

Effets des lipopeptides de Bacillus sur les réactions de défense immunitaire de Triticum aestivum.

Auteur : Blaise, Florence

Promoteur(s) : Deleu, Magali

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/24237>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



EFFETS DES LIPOPEPTIDES DE *BACILLUS* SUR LES RÉACTIONS DE DÉFENSE IMMUNITAIRE DE *TRITICUM AESTIVUM*

FLORENCE BLAISE

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2024-2025

PROMOTRICE : MAGALI DELEU

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par la promotrice membre du personnel enseignant de GxABT.



EFFETS DES LIPOPEPTIDES DE *BACILLUS* SUR LES RÉACTIONS DE DÉFENSE IMMUNITAIRE DE *TRITICUM AESTIVUM*

FLORENCE BLAISE

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2024-2025

PROMOTRICE : MAGALI DELEU

Remerciements

Ce travail de fin d'étude a été réalisé au TERRA (teaching and research center), au sein du laboratoire LBMI (laboratoire de biophysique moléculaire aux interfaces).

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma promotrice, Magali Deleu, sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible. Je tiens à la remercier pour son engagement et son soutien tout au long de ces sept mois. Je tiens également à remercier Anaïs Claeys pour son partage de connaissances, sa bonne humeur, sa patience, sa disponibilité et son soutien précieux tout au long de ce projet. Je ne peux pas oublier toutes les personnes du bureau : Thomas, Jean-Rock, Amélie, Léa et Catherine, sans qui ces mois auraient été bien moins agréables, et que je remercie également pour leur soutien. Un grand merci à Thomas Tasiaux qui a été une aide indispensable pour la réalisation des expériences, mais aussi un véritable soutien moral. Je quitte toutes ces personnes avec un pincement au cœur.

Je tiens à remercier Sacha Radelet qui a suivi de près l'évolution de ce projet et qui a su me remotiver et me soutenir. Merci à Emeline Elens qui a été aussi très présente et a apporté une contribution précieuse à ce travail, en étant la voix de la sagesse grâce à son expérience dans un domaine similaire à mon TFE. Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai partagé ces années à Gembloux, notamment Sacha, Emeline, Julie, Salomé, Elliott, et Enza. Un grand merci à mes parents et à mon frère pour leur soutien durant toutes ces années d'étude. Finalement, je tiens à remercier Lucas, qui a été un soutien au quotidien.

Résumé

Les méthodes actuelles de lutte contre les pathogènes du blé (*Triticum aestivum*) reposent principalement sur l'utilisation intensive de pesticides de synthèse, dont les effets négatifs sur l'environnement et la santé humaine sont de plus en plus mis en évidence. Afin de limiter ces impacts, des alternatives biologiques peuvent être utilisées. Des agents de biocontrôle tels que les lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* apparaissent prometteurs. Ce travail évalue l'effet de trois familles de lipopeptides (surfactines, fengycines, mycosubtilines) sur les réactions de défense immunitaire du blé, une monocotylédone d'importance agronomique. Les résultats montrent que la mycosubtiline sous forme monomérique induit une production d'espèces réactives de l'oxygène apoplastiques (ROS_{apo}) dans les racines sans engendrer de stress oxydatif intracellulaire ni de phytotoxicité, tandis que la surfactine et la fengycine n'ont pas d'effet. Au niveau foliaire, aucun des lipopeptides testés n'induit de production de ROS_{apo}, suggérant une différence de réactivité entre les tissus racinaires et foliaires. Par ailleurs, l'application de lipopeptides sur les racines n'amplifie pas la production de ROS_{apo} foliaires en réponse à la chitine. Au contraire, une diminution significative de cette réponse est observée pour les trois lipopeptides sous leur forme monomérique. Enfin, les analyses sur protoplastes racinaires confirment l'absence de toxicité des lipopeptides sur la viabilité cellulaire ou l'intégrité membranaire. Ces résultats positionnent la mycosubtiline comme un candidat prometteur pour renforcer les défenses immunitaires du blé. Ce travail ouvre la voie à des investigations supplémentaires intégrant des approches transcriptomiques, biophysiques et microscopiques, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des lipopeptides chez les monocotylédones et d'optimiser leur usage en tant qu'agents de biocontrôle.

Mots-clés : *Triticum aestivum*, lipopeptides, surfactine, fengycin, mycosubtiline, immunité végétale, espèces réactives de l'oxygène, protoplastes.

Abstract

Current methods for controlling wheat (*Triticum aestivum*) pathogens mainly rely on the intensive use of synthetic pesticides, whose negative impacts on the environment and human health are increasingly highlighted. To mitigate these effects, biological alternatives are being explored. Biocontrol agents such as cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* appear promising. This work evaluates the effect of three lipopeptide families (surfactins, fengycins, mycosubtilins) on wheat immune responses, a monocotyledon of agronomic importance. The results demonstrate that monomeric mycosubtilin induces the production of apoplastic reactive oxygen species (ROS_{apo}) in roots without causing intracellular oxidative stress or phytotoxicity, whereas surfactin and fengycin have no significant effect. At the leaf level, none of the tested lipopeptides induced ROS_{apo} production, suggesting a difference in reactivity between root and leaf tissues. Furthermore, root application of lipopeptides did not enhance ROS_{apo} production in leaves in response to chitin. On the contrary, a significant reduction of this response was observed for all three lipopeptides in their monomeric form. Finally, analyses on root protoplasts confirmed the absence of toxicity of lipopeptides regarding cell viability or membrane integrity. These results highlight mycosubtilin as a promising candidate for strengthening wheat's immune defenses. This work paves the way for further research integrating transcriptomic, biophysical, and microscopic approaches to better understand the mechanisms of action of lipopeptides in monocotyledons and optimize their use as biocontrol agents.

Key words: *Triticum aestivum*, lipopeptides, surfactin, fengycin, mycosubtilin, plant immunity, reactive oxygen species, protoplasts.

Liste d'abréviations

ABA = acide abscissique
ADN = acide désoxyribonucléique
Ala = alanine
AlloThr = allothréonine
Asn = asparagine
Asp = acide aspartique
ATP = adénosine triphosphate
AUC = aire sous la courbe
BACs = agents de biocontrôle
BAK1 = kinase co-réceptrice
BSA = albumine sérique bovine
CA²⁺ = calcium
CC-NB-LRR = Domaine en hélice enroulée – Domaine de liaison aux nucléotides – Répétitions riches en leucines
CMC = concentration micellaire critique
CNL = récepteurs à nucléotides riches en leucine à domaine coiled-coil
CPDK = protéine kinase dépendante du calcium
DAMPS = motifs moléculaires associés aux dégâts
DCFH-DA = 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
DMSO = diméthylsulfoxyde
ET = éthylène
ETI = immunité déclenchée par les effecteurs
EtOH = éthanol
FDA = fluorescéine diacétate
FLS2 = récepteur de la flagelline 2
FT = facteur de transcription
GFP = protéine fluorescente verte
Gln = glutamine
Glu = acide glutamique
HR= réponse hypersensible
HRP = peroxydase de rafifort
Ile = isoleucine
IQR = méthode interquartile
IR = résistance induite
ISR = résistance systémique induite
JA = acide jasmonique
LecRKs = lectines-RLKs
Leu = leucine
L-O12 = luminol
MAMPs = motifs moléculaires associés aux microbes
MAPK = protéine kinase activée par les mitogènes
MP = membrane plasmique
MS = Murashige-Skoog

NADPH = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NB-LRR = des récepteurs avec un site de liaison aux nucléotides et répétitions riches en leucine

NHP = acide N-hydroxypipécolic

NLR = récepteurs à nucléotides riches en leucine

NPR1 = répresseur de l'expression des gènes liés à la réponse aux pathogènes 1

NPR3 = répresseur de l'expression des gènes liés à la réponse aux pathogènes 3

NPR4 = répresseur de l'expression des gènes liés à la réponse aux pathogènes 4

Orn = ornithine

PAMPs = motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBS = solution tampon phosphate

PGPF = champignons rhizobactériens promoteurs de la croissance des plantes

PGPR = bactéries rhizosphériques promotrices de croissance des plantes

Pip = acide pipécolique

PK = protéine kinase

Pro = proline

PR = gènes de défense

PRR = récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

PTI = immunité induite par la reconnaissance de motifs

RBOH = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit oxydases

RLK = récepteur de type kinase

RLP = récepteur de type protéine

ROS = espèces réactives de l'oxygène

ROS_{apo} = espèces réactives de l'oxygène extracellulaires

ROS_{intra} = espèces réactives de l'oxygène intracellulaires

SA = acide salicylique

SAR = résistance acquise systémique

SE = solution enzymatique

Ser = sérine

SIA = activation de l'immunité systémique

TIR-NB-LRR = Domaine Toll/Interleukine-1 – Domaine de liaison aux nucléotides – Répétitions riches en leucines

