3*, *PIP* et *CAT1* chez les laitues traitées et stressées.

Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

Pour ce qui est de la condition non traitée et stressée, aucun des gènes n'a été dérégulé de façon significative. Nous en concluons que le stress hydrique n'affecte pas de manière significative l'expression de ces gènes à aucun des points d'échantillonnage utilisés (Figure 3.6).

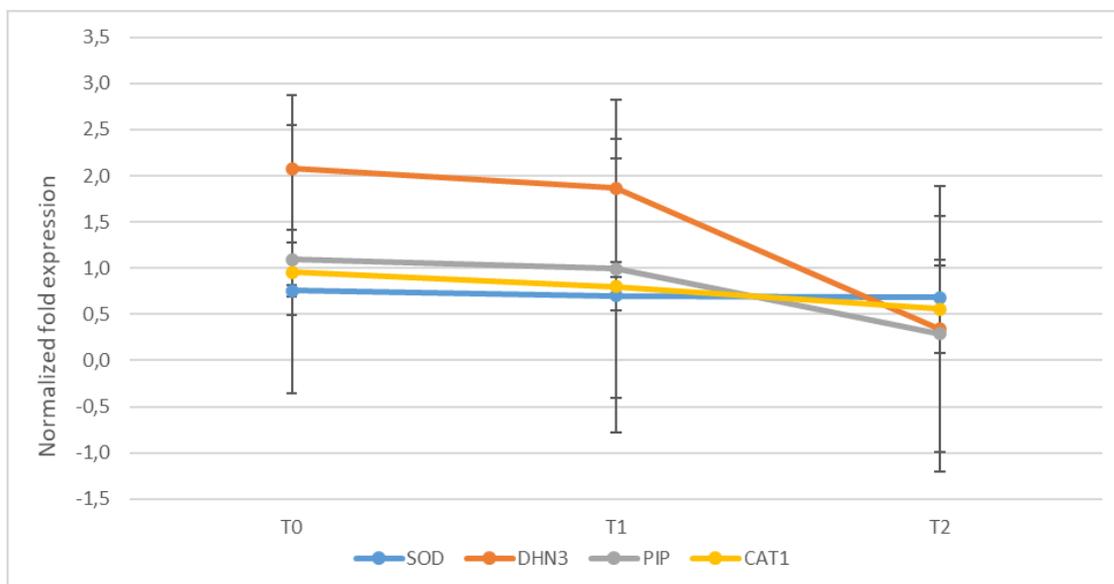


Figure 3.6 Évaluation du niveau d'expression des gènes *SOD*, *DHN3*, *PIP* et *CAT1* chez les laitues non traitées et stressées.

Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

Somme toute, les analyses de qRT-PCR ont permis d'observer que le gène de l'aquaporine *PIP* est fortement régulé à la hausse en condition stressée seulement et traitée/stressée, ce qui est très intéressant. Cela a mené au questionnement suivant : est-ce que le consortium affecte l'expression d'autres aquaporines?

3.3 Modification de l'expression d'autres gènes d'aquaporines

Les résultats de qRT-PCR de deux nouvelles aquaporines (*TIP* et *TIP2;1*) et ceux de *PIP* sont présentées ensemble. Ce choix semblait intéressant pour voir s'il y avait différentes tendances pour différentes aquaporines. La figure 3.7 présente les niveaux d'expressions des trois aquaporines chez les laitues traitées seulement. En observant *PIP* et *TIP* ensemble, il est possible de voir qu'ils n'ont pas la même cinétique d'activation. *PIP* est fortement régulé à la hausse de manière significative, mais seulement au T1, tandis que *TIP* est déjà régulé à la hausse au T0, demeure stable au T1 et remonte au T2. La dérégulation de *TIP* est aussi plus forte que celle de *PIP*, soit un peu plus de 10 fois pour *TIP* comparé à environ 7,5 fois pour *PIP*. L'expression de *TIP2;1* monte faiblement, mais de manière constante et significative tout au long de l'expérience. Cela semble

montrer que les aquaporines *TIP* et *TIP2;1* réagissent à long terme tandis que l'aquaporine *PIP* réagit fortement, mais à court terme. Ces résultats montrent aussi un lien direct entre la présence du consortium dans le sol et le niveau d'expression de ces gènes en conditions traitées puisque les résultats sont significatifs.

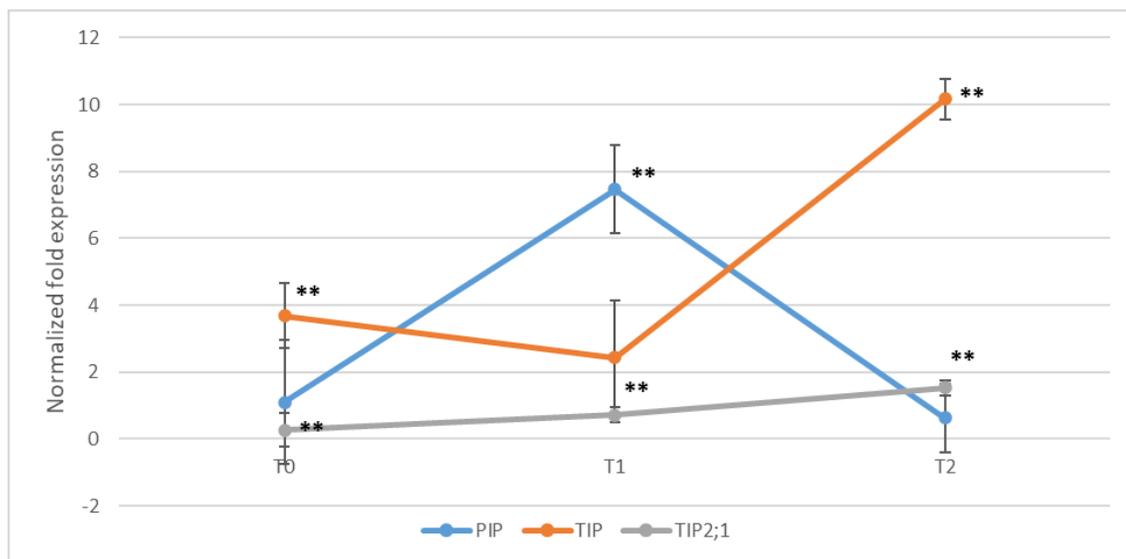


Figure 3.7 Évaluation du niveau d'expression des d'aquaporines *PIP*, *TIP* et *TIP2;1* chez les laitues traitées.

Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

Des résultats un peu différents ont été obtenus pour la condition traitée et stressée (Figure 3.8). Comme mentionné plus tôt, *PIP* est fortement régulé à la hausse au T1 et rechute rapidement au T2. Quant à *TIP*, l'expression au T0 est très similaire à celle de la condition traitée seulement. Cependant, l'expression subit une forte hausse au T1 et une très faible baisse au T2, ce qui montre un comportement différent de l'expression du gène de cette aquaporine s'il y a présence d'un stress hydrique. En présence du stress hydrique, l'expression augmente rapidement et reste relativement stable. De plus, les résultats sont significatifs à tous les points d'échantillonnage.

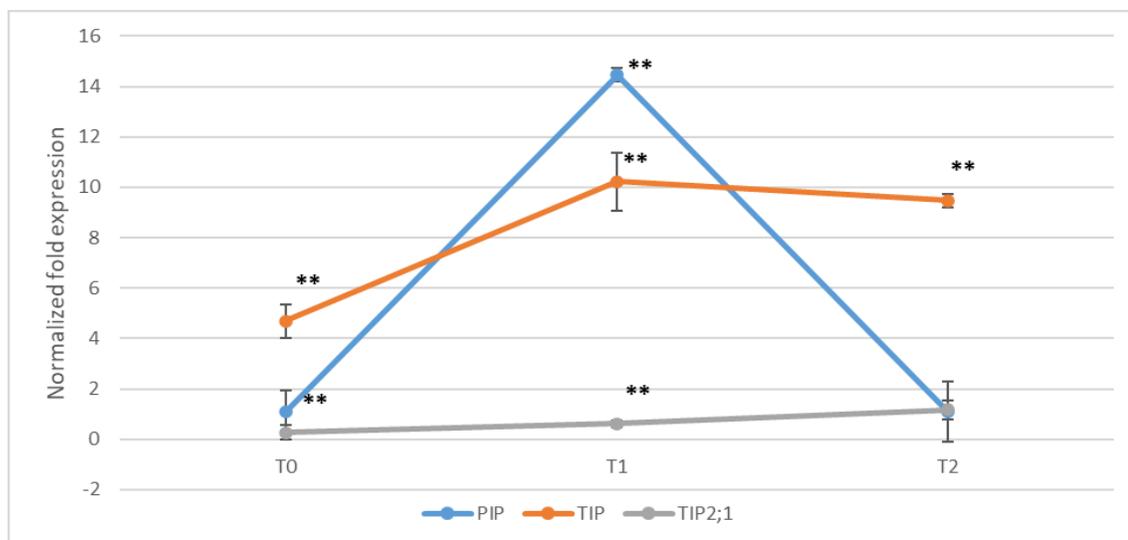


Figure 3.8 Évaluation du niveau d'expression des d'aquaporines *PIP*, *TIP* et *TIP2;1* chez les laitues traitées et stressées.

Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

Pour ce qui est de la condition non traitée et stressée, aucun des gènes n'a été dérégulé de façon significative (Figure 3.9).

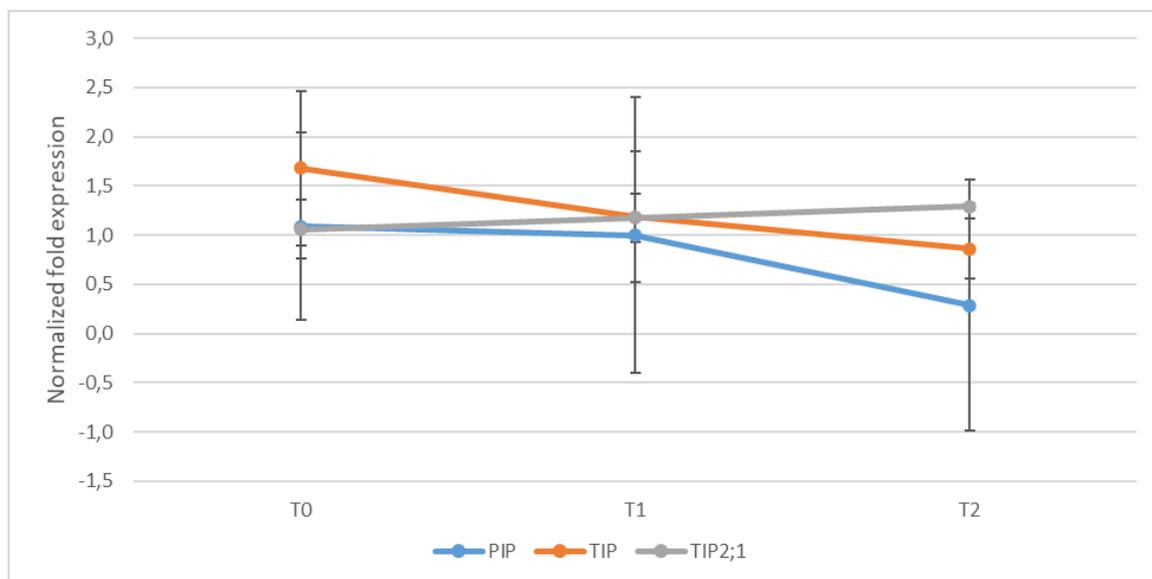


Figure 3.9 Évaluation du niveau d'expression des d'aquaporines *PIP*, *TIP* et *TIP2;1* chez les laitues non traitées et stressées.

Les résultats significatifs à $p \leq 0,05$ sont illustrés par « ** ».

Les analyses de qRT-PCR ont permis d'observer que les gènes d'aquaporines *PIP* et *TIP* sont fortement régulés à la hausse en condition stressé seulement et traitée/stressée, ce qui est très intéressant. *PIP* semble avoir une forte réponse rapidement et chuter tandis que *TIP* semble avoir une réponse progressivement de plus en plus forte. La troisième aquaporine *TIP2;1* a une tendance à la hausse comme *TIP*, mais de manière beaucoup plus faible. Ces résultats permettent aussi d'illustrer un lien clair entre l'application du consortium bactérien et le niveau d'expression des gènes d'aquaporines, et ce, autant en conditions normales qu'en conditions de stress hydrique, où les niveaux d'expression sont plus élevés.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Paramètres agronomiques

4.1.1 Masse humide

L'analyse des masses humides des laitues sous différentes conditions a été concluante. En effet, les résultats obtenus montrent que l'application du consortium produit des laitues plus grosses et plus en santé que lorsque ces dernières ne sont pas traitées. En fait, les laitues traitées sont déjà plus du double que les laitues non traitées au T0, et cette différence ne fait qu'augmenter avec le temps. Cela montre un lien clair entre l'application du traitement et la taille des laitues. D'ailleurs, ce cultivar vient s'ajouter au portfolio déjà très diversifié d'Ulysse Biotech, qui utilise entre autres la masse humide comme paramètre permettant d'évaluer si leurs produits (incluant le Era Boost Pro) ont des effets bénéfiques sur la croissance des plantes. La masse humide est un paramètre simple qui permet de communiquer rapidement des informations concernant l'effet d'un produit ou d'une condition sur une plante. Elle est utilisée depuis plusieurs années dans différents types d'études allant de l'analyse des effets de différents fertilisants organiques (Fatahi, Mobasser et al. 2014) à des études de stress hydrique (Chegah, Chehrazi et al. 2013). De plus, les PGPR sont connus depuis longtemps pour avoir des effets bénéfiques sur la croissance et donc, sur la masse humide. Par exemple, des plants de *Sorghum bicolor* inoculés avec les PGPR *Bacillus cereus* TCR17, *Providencia rettgeri* TCR21 et *Myroides odoratimimus* TCR22 ont eu une augmentation de la production d'IAA, résultant en la production de métabolites bénéficiaux pour la plante et donc une meilleure croissance (Bruno, Karthik et al. 2020).