TNL = récepteurs à nucléotides riches en leucine à domaine Toll/interleukine-1

Tyr = tyrosine

Val = valine

Table des matières

1.	Introduction	1
1.1.	Contexte.....	1
1.2.	Immunité des plantes	2
1.2.1.	Immunité innée.....	2
1.2.2.	Immunité systémique	5
1.2.3.	Les espèces réactives de l'oxygène	7
1.2.4.	Differences entre les systèmes immunitaires des monocotylédones et dicotylédones ..	8
1.3.	Rôles des lipopeptides dans l'immunité des plantes.....	9
1.3.1.	Surfactine	10
1.3.2.	Fengycine	11
1.3.3.	Mycosubtiline.....	13
2.	Objectifs	14
3.	Matériel et méthode.....	15
3.1.	Culture de plantes	15
3.1.1.	Culture en boite de Pétri.....	15
3.1.2.	Culture en terre.....	15
3.2.	Détection des espèces réactives de l'oxygène	15
3.2.1.	Préparations des concentrations des lipopeptides.....	15
3.2.2.	Espèces réactives de l'oxygène apoplastiques racinaires	16
3.2.3.	Espèces réactives de l'oxygène intracellulaires racinaires	16
3.2.4.	Détection des espèces réactives de l'oxygène apoplastiques foliaires	17
3.3.	Test d'activation du système immunitaire systémique	17
3.4.	Protoplastes racinaires	18
3.4.1.	Génération de protoplastes racinaires.....	18
3.4.2.	Test de viabilité et de perméabilisation membranaire des protoplastes racinaires	18
3.5.	Statistiques.....	19
3.5.1.	Traitemet statistique pour les espèces réactives extracellulaires	19
3.5.2.	Traitemet statistique pour les espèces réactives intracellulaires.....	19
3.5.3.	Traitemet statistique des protoplastes.....	19
4.	Résultats	20
4.1.	Perception des lipopeptides par les tissus racinaires et foliaires du blé.....	20
4.1.1.	Espèces réactives de l'oxygène apoplastiques racinaires	20
4.1.2.	Espèces réactives de l'oxygène apoplastiques foliaires	24
4.1.3.	Espèces réactives de l'oxygène intracellulaires sur les racines	26
4.2.	Capacité des lipopeptides à activer l'immunité systémique du blé	27
4.3.	Effet des lipopeptides sur la viabilité et la perméabilité cellulaires du blé.....	28
5.	Discussion	29
5.1.	Evaluation des réponses immunitaires précoce du blé face aux lipopeptides.....	29
5.2.	Evaluation de la signalisation intracellulaire du blé en réponse aux lipopeptides	32
5.3.	Evaluation de la toxicité des lipopeptides sur les protoplastes de blé	34
6.	Conclusion.....	36
7.	Bibliographie	37
8.	Annexes.....	44

Liste des tableaux

Tableau 1: concentrations de lipopeptides.....	16
--	----

Liste des figures

Figure 1: Schéma illustrant les différents éliciteurs et les voies de reconnaissance associées dans l'immunité des plantes.....	3
Figure 2 : Schéma simplifié de la réponse innée chez les plantes	4
Figure 3 : Schéma simplifié de deux types de résistances chez les plantes. La résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR)	6
Figure 4 : Schéma illustrant les rôles des espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	8
Figure 5: Structure de la surfactine	11
Figure 6 : Structure de la fengycine	12
Figure 7 : Structure de la mycosubtiline.....	13
Figure 8 : (A) Coupe longitudinale et transversale d'un grain de blé ⁷⁴ , (B) Disposition des grains de blé dans la boîte de Petri.....	15
Figure 9 : Illustration de la croissance de <i>T. aestivum</i> en hydroponie.....	17
Figure 10 : Disposition des racines pour la génération de protoplastes dans la boîte de Petri.....	18
Figure 11 : Racines de <i>Triticum aestivum</i> après trois jours de croissance	20
Figure 12: Intensité de luminescence après 5 minutes de traitement avec la flagelline en fonction de la masse des racines (n=32). La droite en pointillée représente la courbe de tendance de ces points.....	21
Figure 13: Intensité relative de luminescence obtenue après l'ajout de la flagelline avec une racine (la radicule), 2 racines (la radicule et une racine séminale), ou 3 racines (la radicule et les deux racines séminales) et sans ajout de flagelline (eau et la radicule).....	21
Figure 14: Intensité de luminescence corrigée en fonction du temps représentant la production de ROS _{apo} racinaires	22
Figure 15 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS _{apo} racinaires mesurée par luminescence après application de lipopeptides (surfactine, fengycine et mycosubtiline) sous forme monomérique et micellaire	23
Figure 16 : Intensité de luminescence corrigée en fonction du temps représentant la production de ROS _{apo} sur feuilles	24
Figure 17 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS _{apo} foliaires mesurée par luminescence après application de lipopeptides (surfactine, fengycine et mycosubtiline) sous leur forme monomérique et micellaire	25
Figure 18 : Production au cours du temps de ROS intracellulaire produit par les racines suite à l'application de différents traitements	26
Figure 19 : Production au cours du temps de ROS _{apo} foliaires, mesurant la réponse immunitaire systémique suite au traitement des racines avec les lipopeptides et le mock DMSO.....	27
Figure 20 : Viabilité des protoplastes après application des trois familles de lipopeptides.....	28

Liste des figures supplémentaires

Annexe 1 : Intensité de luminescence obtenue après l'ajout de flagelline sur les racines de blé pour le seuil de discrimination.....	44
Annexe 2 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS _{apo} racinaires avec les valeurs aberrantes mesurée par luminescence après application de lipopeptides	44
Annexe 3 : Intensité de luminescence corrigée représentant la production de ROS _{apo} racinaires avec et sans valeurs aberrantes au cours du temps.	45
Annexe 4 : Code pour les ROS _{apo}	48
Annexe 5 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS _{apo} foliaires avec les valeurs aberrantes	48
Annexe 6 : Production au cours du temps de ROS intracellulaire racinaires avec et sans valeurs aberrantes	49
Annexe 7 : Code pour les ROS _{intra}	52
Annexe 8 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS _{apo} foliaires avec les valeurs aberrantes lors des tests SIA.....	52
Annexe 9 : Intensité de luminescence corrigée représentant la production de ROS _{apo} foliaires avec et sans valeurs aberrantes au cours du temps pour les tests SIA.	52
Annexe 10 : Images microscopiques des protoplastes avec la sonde FDA, évaluation de la viabilité des protoplastes.....	53
Annexe 11 : Images microscopiques des protoplastes avec le PI, test de perméabilisation des membranes	54

1. Introduction

1.1. Contexte

Le blé, *Triticum aestivum* L., est la céréale la plus cultivée au monde en raison de ses diverses applications¹. Tout d'abord, il est omniprésent dans l'alimentation humaine en raison de sa valeur nutritionnelle remarquable. En effet, il constitue une source majeure de glucides, de protéines, de minéraux, de vitamines et de lipides. De plus, le blé est capable de s'adapter à différents climats et sols rendant sa culture possible dans de nombreux pays². Cependant malgré sa capacité d'adaptation, les changements climatiques actuels, caractérisés par l'augmentation des températures, de la teneur en dioxyde de carbone dans l'atmosphère et des périodes de sécheresse, affectent son rendement. Certaines de ces conditions climatiques favorisent le développement de maladies. Par exemple, des températures élevées augmentent le développement de deux champignons, *Fusarium spp.* et *Puccinia striiformis*.

Un autre pathogène fongique, *Zymoseptoria tritici*, responsable de la septoriose du blé, une maladie qui supprime les premières lignes de défense immunitaire de la plante, engendre également d'importantes pertes de rendement et pertes économiques. Afin de limiter ces effets, différents fongicides sont appliqués, ciblant un site spécifique du champignon, comme une protéine, une enzyme ou encore une voie métabolique. Toutefois, cette spécificité augmente la résistance des champignons aux fongicides³. En effet, *Z. tritici* a développé une résistance à deux grandes familles de fongicides : les strobilurines et les triazoles. L'utilisation massive de fongicides n'est pas sans conséquence pour l'environnement. Ils déstabilisent les micro-organismes du sol, contaminent les eaux et sont ingérés par les animaux et les êtres humains^{4,5}. De nombreuses études associent l'exposition aux pesticides à des effets néfastes sur la santé humaine, augmentant entre autres, le risque de cancers, les problèmes respiratoires ou encore les problèmes neurologiques⁶.

Afin de limiter l'utilisation de ces produits chimiques, des stratégies alternatives sont étudiées. Parmi elles, les modifications génétiques des variétés de blé pour renforcer leur résistance constituent une piste majeure. Toutefois, l'introduction de gènes de résistances spécifiques dans des monocultures induit une pression de sélection sur les pathogènes, conduisant à leur évolution⁷. Une autre voie prometteuse est l'utilisation de micro-organismes comme agents de biocontrôle (BCAs) ou de biostimulants⁸. Les BCAs sont des organismes tels que des champignons, des bactéries ou des virus, capables d'agir contre les ravageurs ou les pathogènes par divers mécanismes. De plus, certains métabolites produits par ces micro-organismes, font aussi partie des BCAs. Ils peuvent induire chez la plante une résistance, c'est-à-dire la capacité à empêcher la multiplication des pathogènes, ou une tolérance, qui est la capacité de la plante à réduire les effets négatifs du pathogène. Ces micro-organismes peuvent également inhiber les pathogènes, ou encore exercer une compétition avec ces derniers pour les ressources nutritives et l'espace^{3,8}. Certains BCAs, en plus de lutter contre les pathogènes, peuvent indirectement favoriser la croissance des plantes, bien que ce ne soit pas leur rôle principal, contrairement aux biostimulants. Ces

derniers, quant à eux, sont des micro-organismes ou substances naturelles appliquées aux plantes, graines ou sols dans le but de stimuler les processus physiologiques. Leur action vise à améliorer la tolérance aux stress abiotiques (sécheresse, lumière, polluants, etc.) et l'utilisation des nutriments, sans agir directement sur les pathogènes⁸. Certaines bactéries rhizosphériques promotrices de croissance des plantes (PGPR) peuvent cumuler les rôles de biostimulants et BCAs. En effet, elles augmentent la tolérance aux stress biotiques (pathogènes) et abiotiques, permettent de réduire l'utilisation de pesticides et augmentent la disponibilité des nutriments dans le sol ainsi que leur absorption. Elles favorisent aussi la synthèse d'hormones végétales, les phytohormones, et produisent des enzymes hydrolytiques (chitinase et glucanase) capables d'inhiber la croissance de champignons pathogènes. Des genres bactériens qui remplissent ces deux rôles sont par exemple *Pseudomonas* spp. et *Bacillus subtilis*, qui sont couramment utilisés comme PGPR^{9,10}. *Bacillus* spp. produit également des lipopeptides qui sont reconnus comme BCAs car inhibent certains pathogènes. De plus, certains lipopeptides possèdent également des propriétés élicitrices en induisant l'immunité de la plante^{11,12}.