Des résultats similaires sont obtenus pour les laitues traitées et soumises à un stress hydrique. Encore une fois, elles sont plus de deux fois plus grosses que les laitues contrôles

au T1. En fait, elles sont 0,8 g plus légères que les laitues traitées seulement, ce qui montre que l'application du produit sous un faible stress hydrique ne fait pas que simplement limiter les effets néfastes liés au stress hydrique, il induit une croissance accrue des laitues. Cependant, cette tendance semble disparaître avec l'augmentation du stress hydrique puisque le poids des laitues traitées et stressées au T2 a faiblement augmenté en comparaison au T1. Il est possible qu'après une certaine intensité, les effets du consortium ne soient plus capables de promouvoir la croissance, mais qu'ils sont tout de même capables de contrer les effets néfastes liés au stress hydrique et maintenir les laitues à une condition et un poids constant. De plus, il est possible qu'un sol trop sec inhibe les effets ou carrément la croissance d'une ou plusieurs souches du consortium. Ceci pourrait être vérifiée en détectant la présence des bactéries par métabarcoding et permettrait d'observer la persistance du consortium dans le sol sous différentes intensités de stress hydrique. Une autre observation intéressante pourrait être d'observer la taille et la masse des racines. Comme les PGPR sont connus pour engendrer des modifications bénéfiques au niveau morphologie (Francisco, Ma et al. 2019) et que la laitue est une plante extrêmement sensible à la sécheresse en raison de son système racinaire peu profond (Kizil et al. 2012), il pourrait être intéressant de voir si le consortium affecte la croissance racinaire. Un système racinaire plus développé permettrait à la laitue d'aller chercher un maximum d'eau dans le sol et donc de mieux tolérer une carence en eau.

Pour les conditions non traitées et non traité/stressé, il est possible de voir qu'il y a qu'une faible variation entre les différents points d'échantillonnage. Cependant, il était attendu que la condition stressée ici ait une masse humide moyenne plus faible que la condition non traitée, ce qui n'est pas le cas. Cela peut possiblement s'expliquer par le fait que les résultats sont des moyennes et donc un seul plant plus gros que les autres peut avoir un impact majeur sur la valeur finale. De plus, il y avait deux laitues par pots, ce qui pourrait possiblement engendrer une compétition pour l'eau et les nutriments entre les deux laitues.

Somme toute, les résultats de masse humide montrent que l'application du produit en conditions normales à un effet bénéfique sur la croissance se traduisant par une masse

plus grande, tandis qu'en condition traitée et stressée, cela semble ralentir les effets néfastes liés au stress hydrique.

4.1.2 Conductance stomatique

Comme pour la masse humide, les analyses de conductances stomatiques ont été concluantes. En effet, les résultats obtenus montrent que l'application du consortium a un effet positif sur les laitues traitées se traduisant par une conductance stomatique plus élevée (entre 123,7 et 155,6 mmol/m²s) que la condition contrôle (entre 69,0 et 102,1 mmol/m²s). Ceci était attendu puisque plusieurs études ont démontré que des PGPR affectent positivement la conductance stomatique (Liu, Xing et al. 2013, ARIKAN et PIRLAK 2020). (Han et Lee 2005) ont même montré ses effets spécifiquement chez la laitue, ce qui concorde avec nos résultats. Des résultats similaires ont été obtenus pour les laitues traitées et stressées ou les conductances stomatiques les plus élevées ont été observées (169,5, 172,0 et 134,5 mmol/m²s). Pareillement, les effets des PGPR sur la conductance stomatique ont déjà été montrés dans la littérature (Bashir et Naz 2020), ce qui concorde avec nos résultats. En comparant la condition traitée à la condition traitée/stressée, il est possible de voir que les conductances sont plus élevées en conditions de stress. L'ouverture stomatique étant affectée par des métabolites produits par les PGPR, il est possible que ces derniers soient produits en plus grande quantité sous condition de stress hydrique, expliquant l'impact plus prononcé qui est observé.

Somme toute, les résultats de conductance stomatique montrent que l'application du produit en conditions normales a un effet bénéfique sur la croissance se traduisant par une conductance élevée, tandis qu'en condition traitée et stressée, cela semble ralentir les effets néfastes liés au stress hydrique se traduisant par une conductance stomatique encore plus élevée.

4.2 Modification de l'expression de gènes d'aquaporines

Parmi tous les gènes testés, seuls les gènes d'aquaporines ont été affectés significativement par l'application du consortium. À aucun moment et dans aucune condition les gènes de *SOD*, *DHN3* et *CAT1* n'ont été dérégulés de manière significative. Ces résultats ont été surprenants, car ces gènes avaient été *a priori* sélectionnés, car ils avaient déjà été observés comme étant affectés par les PGPR et importants lors d'une réponse face au stress hydrique. Une cause possible est le fait que dans la majorité des études, seuls un ou rarement deux PGPR sont étudiés ensemble, en plus du fait que les plantes utilisées varient grandement. Un PGPR seul n'aura pas le même effet qu'en consortium, ceci est à la base même de ce concept. L'âge des plants et le niveau d'intensité du stress hydrique peuvent aussi avoir un impact sur l'expression de ces gènes. Il est possible que le stress ait été trop faible ou trop fort pour permettre une dérégulation significative de ces gènes. La durée de l'expérience est un autre facteur à considérer. Comme il n'y a eu que trois échantillonnages, il est possible que la fenêtre où l'expressions de ces gènes aurait pu être significative ait été manquée.

Les aquaporines sont des protéines déjà connues pour intervenir dans la réponse face au stress hydrique, notamment en régulant la conductivité hydraulique des membranes menant à une perméabilité accrue (Hussain, Hussain et al. 2019). Cependant, l'interaction des PGPR avec le niveau d'expression des gènes d'aquaporines est un sujet peu étudié en condition de stress hydrique, où la majorité des études focussent sur le stress salin. Ici, deux familles d'aquaporines ont été régulées à la hausse, soit *PIP* et *TIP*. Dans le cas de la condition traitée, *PIP* est régulé à la hausse. Ceci concorde avec des résultats similaires obtenus par (Wang, Wang et al. 2018) où une inoculation de *Bacillus megaterium* a produit une augmentation du taux d'expression de deux *PIP*. Pour ce qui est de la condition traitée et stressée, la réponse est encore plus élevée. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude sur le maïs stressé et traité avec *Bacillus megaterium* où le niveau d'expression de *PIP* était à la hausse dans les feuilles (Marulanda, Azcón et al. 2010). Ceci est intéressant, car dans la littérature, la conductance hydraulique et le niveau d'expression des aquaporines des racines sont plus souvent mentionnés. Une conductance hydraulique élevée dans les racines permet un meilleur

apport en eau tandis qu'une conductance élevée dans les feuilles permet une meilleure distribution de l'eau et donc un meilleur ajustement osmotique. Au final, ces résultats montrent un lien entre l'application du consortium, la présence d'un stress hydrique et le niveau d'expression de *PIP*, en plus de concorder avec la littérature en ce qui concerne des conditions non stressées.