1.2. Immunité des plantes

Les plantes possèdent des mécanismes de défense complexes leur permettant de faire face à de nombreux pathogènes. Ces défenses s'organisent en plusieurs niveaux, allant des barrières physiques et chimiques à des signaux à longue distance et des modifications génétiques. Ces systèmes évoluent continuellement en réponse aux stratégies développées par les pathogènes pour les contourner. En milieu naturel, les plantes sont soumises à des stress biotiques et abiotiques simultanément. C'est la raison pour laquelle les différents systèmes immunitaires interagissent entre eux¹³.

1.2.1. Immunité innée

La première ligne de défense des plantes est une barrière physique et chimique. Tout d'abord, une couche de cire recouvre les feuilles afin d'éviter la rétention d'eau sur la plante ce qui favoriserait la germination de spores fongiques ou de bactéries. Ensuite, une fois cette première barrière franchie, le pathogène rencontre la paroi cellulaire, principalement composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines. Ensemble ils constituent une barrière physique mais jouent également un rôle dans la signalisation d'une invasion par un pathogène. La cellulose assure la solidité et la flexibilité de la paroi, l'hémicellulose contribue à maintenir l'organisation de cette dernière en liant les fibres de cellulose, et les pectines cimentent les cellules entre elles et régulent l'humidité. Enfin, tout au long de sa croissance, les racines et les feuilles de la plante libèrent des gaz et des substances organiques. Parmi celles-ci, des métabolites secondaires tels que les phytoalexines, les terpènes, les saponines ou encore des composés phénoliques possèdent des propriétés antimicrobiennes et contribuent ainsi directement à la défense de la plante¹⁴⁻¹⁶.

Lorsqu'un pathogène réussit à franchir ces défenses primaires, l'immunité innée de la plante est activée via la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) ou aux microbes (MAMPs) par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) situés dans la membrane

cellulaire. Ces PRRs sont des récepteurs de type kinase (RLKs) ou de type protéine (RLPs) possédant différents domaines extracellulaires qui jouent un rôle de médiateurs dans la reconnaissance de PAMPs/MAMPs¹⁷. Les PAMPs peuvent également être reconnus par les lipides des membranes plasmiques (MP)¹⁸. Ces PAMPs/MAMPs sont aussi appelés éliciteurs généraux (**Figure 1**) et comprennent des molécules telles que la chitine, la flagelline ou les lipopolysaccharides. La chitine est un polysaccharide présent dans les parois cellulaires des champignons, tandis que la flagelline est présente chez les bactéries¹⁹. En parallèle, les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) sont des motifs moléculaires issus de composés de la plante elle-même. Ils sont libérés à la suite de dommages cellulaires causés par un stress, une infection ou un pathogène²⁰. En revanche, les éliciteurs spécifiques correspondent aux effecteurs produits par les pathogènes, reconnus par des récepteurs intracellulaires. Une fois détectés par les PRRs, des événements précoce sont déclenchés au sein de la plante, tels que des flux ioniques (calcium, potassium, chlorure) à travers la MP, des réactions de phosphorylation et déphosphorylation de protéines, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi que l'implication de phytohormones telles que l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET) ou l'acide jasmonique (JA)²¹.

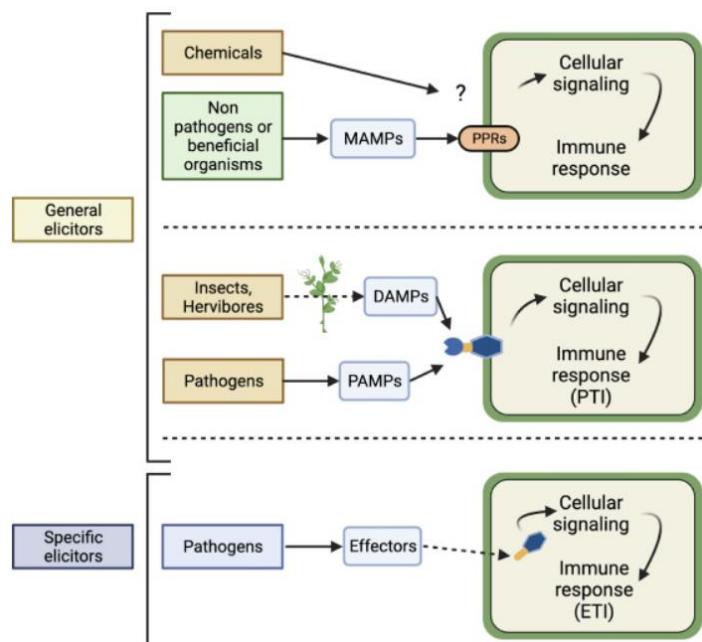


Figure 1: Schéma illustrant les différents éliciteurs et les voies de reconnaissance associées dans l'immunité des plantes. Les éliciteurs généraux comprennent les molécules chimiques qui n'ont pas de récepteurs connus, ou les motifs associés aux microbes (MAMPs) reconnus par les récepteurs PRRs situés à la surface des molécules. Ces MAMPs ou molécules chimiques induisent une réponse immunitaire. Les signaux associés aux dommages (DAMPs), libérés par la plante elle-même, sont produits après l'attaque d'insectes ou d'herbivores, et les signaux associés aux pathogènes (PAMPs) sont reconnus par des PRRs et induisent l'immunité induite par la reconnaissance de motifs (PTI). Les éliciteurs spécifiques correspondent aux effecteurs des pathogènes reconnus par des récepteurs intracellulaires. Cette reconnaissance permet le déclenchement de l'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI)²².

Cette reconnaissance de PAMPs/MAMPs active l'immunité induite par la reconnaissance de motifs (PTI) (**Figure 2**), initiant une cascade de signaux de défense, ainsi que des réponses de défense précoce. Un des premiers signaux précoces est l'influx de calcium (Ca^{2+}) dans le cytoplasme, qui initie une cascade de réactions de signalisation^{17,23}. Le Ca^{2+} joue un rôle clé dans l'immunité en régulant notamment la production de ROS, de SA et la fermeture des stomates¹⁴. En parallèle, d'autres réponses sont induites telles que la fermeture des stomates, l'activation d'une cascade de protéines kinase activée par les mitogènes (MAPK) ou par du calcium (CPDK)²⁴, la transcription de gènes de résistance, ou encore l'accumulation de callose¹⁴. Les MAPKs agissent comme des modules de signalisation permettant de relayer et d'amplifier les signaux perçus par les récepteurs de la MP²⁵. La callose est un polysaccharide s'accumulant entre la MP et la paroi au site d'infection. Elle joue un rôle de renforcement de la paroi cellulaire et forme ainsi une barrière physique contre le pathogène²⁶.

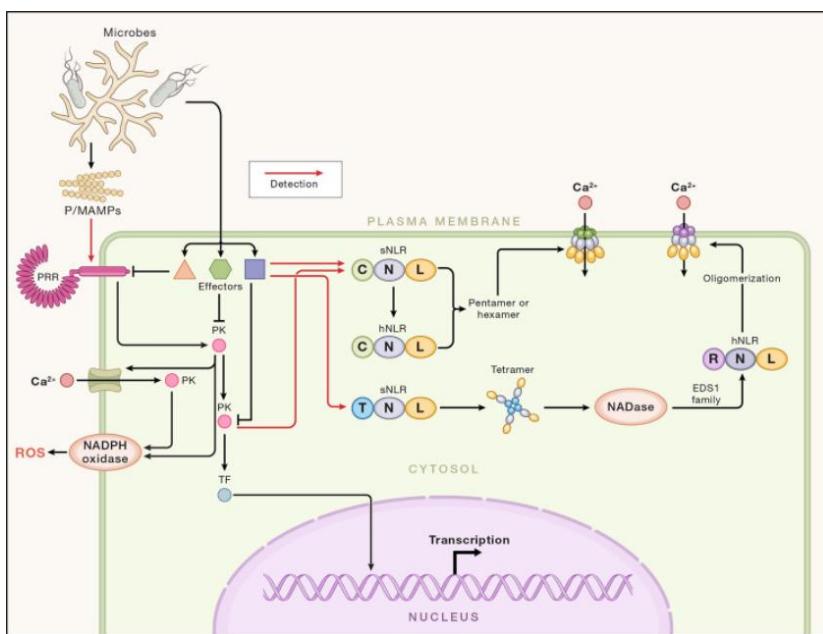


Figure 2 : Schéma simplifié de la réponse innée chez les plantes : l'immunité déclenchée par la reconnaissance de motifs (PTI) et l'immunité déclenchée par la reconnaissance des effecteurs (ETI). Les récepteurs membranaires (PRRs), situés à la surface de la membrane plasmique, perçoivent des signaux externes tels que les motifs moléculaires associés aux pathogènes ou aux microbes (PAMPs/MAMPs), des signaux hormonaux, ou encore des stress abiotiques. Cette perception active des cascades de phosphorylation via des intermédiaires de signalisation, comme des kinases (PK) ou des ions calcium (Ca^{2+}), ou encore les espèces réactives de l'oxygène (ROS) via des enzymes (NADPH oxidase), qui assurent la transmission du signal. Ces intermédiaires activent ensuite divers modules tels que des modifications post-traductionnelles, des interactions hormonales et des organites, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription (TF). Ainsi, une régulation des gènes impliqués dans le développement, la croissance et les réponses aux stress est mise en place. Les effecteurs (effectors) pathogéniques peuvent interférer avec ces voies de signalisation, et peuvent être détectés (flèches rouges) directement en se liant aux CNLs (récepteurs à nucléotides riches en leucine à domaine coiled-coil) ou indirectement par les TNLs (récepteurs à nucléotides riches en leucine à domaine Toll/interleukine-1), menant au changement de conformation des NLRs (représentée sous forme de tétramère, pentamère ou hexamère). Cette transformation en tétramère induit l'activité d'un complexe enzymatique (NADase) qui produit des petites molécules de signalisation (EDS1) qui interagissent à

leur tour avec les NLRs. Ces transformations des CNLs et RNLs conduisent à la formation de canaux membranaires calciques qui favorisent l'activation immunitaire²⁷.