Dans le cas des deux aquaporines *TIP* et *TIP2;1* il est possible de voir qu'elles sont régulées à la hausse dans les deux cas où il y a eu traitement et plus particulièrement dans la condition traitée et stressée. *TIP* est l'aquaporine la plus fortement exprimée sur une longue période. Malheureusement, il n'y a pas de littérature qui discute des liens entre les interactions PGPR et *TIPs* en condition de stress abiotique. Cependant, les aquaporines de cette famille sont indispensables pour la croissance des plantes sous stress environnementaux (Wang, Wang et al. 2018), ce qui pourrait possiblement expliquer la raison de sa forte expression par suite du traitement au Era Boost Pro. Encore une fois, ces résultats montrent un lien entre l'application du consortium, la présence d'un stress hydrique et le niveau d'expression de gènes d'aquaporines. L'expression semble toujours plus forte en conditions traitées et stressées.

4.3 Améliorations

À la suite de la réalisation de ce projet, plusieurs améliorations seraient à apporter. La prochaine section énumère brièvement quelques considérations qui devraient être prises en compte lors d'une prochaine étude de *Lactuca sativa* traitée par le consortium de PGPR Era Boost Pro et soumises à un stress hydrique.

4.3.1 Conditions expérimentales

Plusieurs considérations importantes ont été notées lors de la réalisation de ce projet, plus particulièrement en ce qui concerne les conditions expérimentales.

Premièrement, l'expérience de stress hydrique a été réalisée pendant la période des fêtes, ce qui a contribué à un suivi moins serré du temps de croissance des plantes. Cela a mené à réaliser l'expérience avec des plants plus âgés que prévu, ce qui aurait pu avoir un impact sur les résultats. Lors d'une prochaine expérience, il pourrait être pertinent de procéder dans un moment où il n'y a pas de congé afin d'assurer un suivi plus serré de l'expérience.

Deuxièmement, il y avait deux plants de laitue par pots lors de l'expérience. La raison étant que si une des deux était inutilisable, il aurait été possible d'utiliser la seconde. Cependant, cela peut mener à une compétition pour l'eau et les nutriments, et une mauvaise distribution du consortium, ce qui pourrait causer des stress affectant négativement les résultats obtenus. Une solution serait d'utiliser plus de pots que prévus mais limiter le tout à une seule laitue par pot.

Troisièmement, l'irrigation a été réalisée à la main à l'aide d'un bécher et d'une chaudière d'eau. Cela a été fait ainsi, car le système d'irrigation automatique n'était pas fonctionnel lors de la réalisation de ce projet. Il consiste en un système de pompe et de tuyaux menant à un petit embout noir planté dans le sol des pots. Celui-ci est conçu pour humidifier le sol par l'intérieur au lieu de la surface, ce qui permet une meilleure distribution de l'eau, des nutriments et dans le cas des conditions traitées, du consortium bactérien. De plus, comme l'eau est appliquée lentement sur une période définie, cela limite les pertes d'eau par ruissèlement due à une surface de sol trop sec ou une trop grande quantité d'eau d'un coup. Bref, l'utilisation de ce système d'irrigation pourrait être un grand atout en ce qui concerne la reproductibilité de l'expérience.

Finalement, deux nouvelles informations, une concernant la laitue et une concernant le produit, ont récemment été amenées par une collègue de travail. À la suite de tests avec la laitue, il a été observé que de meilleurs résultats étaient obtenus avec une concentration d'application du Era Boost Pro de 0,1 mL/L au lieu de 0,25 mL/L. Pour ce qui est du produit, de meilleurs effets ont été obtenus lorsque ce dernier était directement appliqué dans le terreau lors de la préparation du sol (avant la mise en pots) que lorsqu'il est

appliqué à la main à l'aide d'un bécher ou du système d'irrigation. Encore une fois, l'utilisation de ces deux informations pourrait être importante en ce qui concerne la reproductibilité de l'expérience.

4.3.2 Gènes de références

Lors de l'étape d'optimisation des amorces, plusieurs gènes de références ont été testés, mais un seul a été utilisé pour les analyses de qRT-PCR. Cela est dû à une contrainte de temps où il n'a pas été possible d'avoir des amorces fonctionnelles pour ces gènes. Comme la norme pour les expériences qRT-PCR modernes est d'au moins trois gènes de référence, il serait important d'atteindre ce minimum lors d'une expérience future. Une solution simple serait de sélectionner tout l'arsenal de gènes stables trouvés dans (Borowski, Galli et al. 2014) et de tenter d'en détecter au moins trois parmi les plus stables.

4.4 Perspectives

Deux perspectives intéressantes sont en vue pour un projet découlant de celui-ci. Premièrement une expérience de métabarcoding pourrait permettre d'observer la persistance du consortium dans le sol et donc d'observer comment les souches évoluent dans le temps. Cela pourrait donner des indications sur la ou lesquelles ont un plus gros impact pour l'induction d'une résistance au stress hydrique. Cela apporterait aussi des informations en ce qui concerne les populations déjà présentes dans le sol et comment elles interagissent avec le consortium.

Finalement, une étude de transcriptomique permettrait d'observer l'ensemble des gènes affectés et comment ils sont affectés par la présence du consortium en conditions de stress hydrique. Cela pourrait possiblement permettre d'observer des voies ou des mécanismes d'action encore inconnus, ce qui pourrait être très intéressant.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Considérant l'impact grandissant des sécheresses et des effets leur étant liés, plusieurs recherches sont en cours pour comprendre le fonctionnement derrière les mécanismes d'actions des PGPR menant à une tolérance accrue au stress hydrique. Cependant, l'identification de ces derniers dans leur ensemble est un défi majeur que doit surmonter la communauté scientifique. Dans le but de contribuer cet effort tout en apportant une valeur scientifique au produit Era Boost Pro, ce projet de maîtrise a présenté une approche de qRT-PCR qui a permis d'observer un impact majeur sur l'expression de deux familles d'aquaporines de la laitue en conditions de stress hydrique. De plus, des impacts positifs sur la taille, la masse humide et la conductance stomatique ont aussi été observés.

En ce qui concerne les cinq objectifs de départ, il est possible de conclure qu'ils ont tous été atteints. En effet, il a été possible de réaliser l'expérience de stress hydrique en maintenant un stress constant, de mesurer les différents paramètres agronomiques, de réaliser les étapes de biologie moléculaire et de déterminer l'impact du consortium bactérien sur les gènes de la laitue étudiés en conditions normales et de sécheresse. Malgré cela, les aquaporines ne sont qu'une petite partie de la réponse. C'est pourquoi d'autres expériences de stress hydrique avec PGPR devraient être réalisées afin de comprendre l'ensemble de leurs mécanismes d'actions et ainsi permettre des résultats optimaux en ce qui concerne l'augmentation de la tolérance au stress hydrique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal, P. K., et al. (2006). "Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants." Plant cell reports **25**(12): 1263-1274.
- Agurla, S., et al. (2018). Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation, Springer: 215-232.
- Ahmadi, A. et D. Baker (2001). "The effect of water stress on the activities of key regulatory enzymes of the sucrose to starch pathway in wheat." Plant growth regulation **35**(1): 81-91.
- Akram, H., et al. (2013). "Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars." J Anim Plant Sci **23**(5): 1415-1423.
- Al Muhairi, M. A., et al. (2015). "Effect of abscisic acid on biochemical constituents, enzymatic and non enzymatic antioxidant status of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under varied irrigation regimes." Cogent Food & Agriculture **1**(1): 1080888.
- Alghabari, F., et al. (2016). "Gibberellin-sensitive Rht alleles confer tolerance to heat and drought stresses in wheat at booting stage." Journal of Cereal Science **70**: 72-78.
- Alves, M. S., et al. (2011). "Early responsive to dehydration 15, a new transcription factor that integrates stress signaling pathways." Plant signaling & behavior **6**(12): 1993-1996.
- Anjum, F., et al. (2003). "Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents." Pak. J. Agric. Sci **40**(1-2): 45-49.
- Anjum, S. A., et al. (2017). "Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids." Frontiers in plant science **8**: 69.
- Arikan, Ş. et L. Pirlak (2020). "Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on physiological parameters against salinity in apple cultivar "Fuji"." Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi **24**(2): 281-286.

- Bashir, T. et S. Naz (2020). "Plant growth promoting rhizobacteria in combination with plant growth regulators attenuate the effect of drought stress." Pakistan Journal of Botany **52**(3): 783-793.
- Bhaskar, P. et N. B. Bhosle (2005). "Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes." Current Science: 45-53.
- Bhatla, S. C. et M. A. Lal (2018). Plant physiology, development and metabolism, Springer.
- Blum, A. (2005). "Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive?" Australian Journal of Agricultural Research **56**(11): 1159-1168.
- Borlee, B. R., et al. (2010). "Pseudomonas aeruginosa uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix." Molecular microbiology **75**(4): 827-842.
- Borovskii, G. B., et al. (2002). "Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment." BMC plant biology **2**(1): 1-7.
- Borowski, J. M., et al. (2014). "Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses." Planta **239**(6): 1187-1200.
- Bruno, L. B., et al. (2020). "Amelioration of chromium and heat stresses in Sorghum bicolor by Cr6+ reducing-thermotolerant plant growth promoting bacteria." Chemosphere **244**: 125521.
- Cassán, F., et al. (2014). "Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus Azospirillum." Journal of Plant Growth Regulation **33**(2): 440-459.
- Chandra, P., et al. (2021). "Strategies to mitigate the adverse effect of drought stress on crop plants—influences of soil bacteria: A review." Pedosphere **31**(3): 496-509.
- Chegah, S., et al. (2013). "Effects of drought stress on growth and development frankenia plant (Frankenia Leavis)." Bulgarian Journal of Agricultural Science **19**(4): 659-666.
- Choi, D.-W., et al. (2002). "Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location." Plant physiology **129**(4): 1781-1787.

- Danish, S., et al. (2020). "Drought stress alleviation by ACC deaminase producing *Achromobacter xylosoxidans* and *Enterobacter cloacae*, with and without timber waste biochar in maize." *Sustainability* **12**(15): 6286.
- de Campos, M. K. F., et al. (2011). "Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle'citrumelo plants over-accumulating proline." *Environmental and experimental botany* **72**(2): 242-250.
- Denčić, S., et al. (2000). "Evaluation of grain yield and its components in wheat cultivars and landraces under near optimal and drought conditions." *Euphytica* **113**(1): 43-52.
- Desclaux, D. et P. Roumet (1996). "Impact of drought stress on the phenology of two soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars." *Field Crops Research* **46**(1-3): 61-70.
- Dickin, E. et D. Wright (2008). "The effects of winter waterlogging and summer drought on the growth and yield of winter wheat (*Triticum aestivum* L.)." *European journal of agronomy* **28**(3): 234-244.
- Diffenbaugh, N. S., et al. (2015). "Anthropogenic warming has increased drought risk in California." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(13): 3931-3936.
- Dixon, D. P. et R. Edwards (2010). "Glutathione transferases." *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* **8**.
- Du, Y., et al. (2019). "Comparative genomic analysis of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30 with its closely related species reveals an evolutionary relationship between *B. paralicheniformis* and *B. licheniformis*." *BMC genomics* **20**(1): 1-16.
- Egamberdieva, D., et al. (2017). "Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness." *Frontiers in Microbiology* **8**: 2104.
- Estrada-Campuzano, G., et al. (2008). "Genotypic variability and response to water stress of pre-and post-anthesis phases in triticale." *European journal of agronomy* **28**(3): 171-177.
- Fahad, S., et al. (2017). "Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options." *Frontiers in plant science*: 1147.
- Farooq, M., et al. (2009). "Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid." *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**(4): 237-246.

- Farooq, M., et al. (2012). "Drought stress in plants: an overview." Plant responses to drought stress: 1-33.
- Farooq, M., et al. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Sustainable agriculture, Springer: 153-188.
- Fatahi, E., et al. (2014). "Effect of organic fertilizer on wet weight, dry weight and number of leaves in cowpea." Journal of Applied Sciences **3**(4): 440-443.
- Francisco, C. S., et al. (2019). "Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*." Scientific reports **9**(1): 1-18.
- Gagne-Bourque, F., et al. (2015). "Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26." PloS one **10**(6): e0130456.
- Gamalero, E. et B. R. Glick (2015). "Bacterial modulation of plant ethylene levels." Plant physiology **169**(1): 13-22.
- Gest, N., et al. (2012). Modifications of antioxidant enzymes as a tool to improve yield in tomato under water deficit. 2nd International Symposium on Biotechnology of Fruit Species, International Society for Horticultural Science (ISHS).
- Ghosh, D., et al. (2017). "Modulation of proline metabolic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under water-stressed conditions by a drought-mitigating *Pseudomonas putida* strain." Annals of Microbiology **67**(10): 655-668.
- Golldack, D., et al. (2014). "Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks." Frontiers in plant science **5**: 151.
- Gou, W., et al. (2015). "Accumulation of choline and glycinebetaine and drought stress tolerance induced in maize (*Zea mays*) by three plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains." Pak J Bot **47**(2): 581-586.
- Han, H. et K. Lee (2005). "Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity." Res J Agric Biol Sci **1**(3): 210-215.
- Harris, D., et al. (2002). "On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice." Direct seeding: Research Strategies and Opportunities, International Research Institute, Manila, Philippines: 231-240.