Cependant, certains pathogènes sécrètent des effecteurs capables d'inhiber cette PTI, leur permettant une infection plus efficace^{17,28}. Ainsi, les plantes ont développé un second niveau de défense : l'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI) (*Figure 2*). Les pathogènes possèdent des gènes appelés gènes d'avirulence qui codent pour des effecteurs spécifiques. Ces effecteurs sont injectés dans les cellules de la plante et sont reconnus dans le cytoplasme par des récepteurs avec un site de liaison aux nucléotides et répétitions riches en leucine (NB-LRR) qui sont des protéines appartenant aux récepteurs à nucléotides riches en leucine (NLR). Ces récepteurs sont associés aux gènes de résistance de la plante. Cette reconnaissance déclenche une réponse hypersensible (HR), caractérisée par la mort cellulaire localisée, la production de phytohormones et substances antimicrobiennes, ainsi que l'amplification de la PTI^{14,21,28,29}. L'interaction entre la PTI et l'ETI contribue à l'activation d'une résistance induite locale (au site d'infection) et systémique (dans les tissus à distance). Cette complémentarité repose sur la coopération entre les récepteurs membranaires et intracellulaires, qui permet à la plante de détecter plus finement les signaux d'invasion et de déclencher des réponses plus efficaces^{17,30}.

La résistance induite (IR) s'accompagne de changements métaboliques chez la plante. En effet, la production de métabolites secondaires est stimulée avec notamment la production de phytoalexines possédant des propriétés antibiotiques. De plus, la paroi cellulaire est renforcée par le dépôt de protéines, glycoprotéines, polysaccharides, lignine¹⁴ ou polymères aromatiques. Enfin, des protéines de résistance sont produites et possèdent des propriétés antimicrobiennes ou antifongiques²¹.

1.2.2. Immunité systémique

Outre les défenses immédiates (PTI et ETI), les plantes peuvent activer des mécanismes de défense généralisés dans tout l'organisme, comme la résistance acquise systémique (SAR) et la résistance systémique induite (ISR), qui permettent à la plante d'être mieux préparée à des infections futures. Ces réponses reposent sur un phénomène appelé « priming » qui amplifie la réponse immunitaire future³¹.

La SAR permet d'envoyer aux organes non infectés des signaux informant de l'invasion et de développer une résistance à long terme¹⁷. Cette résistance surtout étudiée chez les dicotylédones, est efficace contre les pathogènes biotrophes¹³. En effet, lors d'un stress biotique, SA s'accumule dans les tissus infectés, entraînant la conversion d'une protéine, un coactivateur de transcription (un répresseur de l'expression des gènes liés à la réponse aux pathogènes 1 (NPR1)) en monomère. Sous cette forme, la protéine peut pénétrer dans le noyau et déclencher des changements d'expression des gènes de défense. Toutefois, cette activation est finement régulée par d'autres protéines capables de se lier aussi à SA (protéines inhibitrices, NPR3/NPR4). En parallèle, la perception de SA par NPR1 et NPR4 déclenche la production d'un autre signal de défense : l'acide N-hydroxypipécolique (NHP), un dérivé de l'acide pipécolique (Pip)³⁰. Ainsi, SAR repose sur deux voies métaboliques interconnectées, régulées de manière coordonnée, celles de SA et Pip/NHP¹³.

L'ISR résulte de la colonisation des racines par des micro-organismes bénéfiques non pathogènes, des PGPRs ou des champignons rhizobactériens promoteurs de la croissance des plantes (PGPF). Contrairement à SAR, ISR combat les pathogènes nécrotrophes et les ravageurs et dépend des voies de signalisation de JA et ET^{13,30}. (**Figure 3**)

Concernant le priming, il amplifie la résistance de la plante, rendant ses défenses plus rapides et efficaces lors d'une attaque ultérieure d'un pathogène³¹. Il peut être induit par des composés exogènes ou des PGPRs ; il en résulte une augmentation de l'expression de gènes de résistance, une production de phytoalexines et de ROS. Le priming du SAR repose sur l'application directe de SA et NHP, de leurs précurseurs ou par l'induction de leurs voies métaboliques tandis que le priming de ISR, dépend des voies métaboliques de JA et ET^{30,31}.

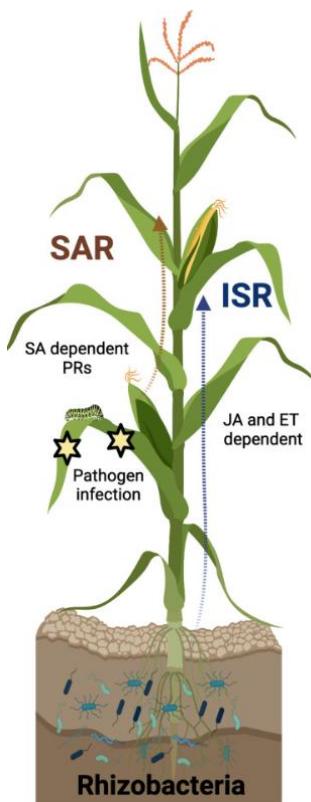


Figure 3 : Schéma simplifié de deux types de résistances chez les plantes. La résistance systémique acquise (SAR) est déclenchée après une infection pathogène locale et est dépendante de la voie de signalisation de l'acide salicylique (SA). La résistance systémique induite (ISR) est activée par des bactéries bénéfiques présentes dans le sol (rhizobactéries) et est dépendante des voies de signalisation de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET)²².

Les phytohormones jouent donc un rôle clé dans la régulation des mécanismes immunitaires. En plus du SA, JA et ET, impliqués dans les réponses spécifiques selon le type de pathogène (biotrophe ou nécrotrophe), d'autres hormones interviennent. Entre autres, les auxines et les cytokinines, principales hormones du développement végétal, participent également à la régulation des réponses au stress. Les auxines stimulent la croissance et la différenciation cellulaire, tandis que les cytokines contrôlent la division cellulaire³². Ces hormones interagissent activement avec le métabolisme des ROS, en modulant leur production, leur signalisation et leur détoxicification^{30,33}. Cependant, certains pathogènes détournent la production d'auxines ou de cytokinines afin de favoriser leur développement¹⁴.

1.2.3. *Les espèces réactives de l'oxygène*

Lorsqu'une plante est stressée par des facteurs biotiques ou abiotiques, elle produit des ROS³⁴ : superoxyde (O_2^-), hydroxyde (OH^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2)³⁵. Cette production constitue une réponse de défense précoce permettant de signaler un stress localement et à distance¹⁷. (**Figure 4**) Cependant, une accumulation excessive de ces espèces est toxique pour la plante, entraînant une peroxydation lipidique membranaire, et des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN) et aux protéines³⁶. Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, les plantes possèdent des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, permettant de contrôler le taux de ROS^{37,38}.

Ces dernières sont générées de manière intracellulaire (ROS_{intra}) dans les chloroplastes, les mitochondries et peroxysomes³⁹, et de manière extracellulaire dans l'apoplasmme (ROS_{apo}), via des enzymes membranaires telles que les nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduits (NADPH) oxydases (RBOH) et les peroxydases de la paroi cellulaire^{40,41}. Bien que les récepteurs RLKs ne produisent pas directement de ROS, ils participent à leur accumulation en activant des voies de signalisation, par exemple via des influx de calcium, qui conduisent à l'activation des enzymes RBOHs²³. L'accumulation de ROS dans les différents organites dépend du métabolisme photosynthétique des tissus végétaux. Ainsi, des organes avec un faible métabolisme photosynthétique (fleurs, fruits) produisent les ROS principalement dans les mitochondries, peroxysomes et l'apoplasmme, tandis que les chloroplastes produisent des ROS dans les tissus photosynthétiques⁴².

Les ROS_{apo} et ROS_{intra} exercent leur rôle de signalisation en induisant un influx de Ca^{2+} , des cascades de phosphorylation, et en interagissant aussi avec des phytohormones telles que SA, JA et ET^{17,36,41}. Enfin, les ROS_{apo} peuvent être perçues ou transportées sous forme de H_2O_2 à travers les aquaporines ce qui permet le signalement à distance²³. Les aquaporines jouent un rôle régulateur important dans la communication du stress entre les organites et entre les cellules. De plus, le signalement à distance se réalise aussi grâce à des vagues de ROS, déclenchées par un changement rapide des niveaux de ROS dans une cellule, qui induit une réponse similaire dans les cellules voisines⁴³.

Le Ca^{2+} , dont ses influx sont aussi reconnus comme un événement précoce de l'immunité, joue un rôle central dans la régulation des ROS. En effet, comme dit précédemment, l'augmentation du taux de ROS

induit des influx de Ca^{2+} . En retour, le Ca^{2+} est nécessaire à l'activation des RBOHs. Cette interaction entre les ROS et Ca^{2+} amplifie et module la réponse précoce au stress^{23,31}.