- Hasanuzzaman, M., et al. (2019). Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches, Springer.
- Hontzeas, N., et al. (2004). "Changes in gene expression in canola roots induced by ACC-deaminase-containing plant-growth-promoting bacteria." Molecular Plant-Microbe Interactions **17**(8): 865-871.
- Huang, B., et al. (2014). "Research advances in mechanisms of turfgrass tolerance to abiotic stresses: from physiology to molecular biology." Critical Reviews in Plant Sciences **33**(2-3): 141-189.
- Hussain, H. A., et al. (2019). "Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids." Scientific reports **9**(1): 1-12.
- Hussain, M., et al. (2008). "Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower." Journal of Agronomy and Crop Science **194**(3): 193-199.
- Hussain, M. B., et al. (2014). "Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat?" International Journal of Agriculture and Biology **16**(1).
- Hussain, S., et al. (2019). "Drought stress in plants: An overview on implications, tolerance mechanisms and agronomic mitigation strategies." Plant Science Today **6**(4): 389-402.
- Hussain, S., et al. (2016). "Physiological and biochemical mechanisms of seed priming-induced chilling tolerance in rice cultivars." Frontiers in plant science **7**: 116.
- Hussain, S., et al. (2016). "Comparative transcriptional profiling of primed and non-primed rice seedlings under submergence stress." Frontiers in plant science **7**: 1125.
- Jaleel, C. A., et al. (2009). "Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition." Int. J. Agric. Biol **11**(1): 100-105.
- Jansson, J. K. et K. S. Hofmockel (2020). "Soil microbiomes and climate change." Nature Reviews Microbiology **18**(1): 35-46.
- Javot, H., et al. (2003). "Role of a single aquaporin isoform in root water uptake." The plant cell **15**(2): 509-522.

- Javot, H. et C. Maurel (2002). "The role of aquaporins in root water uptake." Annals of Botany **90**(3): 301-313.
- Jha, Y., et al. (2011). "Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress." Acta Physiologiae Plantarum **33**(3): 797-802.
- Jiménez-Muñoz, J. C., et al. (2016). "Record-breaking warming and extreme drought in the Amazon rainforest during the course of El Niño 2015–2016." Scientific reports **6**: 33130.
- Jochum, M. D., et al. (2019). "Bioprospecting plant growth-promoting rhizobacteria that mitigate drought stress in grasses." Frontiers in Microbiology **10**: 2106.
- Jongrunklang, N., et al. (2011). "Rooting traits of peanut genotypes with different yield responses to pre-flowering drought stress." Field Crops Research **120**(2): 262-270.
- Juan, C. A., et al. (2021). "The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies." International journal of molecular sciences **22**(9): 4642.
- Kaur, V., et al. (2008). "Interacting effects of high temperature and drought stresses in wheat genotypes under semiarid tropics-an appraisal." Tropics **17**(3): 225-234.
- Kaushal, M. et S. P. Wani (2016). "Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands." Annals of Microbiology **66**(1): 35-42.
- Kaya, M. D., et al. (2006). "Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.)." European journal of agronomy **24**(4): 291-295.
- Khan, N. et A. Bano (2019). "Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions." PloS one **14**(9): e0222302.
- Kim, Y.-C., et al. (2012). Enhancement of plant drought tolerance by microbes. Plant responses to drought stress, Springer: 383-413.
- Kizil, Ü., et al. (2012). "Lettuce (*Lactuca sativa* L.) yield prediction under water stress using artificial neural network (ANN) model and vegetation indices." Žemdirbystė= Agriculture **99**(4): 409-418.

- Kramer, P. J. et J. S. Boyer (1995). Water relations of plants and soils, Academic press.
- Kumar, A. et J. P. Verma (2018). "Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review?" Microbiological research **207**: 41-52.
- Lei, Y., et al. (2006). "Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*." Physiologia plantarum **127**(2): 182-191.
- Li, Y., et al. (2009). "Climate change and drought: a risk assessment of crop-yield impacts." Climate research **39**(1): 31-46.
- Liu, F., et al. (2013). "Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings." Applied microbiology and biotechnology **97**(20): 9155-9164.
- Liu, L., et al. (2021). "Combined application of arbuscular mycorrhizal fungi and exogenous melatonin alleviates drought stress and improves plant growth in tobacco seedlings." Journal of Plant Growth Regulation **40**(3): 1074-1087.
- Liu, Y., et al. (2017). "Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses." Frontiers in plant science **8**: 1018.
- Livak, K. J. et T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method." methods **25**(4): 402-408.
- Madigan, M., et al. (2019). Brock Biology of Microorganisms.(2019). Edit, Pearson. Southern Illinois University Carbondate. 15ava Edición.
- Majid, S. A., et al. (2007). "Yield stability analysis conferring adaptation of wheat to pre- and post-anthesis drought conditions." Pak. J. Bot **39**(5): 1623-1637.
- Manickavelu, A., et al. (2006). "Drought tolerance in rice: morphological and molecular genetic consideration." Plant growth regulation **50**(2): 121-138.
- Martínez-Sánchez, A., et al. (2011). "Low oxygen levels and light exposure affect quality of fresh-cut Romaine lettuce." Postharvest Biology and Technology **59**(1): 34-42.
- Martins, S., et al. (2015). "Contribution of host and environmental factors to the hyperparasitism of coffee rust under field conditions." Australasian Plant Pathology **44**(6): 605-610.

- Marulanda, A., et al. (2010). "Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions." Planta **232**(2): 533-543.
- Mayak, S., et al. (2004). "Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress." Plant Physiology and Biochemistry **42**(6): 565-572.
- Meidner, H. et D. W. Sheriff (1976). Water and Plants, Wiley.
- Mohammadian, R., et al. (2005). "Effect of early season drought stress on growth characteristics of sugar beet genotypes." Turkish journal of agriculture and forestry **29**(5): 357-368.
- Morot-Gaudry, J.-F. et J. Farineau (2018). La photosynthèse: processus physiques, moléculaires et physiologiques, Quae.
- Nahar, S., et al. (2016). "Morphophysiological and molecular effects of drought stress in rice." Ann Plant Sci **5**(9): 1409-1416.
- Namwongsa, J., et al. (2019). "Endophytic Bacteria Improve Root Traits, Biomass and Yield of *Helianthus tuberosus* L. under Normal and Deficit Water Conditio."
- Naylor, D. et D. Coleman-Derr (2018). "Drought stress and root-associated bacterial communities." Frontiers in plant science **8**: 2223.
- Ngumbi, E. et J. Kloepper (2016). "Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects." Applied Soil Ecology **105**: 109-125.
- Nonami, H. (1998). "Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials." Journal of Plant Research **111**(3): 373-382.
- Ongena, M. et P. Jacques (2008). "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol." Trends in microbiology **16**(3): 115-125.
- Porcel, R., et al. (2006). "PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance." Plant molecular biology **60**(3): 389-404.
- Porcel, R., et al. (2005). "Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants." Journal of experimental botany **56**(417): 1933-1942.