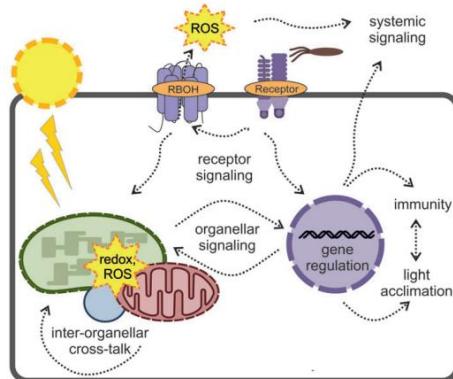


Figure 4 : Schéma illustrant les rôles des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS sont générées de manière extracellulaire via enzymes RBOHs et des récepteurs, et de manière intracellulaire dans les organites tels que les chloroplastes et mitochondries. Cette production permet la transmission du signal de stress via des voies de signalisation membranaire (receptor signaling) et par les organites (organellar signaling), aboutissant à une régulation génétique et ainsi aux réponses immunitaires et réponses adaptatives (à la lumière par exemple)²³.

1.2.4. Différences entre les systèmes immunitaires des monocotylédones et dicotylédones

Parmi les plantes à fleurs (angiospermes), les monocotylédones et les dicotylédones se différencient par leur nombre de cotylédons (feuilles embryonnaires), ainsi que par des différences anatomiques, reproductive et moléculaires³². L'immunité des plantes a été majoritairement étudiée chez les dicotylédones, en particulier sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, laissant les mécanismes chez les monocotylédones encore peu explorés. Bien qu'elles partagent les grandes lignes des mécanismes d'immunité végétale, telles que la reconnaissance des pathogènes et l'activation de réponses de défense, elles présentent des variations au niveau des récepteurs impliqués, des gènes de résistance et certaines voies hormonales^{13,28,44}.

Chez *A. thaliana*, le récepteur de la flagelline 2 (FLS2), un RLK, perçoit la flagelline bactérienne et déclenche une cascade de signalisations de défense en interaction avec un autre récepteur, une kinase co-réceptrice (BAK1). Chez le riz, une monocotylédone, un homologue fonctionnel à FLS2, ainsi qu'une protéine membranaire capable de reconnaître la chitine ont été découverts. Le riz possède un gène de résistance, Xa21, lui permettant de produire un récepteur capable de reconnaître une protéine bactérienne Ax21. Cette reconnaissance déclenche une réponse de défense similaire à celle activée par FLS2 telle que l'activation de facteurs de transcription, l'expression de gènes de défense (PR) ou encore une HR. Des gènes similaires à Xa21 ont été également trouvés chez d'autres monocotylédones comme le maïs, le sorgho ou *Brachypodium*²⁸. Par ailleurs, d'autres PRRs comme les lectines-RLKs (LecRLKs), un sous-groupe des RLKs, sont impliqués dans l'immunité de dicotylédones (tabac, *A. thaliana*, pomme), et monocotylédones (riz, et blé). Chez le blé, un type de LecRLKs situé dans les chloroplastes,

interagit avec une protéine responsable dans la résistance face à *Puccinia striiformis* en affectant la production de ROS⁴⁵.

L'ETI repose dans les deux groupes sur la reconnaissance d'effecteurs par les protéines NLR. Cependant, les monocotylédones possèdent davantage de récepteurs intracellulaires contenant un domaine en hélice et un domaine riche en leucine (CC-NB-LRR), tandis que les TIR-NB-LRR (récepteurs interleukine-1) sont plus fréquents chez les dicotylédones²⁸. Enfin, bien que la réponse SAR semble globalement conservée dans les deux groupes, elle reste encore peu étudiée chez les monocotylédones. La signalisation à l'aide de SA et l'implication de PR1 semblent être présente chez les monocotylédones. Cependant le rôle de SA reste peu documenté et semble différer selon l'espèce. Chez le maïs, l'orge, le blé et la banane, une immunité de type SAR a été observée avec SA et SA/acide abscissique (ABA). Pip semble également être conservé chez les deux groupes car l'application de Pip produit des ROS¹³. Concernant l'ISR, les monocotylédones et dicotylédones sont sensibles aux PGPRs/PGPFs avec leur croissance et immunité stimulées, mais les voies hormonales impliquées varient selon l'espèce. Par exemple, chez *A. thaliana*, ISR repose principalement sur les voies JA et ET, tandis que chez le riz et le maïs, c'est JA et ABA qui prédominent. De plus, chez le blé, ISR peut être renforcée par l'implication des voies SA et JA, en fonction de l'inducteur¹³. En effet, une étude sur le blé a démontré que la surfactine induit l'activation des voies de signalisation de SA et JA, ainsi que l'induction de gènes de défense⁴⁶. Ces différences reflètent une spécificité de l'espèce dans le recrutement des voies hormonales impliquées dans l'ISR.

1.3. Rôles des lipopeptides dans l'immunité des plantes

Les lipopeptides sont des métabolites secondaires cycliques produits principalement par des bactéries du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces*. Ces molécules sont amphiphiles, composées d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe, leur conférant une affinité particulière pour les interfaces eau/lipide, y compris les membranes cellulaires. Chez *Bacillus*, ils ont une structure cyclique et trois grandes familles se distinguent selon leur séquence en acides aminés, leur longueur de chaîne lipidique et la nature de la fermeture du cycle peptidique : surfactines, fengycines et iturines^{47,48}. Grâce à leur structure amphiphile, les lipopeptides sont surtout connus pour leurs propriétés surfactantes. En effet, ils réduisent la tension de surface et ainsi augmentent la solubilité et la disponibilité des composés. De plus, ils peuvent former des micelles au-delà d'une certaine concentration, appelée la concentration micellaire critique (CMC). Ces propriétés, notamment la réduction de la tension de surface et la formation de micelles, facilitent la formation de biofilms par *Bacillus subtilis* à la surface des racines, un mécanisme clé dans la colonisation de la rhizosphère par la bactérie. En plus de leurs propriétés physico-chimiques, les lipopeptides possèdent des activités antimicrobiennes, antifongiques et élicitrices des mécanismes de défense des plantes. En effet, leurs effets directs sur les pathogènes sont

dus à l'altération des MP, par la formation de pores et/ou la lyse cellulaire. Ces propriétés permettent de considérer *Bacillus subtilis* comme une PGPR^{49,50}.

Afin de mieux comprendre les effets biologiques des lipopeptides, il est essentiel de s'intéresser à leur interaction avec les MP végétales. Celles-ci sont constituées de trois classes de lipides, les glycérolipides, les sphingolipides et les stérols, dont la distribution influence fortement leur sensibilité aux lipopeptides. La teneur de ces lipides varie selon l'espèce et le type de cellules. Les MP des plantes contiennent généralement une plus grande proportion de stérols et de sphingolipides par rapport aux cellules animales⁵¹.

De plus, les plantes perçoivent les lipopeptides bactériens via les récepteurs membranaires RLKs, ce qui déclenche des réponses immunitaires comme l'activation des voies de signalisation JA et ET⁵⁰. Ces mécanismes d'induction de défenses expliquent l'intérêt croissant pour ces composés comme agent de biocontrôle pour une agriculture plus durable, d'autant plus qu'ils sont biodégradables et faiblement toxiques pour l'environnement et la santé humaine^{48,52}.

1.3.1. Surfactine

La surfactine est un lipopeptide cyclique produit par *Bacillus subtilis*. Elle est composée d'un heptapeptide (7 acides aminés) formant une structure en cycle lactone avec une chaîne d'acide gras hydrophobe de 12 à 16 carbones (**Figure 5**). La séquence peptidique est L-Acide glutamique – L-Leucine – D-Leucine – L-Valine – L-Acide aspartique – D-Leucine – L-Leucine (L-Glu¹–L-Leu²–D-Leu³–L-Val⁴–L-Asp⁵–D-Leu⁶–L-Leu⁷). Elle possède deux charges négatives dues aux résidus acides Glu¹ et Asp⁵. La surfactine est capable d'interagir directement avec la fraction lipidique de la MP en s'y insérant selon la longueur de sa chaîne lipidique⁵³. Elle désorganise alors les membranes lui conférant des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, insecticides et éliciteurs des défenses des plantes^{4,49,52,54}. En effet, en-dessous de la CMC, soit de 10 µM, la surfactine perturbe l'organisation des lipides et induit un stress de courbure sans altérer l'intégrité de la membrane. La surfactine montre une affinité pour les membranes riches en phosphatidylcholine, un phospholipide, et pauvres en cholestérol, ce qui explique son efficacité sur les bactéries qui sont dépourvues de ce stérol⁵¹. Ceci permet notamment de stimuler l'immunité végétale. Cependant, à des concentrations supérieures à la CMC, donc sous forme de micelles, elle agit comme un détergent en formant des pores ou en solubilisant la membrane. Ceci permet donc une activité antibactérienne⁵³.

Récemment, il a été démontré que la surfactine peut déclencher l'ISR via un mécanisme indépendant des récepteurs PRRs. En effet, la surfactine s'insère dans des domaines membranaires riches en sphingolipides, induisant la déformation de la membrane plasmique et l'activation de canaux ioniques, conduisant à des réponses immunitaires spécifiques⁵⁵. Bien que la surfactine n'ait pas d'activité antifongique directe contre *Z. tritici*, elle peut induire l'ISR du blé à des concentrations sous la CMC. Cette induction repose sur l'activation des voies de signalisation de SA et JA, ainsi que l'induction de

gènes de défense⁴⁶. Chez le tabac, elle induit des réponses précoces telles que des influx de calcium au travers de la MP et une production de ROS⁴⁶. Lorsqu'elle est combinée à la mycosubtiline, la surfactine agit comme un surfactant, améliorant la pénétration, la rétention et le recouvrement foliaire de la mycosubtiline favorisant ainsi la protection des cultures⁵⁶. Face à *Fusarium graminearum*, un autre champignon du blé, la surfactine sous sa forme micellaire (100 µM) montre une activité antifongique directe⁵⁷. Par ailleurs, elle exerce également un effet antibactérien contre *Xanthomonas* spp., responsable de maladies chez le citronnier. La capacité de la surfactine à induire la formation de biofilms racinaires renforce la résistance des plantes. Par exemple, elle limite la prolifération de *Fusarium graminearum* chez le blé et de *Pseudomonas syringae* chez la tomate. Chez le riz, elle stimule une HR menant à la mort cellulaire localisée du tissu infecté. Enfin, la surfactine a démontré sa capacité à induire l'ISR chez de nombreuses autres espèces, telles que les melons, les tomates, le tabac, ou encore les vignes^{50,58}.

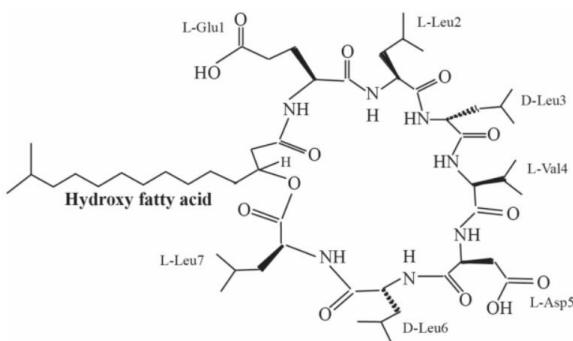


Figure 5: Structure de la surfactine, lipopeptide cyclique composé d'un heptapeptide (7 acides aminés) formant une structure en cycle lactone avec une chaîne d'acide gras hydrophobe de 12 à 16 carbones. La séquence peptidique est L-Acidé glutamique – L-Leucine – D-Leucine – L-Valine – L-Acidé aspartique – D-Leucine – L-Leucine⁵⁴.

1.3.2. Fengycine

La fengycine est un lipopeptide cyclique constitué de dix acides aminés (décapeptide) avec huit d'entre eux formant une structure cyclique lié à un acide gras β-hydroxy comprenant une chaîne de 14 à 18 carbones (**Figure 6**). Sa séquence peptidique est : acide glutamique – ornithine – tyrosine – allothréonine – acide glutamique – alanine – proline – glutamine – tyrosine – isoleucine (Glu–Orn–Tyr–AlloThr–Glu–Ala/Val–Pro–Gln–Tyr–Ile)⁵⁹. Les trois résidus Glu donnent à la fengycine une charge nette négative malgré une charge positive de Orn^{47,59}. La fengycine présente une forte activité antifongique⁶⁰. Cette molécule agit principalement en déstabilisant la MP des champignons, soit par formation de pores via agrégation dans la MP, soit en modifiant la structure et la perméabilité de la bicouche lipidique, notamment en interagissant avec les stérols (cholestérol ou ergostérol)^{49,51,59}. Elle peut également induire une résistance systémique spécifique à certaines plantes^{47,48,61–64}.

Comme la surfactine, la fengycine favorise la formation de biofilms racinaires par *Bacillus subtilis*, renforçant ainsi la résistance des plantes face à certains pathogènes, notamment *F. graminearum* chez le

blé. En effet, des analyses transcriptomiques ont montré que l'application de la fengycine ($70 \mu\text{M}$) ainsi que de l'iturine augmentait l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires du blé, notamment ceux associés à la production de ROS (TaRboH)⁶⁵. Elle contribue également à la défense du riz en induisant une HR et la mort cellulaire du pathogène⁵⁰. Une autre étude a démontré qu'en association avec l'iturine, la fengycine est capable d'induire l'ISR du riz face à *Pyricularia oryzae*. De plus, lorsqu'elle est co-appliquée avec la surfactine et l'iturine, elle inhibe totalement la germination des spores de ce champignon⁶⁶. En association avec la surfactine, la fengycine active chez la tomate et le pois, les enzymes nécessaires à la voie métabolique de la lipoxygénase impliquée dans la biosynthèse de JA, une hormone centrale dans la régulation de l'ISR. La fengycine joue également un rôle protecteur chez différentes espèces végétales. En effet, elle stimule l'immunité des tomates, des pommes de terre et du tabac, via l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes⁵⁰. Chez la vigne, la fengycine est perçue comme la surfactine et la mycosubtiline, par les cellules végétales. Tandis que la surfactine et la mycosubtiline induisent des réponses immunitaires innées, la fengycine semble provoquer seulement les premiers événements liés à l'immunité. Une analyse de l'expression des gènes a montré que la mycosubtiline active les voies de signalisation de SA et JA, tandis que la fengycine à une concentration supérieure à sa CMC, présente un effet antifongique direct⁵⁸.

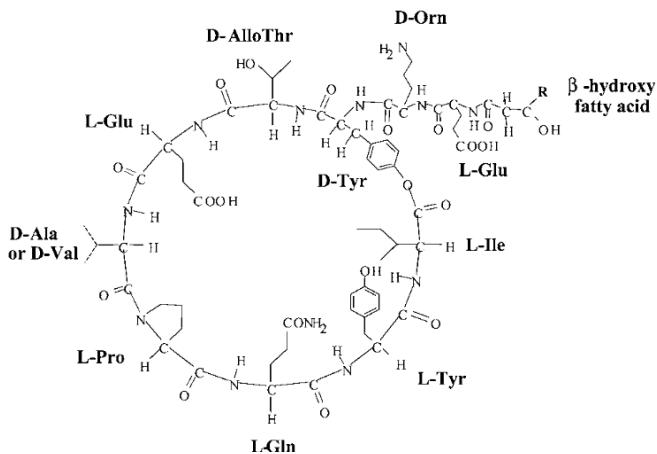


Figure 6 : Structure de la fengycine, lipopeptide cyclique constitué de dix acides aminés (décapeptide) avec huit d'entre eux formant une structure cyclique lié à un acide gras β -hydroxy comprenant une chaîne de 14 à 18 carbones. Sa séquence peptidique est: acide glutamique – ornithine – tyrosine – allothréonine – acide glutamique – alanine – proline – glutamine – tyrosine – isoleucine (Glu–Orn–Tyr–AlloThr–Glu–Ala/Val–Pro–Gln–Tyr–Ile)^{59,62}.

1.3.3. Mycosubtiline

La mycosubtiline est un lipopeptide cyclique appartenant à la famille des iturines, produit par certaines souches de *Bacillus subtilis*. Elle est constitué d'un heptapeptide cyclique, dont la séquence est D-Asparagine – D-Asparagine – D-Sérine – Asparagine – Asparagine – Glutamine – Proline (D-Asn¹–D-Asn²–D-Ser³–Asn⁴–Asn⁵–Gln⁶–Pro⁷), lié à un acide gras β -aminé dont la longueur de chaîne peut varier entre 13 et 17 carbones^{56,61,67}. Elle est riche en acides aminés polaires neutres comme Asn, Gln et Ser, et ne porte pas de charge contrairement à la surfactine et la fengycine⁶⁸. (**Figure 7**)

Elle possède des propriétés antifongiques contre deux champignons majeurs du blé, *Zymoseptoria tritici*^{56,69} et *Fusarium graminearum* en déstabilisant la MP et les parois cellulaires fongiques⁷⁰. Lorsqu'elle est associée à la fengycine ou à la surfactine, ses effets antifongiques sont amplifiés⁷¹. Par exemple, une étude a démontré qu'un mélange de mycosubtiline et de surfactine permettait de réduire d'environ 60% l'incidence de *Venturia inaequalis*, un champignon s'attaquant aux pommiers, mettant en évidence un effet synergique entre ces deux lipopeptides⁷². De plus, elle accroît la tolérance au champignon *Botrytis cinerea* présent dans les feuilles de vignes⁵⁸.

A une concentration de 50 μ M, les iturines peuvent également induire des réponses immunitaires chez les plantes, comme chez le coton, où elles déclenchent la production de ROS et l'activation de MAPK face à *Verticillium dahliae*⁷³. Bien que les iturines présentent peu d'effets antibactériens, elles montrent tout de même une efficacité contre *Xanthomonas* spp., une bactérie pathogène du citronnier. Par ailleurs, elles induisent une activité antifongique contre plusieurs champignons, tels que *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp.^{49,50}.

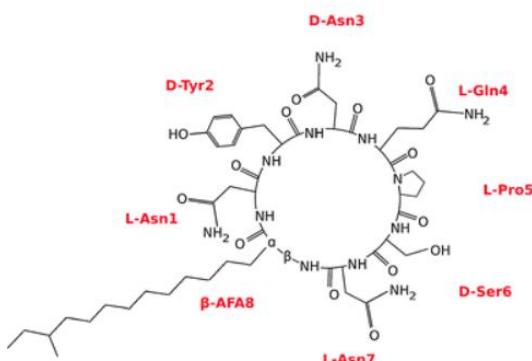


Figure 7 : Structure de la mycosubtiline, constituée d'un heptapeptide cyclique, dont la séquence est D-Asparagine – D-Asparagine – D-Sérine – Asparagine – Asparagine – Glutamine – Proline (D-Asn¹–D-Asn²–D-Ser³–Asn⁴–Asn⁵–Gln⁶–Pro⁷), lié à un acide gras β -aminé (β -AFA) dont la longueur de ramifications peut varier entre 13 et 17 carbones^{56,61,67}.