- Porcel, R., et al. (2014). "Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants." BMC plant biology **14**(1): 1-12.
- Poudel, M., et al. (2021). "The role of plant-associated bacteria, fungi, and viruses in drought stress mitigation." Frontiers in Microbiology: 3058.
- Praba, M. L., et al. (2009). "Identification of physiological traits underlying cultivar differences in drought tolerance in rice and wheat." Journal of Agronomy and Crop Science **195**(1): 30-46.
- Pratt, C. et K. Cornely (2019). Biochimie, De Boeck Superieur.
- Quigley, F., et al. (2001). "From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins." Genome biology **3**(1): 1-17.
- Rabbee, M. F., et al. (2019). "*Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes." Molecules **24**(6): 1046.
- Rahdari, P. et S. Hoseini (2012). "Drought stress: a review." International Journal of Agronomy and Plant Production **3**(10): 443-446.
- Rey, M. W., et al. (2004). "Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species." Genome biology **5**(10): 1-12.
- Rizzi, Y. S., et al. (2015). "P5CDH affects the pathways contributing to Pro synthesis after ProDH activation by biotic and abiotic stress conditions." Frontiers in plant science **6**: 572.
- Rolli, E., et al. (2015). "Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait." Environmental microbiology **17**(2): 316-331.
- Rucker, K., et al. (1995). "Identification of peanut genotypes with improved drought avoidance traits." Peanut science **22**(1): 14-18.
- Sacks, M. M., et al. (1997). "Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize." Plant physiology **114**(2): 519-527.
- Sarkar, N. K., et al. (2009). "Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development." BMC genomics **10**(1): 1-18.

- Sarma, R. K. et R. Saikia (2014). "Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21." Plant and soil **377**(1): 111-126.
- Selvakumar, G., et al. (2012). Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops. Bacteria in agrobiology: stress management, Springer: 205-224.
- Sharma, P., et al. (2013). "Efficacy of aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)-deaminase-producing rhizobacteria in ameliorating water stress in chickpea under axenic conditions." Afr. J. Microbiol. Res **7**(50): 5749-5757.
- Sukweenadhi, J., et al. (2015). "*Paenibacillus yonginensis* DCY84T induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought, and salt stress." Microbiological research **172**: 7-15.
- Tahir, M. H. N., et al. (2002). "Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines for drought tolerance." International Journal of Agriculture and Biology **3**: 398-400.
- Taiz, L. et E. Zeiger (2006). "Plant Physiology Sinauer Associates." Inc., Sunderland, MA.
- Taiz, L., et al. (2015). Plant physiology and development, Sinauer Associates Incorporated.
- Taylor, S. C., et al. (2019). "The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time." Trends in biotechnology **37**(7): 761-774.
- Vaishnav, A. et D. K. Choudhary (2019). "Regulation of drought-responsive gene expression in *Glycine max* l. Merrill is mediated through *Pseudomonas simiae* strain AU." Journal of Plant Growth Regulation **38**(1): 333-342.
- Vary, P. S., et al. (2007). "*Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host." Applied microbiology and biotechnology **76**(5): 957-967.
- Vílchez, J. I., et al. (2016). "Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms." Frontiers in Microbiology **7**: 1577.
- Vos, P., et al. (2011). Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes, Springer Science & Business Media.

- Vurukonda, S. S. K. P., et al. (2016). "Multifunctional *Pseudomonas putida* strain FBKV2 from arid rhizosphere soil and its growth promotional effects on maize under drought stress." Rhizosphere **1**: 4-13.
- Wahid, A., et al. (2007). "Heat tolerance in plants: an overview." Environmental and experimental botany **61**(3): 199-223.
- Wang, C.-J., et al. (2012). "Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains." PloS one **7**(12): e52565.
- Wang, H. (2006). "Growth and function of roots under abiotic stress soils." Plant-environment interactions: 271-320.
- Wang, R., et al. (2018). "Exploring the roles of aquaporins in plant–microbe interactions." Cells **7**(12): 267.
- Wang, Y., et al. (2005). "Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*." Molecular Plant-Microbe Interactions **18**(5): 385-396.
- Wery, J., et al. (1994). Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes, Springer: 439-456.
- Wu, Y. et D. J. Cosgrove (2000). "Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins." Journal of experimental botany **51**(350): 1543-1553.
- Xiong, L., et al. (2002). "Cell signaling during cold, drought, and salt stress." The plant cell **14**(suppl 1): S165-S183.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. et K. Shinozaki (2006). "Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses." Annual Review of Plant Biology **57**(1): 781-803.
- Yamauchi, A., et al. (1994). "Root system structure and its relation to stress tolerance." Roots and nitrogen in cropping systems of the semi-arid tropics. Patancheru, Andhra Pradesh, India: 211-233.
- Yang, J., et al. (2009). "Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress." Trends in plant science **14**(1): 1-4.

Zhang, J., et al. (2006). "Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses." Field Crops Research **97**(1): 111-119.

Zhang, M., et al. (2004). Effects of plant growth regulators on water deficit-induced yield loss in soybean. Proceedings of the 4th international crop science congress, Brisbane, Australia.

Zhao, J., et al. (2007). "Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress." Plant cell reports **26**(9): 1521-1528.

ANNEXE A

CONDITIONS DE SÉCHERESSE ÉVALUÉES PAR LES TENSIOMÈTRES

Tableau A.1

Amorces utilisées lors de ce projet

Gène	Nom amorce	Séquence	Longueur produit
SOD	SOD-F	GGTGCTCCAGATGATGAGGT	215
	SOD-R	CTCCACCAGCATTTCAGT	
DREB2B	DREB2B-F	AGGAGAAGATGGTGGTGGTG	179
	DREB2B-R	GAACGAACATGTTTTCCCTGA	
DHN3	DHN3-F	AAAATCCCCGGGTATCACTC	190
	DHN3-R	CCAAAAACCAAAAGCCAAAA	
LEA-14-A	LEA-14-A-F	GCTTGATGAGGGACATTGGT	157
	LEA-14-A-R	GCACCTGCACCCATTAAACT	
MET1B	MET1B-F	CTTGATTGGGAGGGGAATTT	209
	MET1B-R	TATGCCAATGGAGGAGGAAC	
PIP	PIP-F	TGGACCCTTTATTGGAGCTG	159
	PIP-R	CCCACAATTGAATCAAGAACAA	
TIP	TIP-F	GAGACATCGGCACAATAGCA	247
	TIP-R	TACTCAGAAGCGGGAATTGG	
RD29A/RD29B	RD29A/RD29B-F	GACTGAAGGGAATCGAGCAG	157
	RD29A/RD29B-R	GCAGCCCTGTTCATTTTAGC	
PDH1	PDH1-F	TCGACAATTGATGATGAAGGA	175
	PDH1-R	AGGCCTTCTTTCCCAAATA	
P5CDH	P5CDH-F	TGGTGTGGATGTCCTTGAA	165
	P5CDH-R	GCCCAAACCAGTGATTCTGT	
sHSP	sHSP-F	GATCCTTTCCAGGGCTTTTC	165

Gène	Nom amorce	Séquence	Longueur produit
	sHSP-R	AACCTCCACCTTCACCTCCT	
ERD15	ERD15-F	CAGCAGGGTGAAGATGGTTT	227
	ERD15-R	TTGGCTTCTGCTTCCAAACT	
CAT1	CAT1-F	TGTTGGTGCTCTGTCTGACC	158
	CAT1-R	ACCCAAAGGCTTTTTCCAAT	
TIP2;1	TIP2;1-F	GCCATTGGATTCATTGTGG	156
	TIP2;1-R	TAGGCCACCTCCGATAAGTG	
APT1	APT1-F	CTGTACAAGAAGGAGAACGAGC	184
	APT1-R	ACGAGCACATACAGTG GCTT	
TIP41	TIP41-F	GAGAGATTTGCTGGAGGGAACTA	101
	TIP41-R	CCTTTGACTGATGATGTTTGGGA	
EIF4A1	EIF4A1-F	CTTCATAGGATTGGGCGAAG	150
	EIF4A1-F	TATGAGATCCGCAACATTCG	

Tableau A.2

Évolution de la masse humide des plantes dans le temps

Temps	Condition	Masse moyenne (g)	T Test
T0	Non traité	5,0	
	Traité	11,6	0,0112
T1	Non traité + Stressé	6,6	0,09
	Traité + stressé	16,0	0,0001
	Non traité	3,4	
	Traité	16,8	0,0001
T2	Non traité + Stressé	3,4	1
	Traité + stressé	17,0	0,0004
	Non traité	3,4	
	Traité	22,6	0,0001

Tableau A.3

Évolution de la conductance stomatique dans le temps

Temps	Condition	Conductance moyenne (mmol/m²s)	T Test
T0	Non traité	102,1	
	Traité	155,6	0,1092
T1	Non traité + Stressé	72,8	0,8205
	Traité + stressé	172,0	0,0018
	Non traité	74,8	
	Traité	123,7	0,0175
T2	Non traité + Stressé	69,1	0,9837
	Traité + stressé	134,5	0,0024
	Non traité	69,0	
	Traité	119,0	0,0079

Tableau A.4

Liste des gènes sélectionnés pour l'étude

Nom et fonction des gènes étudiés	
SOD	COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1 , catalyzes the disproportionation of superoxide anions into oxygen and peroxide
DREB2B	DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A-RELATED , transcription factor that acts upstream of dehydrins
DHN3	EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 10 , Acute dehydrin, action still unclear but could bind metal ions or lipid vesicles
LEA-14-A	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 14 , Chronic dehydrin, action still unclear but its presence is know to help against abiotic stress
MET1B	METHYLTRANSFERASE 1B , mainly responsible for maintaining CG methylation after DNA replication,
PIP	PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;3 , involved in active water transport
TIP	TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2 , involved in active water transport
RD29A/RD29B	RESPONSIVE TO DESICCATION 20 , encodes a calcium binding protein that has peroxylase activity in oxylipin metabolism
PDH1	PROLINE DEHYDROGENASE 1 , induced by drought stress, involved in mitochondrial proline metabolism
P5CDH	DELTA-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE DEHYDROGENASE , involved in the catabolism of proline to lysinate to avoid proline toxicity
sHSP 17.4	SMALL HEAT SHOCK PROTEIN 17.4 , induced by drought stress
erd15	EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 , Codes a hydrophilic protein lacking Cys residues that is induced by drought stress
CAT1	CATALASE 1 , Catalyzes the reduction of hydrogen peroxide using the heme group as a cofactor. Protects cells from H ₂ O ₂ toxicity.
TIP2;1	DELTA TONOPLAST INTEGRAL PROTEIN 2;1 , functions as a water channel and an ammonium (NH ₄ ⁺) transporter.
SIP2;1	SMALL AND BASIC INTRINSIC PROTEIN 2 , One of the Major Intrinsic Proteins which facilitate the passive transport of small molecules across membranes.
PIP2;3	PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;3 , member of the plasma membrane intrinsic protein PIP2. Functions as aquaporin and is involved in desiccation.
TIP1;1	TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 1;1 . Encodes a tonoplast intrinsic protein, which functions as water channel.
APT1	Adenosine phosphoribosyl transferase , involved in the one-step salvage of adenine to AMP.
TIP41	TOR signaling pathway protein ; response to high temperature treatment.
EIF4A1	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4A1 , acts as an RNA helicase

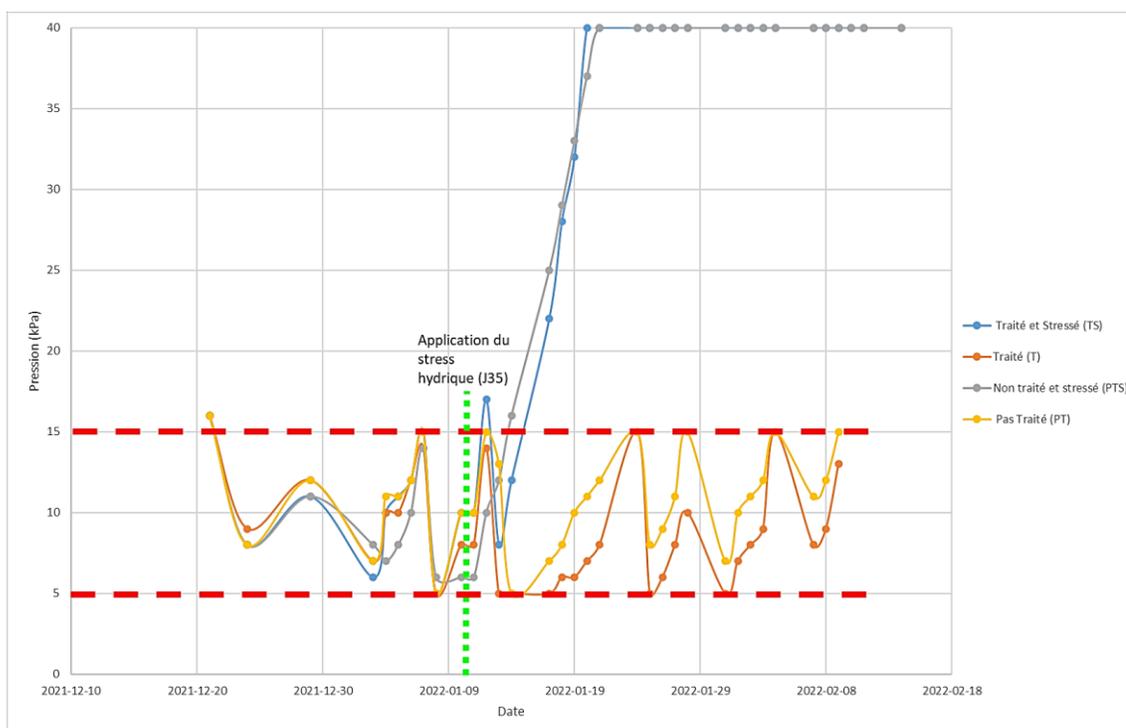


Figure A1 Évolution de l'humidité du sol dans le temps pendant la durée complète de l'expérience.