2. Objectifs

Les lipopeptides cycliques, sécrétés par les bacilles bénéfiques du sol, se sont révélés être des candidats prometteurs pour stimuler les défenses naturelles des plantes. Parmi les trois grandes familles de lipopeptides de *Bacillus*, à savoir les surfactines, les fengycines et les iturines, ce sont les surfactines qui ont été le plus étudiées et principalement sur les dicotylédones. Très peu d'études ont été réalisées sur les monocotylédones. Or, bien que ces deux groupes de plantes partagent les grandes lignes de l'immunité végétale, ils présentent des différences dans la nature des récepteurs membranaires, des lipides membranaires, des gènes de résistance et de certaines voies de signalisation. Dans ce travail, une monocotylédone d'importance agronomique majeure, *Triticum aestivum*, a été considérée pour évaluer et comparer le potentiel éliciteur des trois familles de lipopeptides.

Trois objectifs spécifiques ont été poursuivis :

- Dans un premier temps, les effets directs des lipopeptides ont été évalués en mesurant la production de ROS_{apo} et ROS_{intra} sur les feuilles et les racines de blé. Le protocole mis précédemment au point pour *Arabidopsis*⁵⁵ a dû d'abord être adapté pour le blé.
- Dans un second temps, la capacité des lipopeptides appliqués aux racines à induire une réponse immunitaire au niveau des feuilles a été étudiée.
- Enfin, une approche sur protoplastes a été mise en place afin d'étudier plus spécifiquement l'effet des lipopeptides sur la membrane plasmique des racines de blé, en évaluant leur impact sur la viabilité cellulaire et l'intégrité membranaire.

Globalement, cette recherche contribuera non seulement à mieux comprendre les relations entre la structure des lipopeptides et leur effet éliciteur, mais permettra aussi d'élargir la compréhension des mécanismes de défense des plantes.

3. Matériel et méthode

3.1. Culture de plantes

3.1.1. Culture en boite de Pétri

Les graines de *T. aestivum* (fournies par la professeure Caroline De Clerck de l'université de Gembloux agrobio-tech) sont stérilisées en surface avec une solution éthanol (VWR®) à 75% pendant deux minutes et avec une solution de javel (LODA) à 5° pendant six minutes, puis rincées trois fois avec de l'eau stérile.

Ensuite, les graines sont placées verticalement avec la brosse vers le haut, le germe vers le bas et la face ventrale (sillon) sur les boites de pétri (**Figure 8**) contenant ½ de Murashige-Skoog (MS ; M0222, Duchefa Biochimie), 1% (m/v) de D-sucrose (Fisher Bioreagents), 1% (m/v) d'agarose (Promega) et 0,0468% (m/v) de tampon MES (Sigma) à pH=5,8. Les boites de pétri sont ensuite légèrement inclinées afin de bénéficier du géotropisme.

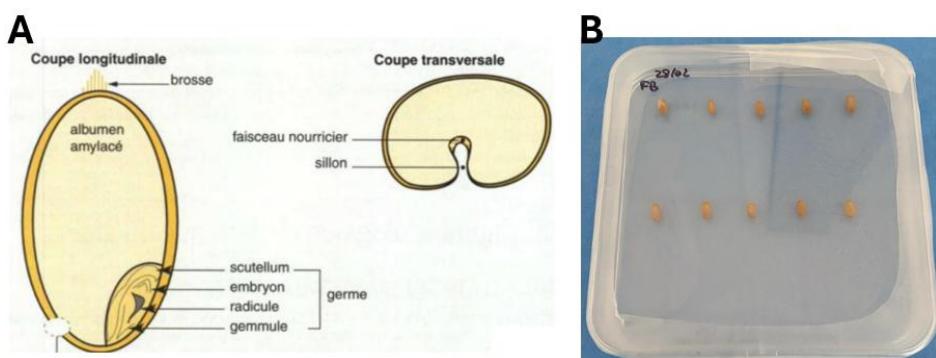


Figure 8 : (A) Coupe longitudinale et transversale d'un grain de blé⁷⁴, (B) Disposition des grains de blé dans la boîte de Petri.

3.1.2. Culture en terre

Le terreau universel (Central Park®), est d'abord congelé à -20°C afin de tuer les potentiels œufs d'insectes présents. Les graines de *T. aestivum* sont directement placées verticalement avec la brosse vers le haut dans des pots en plastique de 6x7x7cm avec le terreau humidifié. Les pots sont placés dans une chambre de culture à 19°C⁷⁵, ventilée et avec une photopériode de 16h/8h⁵⁶ avec une intensité lumineuse de 120 µmol/m²/s.

3.2. Détection des espèces réactives de l'oxygène

3.2.1. Préparations des concentrations des lipopeptides

Deux concentrations de chaque lipopeptide sont testées (**Tableau I**) : sous forme monomérique, c'est-à-dire proche de la CMC et sous forme micellaire, au-dessus de la CMC. Ainsi la surfactine et la mycosubtiline dont la CMC est de 10 µM, sont testées à 10 µM et 50 µM. La fengycine, dont la CMC est de 0,5 µM, est testée à 0,5 µM et 10 µM⁷⁶. La surfactine est solubilisée dans l'éthanol et puis diluée dans de l'eau milliQ à la concentration souhaitée de manière à ce que la concentration finale en éthanol

soit de 0,1% (v/v), tandis que la fengycine et mycosubtiline sont solubilisées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, VWR®) et diluées dans de l'eau afin que la concentration finale en DMSO soit de 0,1% (v/v).

Tableau 1: Concentrations de lipopeptides utilisées dans ce travail, exprimées en micro-molaire, dans une solution aqueuse contenant 0,1% (v/v) du solvant de solubilisation.

Lipopeptides	Forme monomérique (μM)	Forme micellaire (μM)
Surfactine	10	50
Mycosubtiline	10	50
Fengycine	0,5	10

3.2.2. Espèces réactives de l'oxygène apoplastiques racinaires

Après trois jours de croissance selon le point 3.1.1, les deux tiers de la racine centrale de chaque graine sont coupés et placés dans un puits d'une microplaquette blanche (Greiner Bio-One™, lumitrac) contenant 200 μL du milieu MS (comme au point 3.1.1.) autoclavé sans agarose, ce qui permet aux racines découpées de reposer dans les meilleures conditions possibles. La microplaquette est laissée 12 heures à l'obscurité afin d'éviter de mesurer le stress produit par la découpe.

Le lendemain matin, le milieu MS sans agarose est remplacé par de l'eau milliQ avec une solution de peroxydase de raifort (HRP, 1 $\mu\text{g/mL}$, Sigma) et de luminol (L-O12, 20 μM , Sigma). Une analyse de luminescence au Tecan (Spark®) est ensuite réalisée pendant dix minutes afin de vérifier que le signal est stable (shaking : 20 secondes ; double orbitale ; kinetic loop : 10 :01 ; 1 :00, luminescence 1000 ms).

Une fois le signal stable, les différents traitements (**Tableau 1**) et le témoin positif (flagelline, 11 μM , GenScript), ainsi que les blancs respectifs sont ajoutés et une seconde analyse de luminescence est effectuée, cette fois-ci pendant une heure.

Les puits ayant une moyenne inférieure à une intensité de 35 count/s, sont discriminés. Cette valeur été estimée grâce à différents essais avec la flagelline (*Annexe 1*).

3.2.3. Espèces réactives de l'oxygène intracellulaires racinaires

Les conditions de croissance des racines, ainsi que le repos à l'obscurité et dans du milieu MS sans agarose, sont similaires au point 3.2.2. Cependant, les racines sont disposées dans une microplaquette noire (Greiner Bio-One™) car les ROS_{intracellular} se mesurent à l'aide de la fluorescence.

Une fois le milieu MS retiré, de l'eau milliQ et la sonde, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, 2,5 μM , Acros organics) sont ajoutées aux racines et laissées à l'obscurité pendant 20 minutes. Ensuite, la solution est retirée et les racines sont rincées avec une solution tampon phosphate (PBS, Cytiva). Enfin, de l'eau milliQ, les traitements (**Tableau 1**) et le témoin positif sont ajoutés.

La fluorescence est mesurée à l'aide du Tecan en cinétique d'une heure (une mesure toutes les 4 minutes) par le haut (longueur d'onde d'excitation de 465 nm, longueur d'onde d'émission de 535 nm, gain 70,

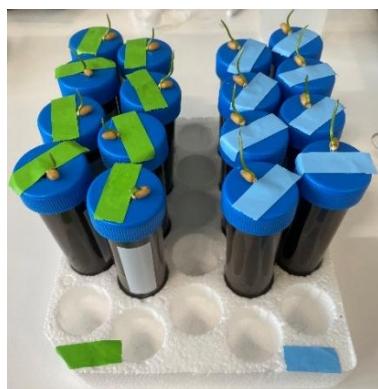
temps d'intégration 40 µs, temps de stabilisation 200 ms). Afin de couvrir toute la surface du puits, neuf mesures par puits sont prises par le Tecan.

3.2.4. Détection des espèces réactives de l'oxygène apoplastiques foliaires

La détection des ROS_{apo} de feuilles est réalisée sur deux disques de feuilles de deux mm placés dans les puits de la microplaqué blanche contenant 150 µL d'eau milliQ. Chaque puits d'un même traitement correspond à une plante différente en veillant à utiliser systématiquement la même feuille. La microplaqué est ensuite placée à l'obscurité pendant 12 heures. Le lendemain matin, les étapes sont identiques à celles décrites au point 3.2.2., hormis le fait que la phase de stabilisation à la suite de l'ajout de la solution mix est de 4 heures.

3.3. Test d'activation du système immunitaire systémique

Les graines sont mises en culture en boîte de pétri selon le point 3.1.1, pendant quatre jours avant d'être transférées dans des tubes à essais brun de 50 mL contenant une solution nutritive (0,05% de FloraBloom®, 0,05% de FloraGro®, 0,05% de FloraMicro®) (**Figure 9**). Les plantes sont cultivées dans cette solution pendant neuf jours à 22°C et avec une luminosité de 120 µmol/m²/s. La solution nutritive est remplacée par 50 mL de solution nutritive contenant les lipopeptides sous forme monomérique, soit 10 µM pour la surfactine et la mycosubtiline et 0,5 µM pour la fengycine ou avec une solution mock avec du DMSO (0,1%). Cette nouvelle solution est laissée 24 heures avant que deux disques de deux millimètres soient percés dans la première feuille et placés dans une microplaqué blanche à l'obscurité toute la nuit. Le reste du protocole se déroule comme la détection des ROS_{apo} des feuilles (point 3.2.4), hormis le fait que ce sont 2 µL de chitine (Sigma) qui sont ajoutés après la phase de repos de 4 heures après l'ajout du mix.



*Figure 9 : Illustration de la croissance de *T. aestivum* en hydroponie*

3.4. Protoplastes racinaires

3.4.1. Génération de protoplastes racinaires

Après 10 jours de culture, les racines (**Figure 10**) sont découpées en sections de 2-4 mm, et placées dans une solution enzymatique (SE) sous faible agitation, à 28°C dans l'obscurité pendant 4 heures. Cette SE est composée de mannitol (400 mM, Sigma), chlorure de potassium (KCl, 20 mM, VWR), chlorure de calcium (CaCl₂, 10 mM), albumine sérique bovine (BSA, 0,1%, Sigma), cellulase (1,5%, Duchefa Biochimie) et macroenzyme (0,4%, Duchefa Biochimie) dans 5 mL de tampon 2-(N-morpholino)éthanesulfonique à pH 5,7 (MES, Sigma).

Après la digestion enzymatique, la suspension est filtrée à l'aide d'un filtre (40 µM, Corning®), puis rincée avec 5 mL d'une solution (S1) contenant du chlorure de sodium (NaCl, 154 mM, Merck), KCl (5 mM) et CaCl₂ (150 mM). Le tube est centrifugé (Heraeus multifuge 3 S-R) pendant 5 minutes à 200g avec une faible accélération et décélération, le surnageant est éliminé et 5 mL de S1 sont ajoutés. Le cycle de centrifugation est répété une seconde fois. Après élimination du second surnageant, 5 mL d'une autre solution (WI) composée de mannitol (500 mM), KCl (20 mM) et CaCl₂ (2 mM) sont ajoutés, suivis d'une dernière centrifugation selon les mêmes conditions. Enfin, les protoplastes obtenus sont analysés au microscope (Nikon IT2-E avec un objectif ×20/0.45 NA S Plan Fluor Nikon, Switzerland et une caméra monochrome Nikon DS-Qi2, les images sont prises avec Ti2 Illuminator-DIA, temps d'exposition 200 ms) pour évaluer la viabilité.



Figure 10 : Disposition des racines pour la génération de protoplastes dans la boîte de Petri (croissance des racines après 6 jours).

3.4.2. Test de viabilité et de perméabilisation membranaire des protoplastes racinaires

La viabilité des protoplastes racinaires est évaluée à l'aide de la fluorescéine diacétate (FDA, 5 µg/mL, Sigma®). Pour chaque condition, 45 µL de la solution de protoplastes sont placés dans une microplaquette noire avec 5 µL des traitements sous leur forme monomérique, ainsi que le contrôle (mock_dmso, 0,1%) et un blanc (protoplastes + FDA), sont ajoutés. Les protoplastes sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante avec les lipopeptides. Ensuite, le FDA est incubé pendant 10 minutes avec les

protoplastes à l'obscurité. Enfin, cinq images par condition sont capturées au microscope, à différents emplacements dans le puits, en fluorescence et en lumière blanche.

Concernant la perméabilisation membranaire face aux lipopeptides, 2 µL d'iodure de propidium (PI, Sigma, 100 µg/mL) sont ajoutés à 50µL (45 µL protoplastes et 5 µL lipopeptides). Les mêmes concentrations de lipopeptides et de contrôle sont testées, ainsi qu'un témoin positif, le triton (0,1%, Sigma).

3.5. Statistiques

3.5.1. Traitement statistique pour les espèces réactives extracellulaires

Les analyses statistiques sont réalisées avec Rstudio (codes en *Annexe 4*). Les valeurs aberrantes sont identifiées sur base de l'aire sous la courbe (AUC) calculée pour chaque puits. Pour chaque traitement, la méthode interquartile (IQR) est appliquée avec un seuil de trois (3xIQR), permettant de conserver la variabilité naturelle des données biologiques tout en éliminant les valeurs extrêmement atypiques. Une fois les puits aberrants éliminés, les données sont analysées à l'aide de modèles linéaires mixtes avec le traitement comme facteur fixe et la plaque comme effet aléatoire. Des comparaisons de moyennes entre traitements sont réalisées grâce à la fonction emmeans, permettant d'identifier les différences significatives entre modalités.

3.5.2. Traitement statistique pour les espèces réactives intracellulaires

Les analyses statistiques sont également réalisées avec Rstudio (code en *Annexe 7*). Les valeurs aberrantes sont identifiées à partir de la médiane des intensités par puits, en appliquant la méthode IQR. Un facteur de trois est utilisé pour les mêmes raisons qu'au point 3.5.1. Après le retrait de ces outliers, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis est réalisé pour comparer les traitements car les conditions d'applications d'une ANOVA ne sont pas respectées (tests de Shapiro-Wilk et de Levene). Enfin, des comparaisons post-hoc sont effectuées à l'aide du test de Dunn avec une correction des p-valeurs pour comparaisons multiples.

3.5.3. Traitement statistique des protoplastes

Les analyses statistiques sont réalisées avec GraphPad Prism (version 8.0.1). Une ANOVA est d'abord réalisée afin de tester l'existence d'une différence significative entre les traitements. Les conditions d'application d'homogénéité des variances sont vérifiées à l'aide des tests de Brown-Forsythe et Bartlett. Lorsque l'ANOVA montre une différence significative entre les groupes (p-valeur<0,05), alors un test post-hoc de Dunnett est appliqué afin de comparer chacun des traitements. Le seuil de signification est fixé à 0,05.

4. Résultats

4.1. Perception des lipopeptides par les tissus racinaires et foliaires du blé

La capacité des lipopeptides à être perçus par les racines ou les feuilles de blé est évaluée par la détection de la production de ROS_{apo} , mesurée par luminescence. La production de $\text{ROS}_{\text{intra}}$ est quant à elle détectée au niveau des racines, par fluorescence. Deux concentrations de chaque lipopeptide sont testées (**Tableau 1**). Ce choix permet d'évaluer l'effet du lipopeptide selon sa forme moléculaire, soit sous forme monomérique (proche de la CMC), soit sous forme micellaire (au-dessus de la CMC).

4.1.1. Espèces réactives de l'oxygène apoplastiques racinaires

Le protocole préalablement établi pour la dicotylédone *A. thaliana*⁵⁵ a été adapté à la monocotylédone *T. aestivum*. Lors de la germination du grain de blé, trois racines se distinguent après trois jours de croissance (la radicule accompagnée de deux racines séminales)⁷⁷ (**Figure 11**), tandis qu'*A. thaliana* ne présente qu'une racine centrale dans les mêmes conditions⁷⁸.



Figure 11 : Racines de *Triticum aestivum* après trois jours de croissance où la radicule (centrale) et les deux racines séminales se distinguent.

Ainsi, la réponse de la radicule seule ou accompagnée d'une ou deux racines séminales, toutes coupées en petits morceaux, a été testée à la suite d'un traitement avec la flagelline. Ces racines ont également été pesées afin d'évaluer l'impact de la densité de racines sur la production de ROS_{apo} . Après l'application de la flagelline, un pic caractéristique est observé entre 10 et 15 minutes suivi d'un retour à l'intensité de base après une heure^{55,79}. La **Figure 12** montre qu'aucune augmentation de la luminescence en fonction de la densité racinaire n'a été observée en raison de la courbe de tendance globalement horizontale. Cependant, malgré l'absence d'effet de densité racinaire, la flagelline induit une réponse de ROS_{apo} lorsque la radicule seule ou avec une racine séminale sont utilisées, contrairement à trois racines (**Figure 13**). Le signal étant légèrement plus élevé avec seulement la radicule, cette condition a été choisie pour les analyses ultérieures.

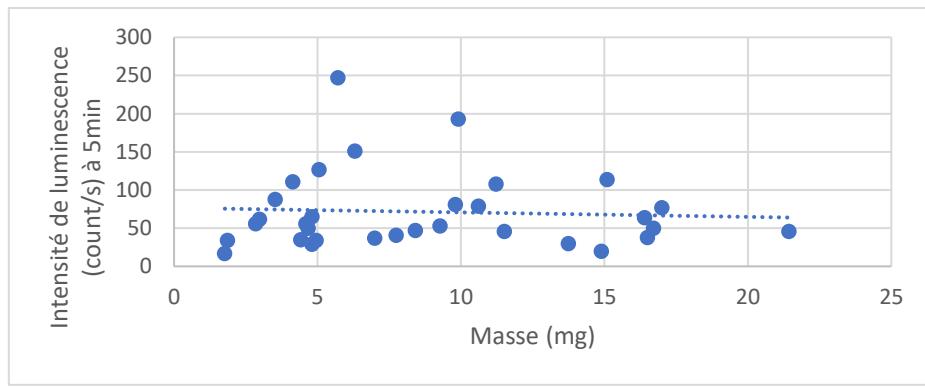


Figure 12: Intensité de luminescence après 5 minutes de traitement avec la flagelline en fonction de la masse des racines ($n=32$). La droite en pointillée représente la courbe de tendance de ces points.

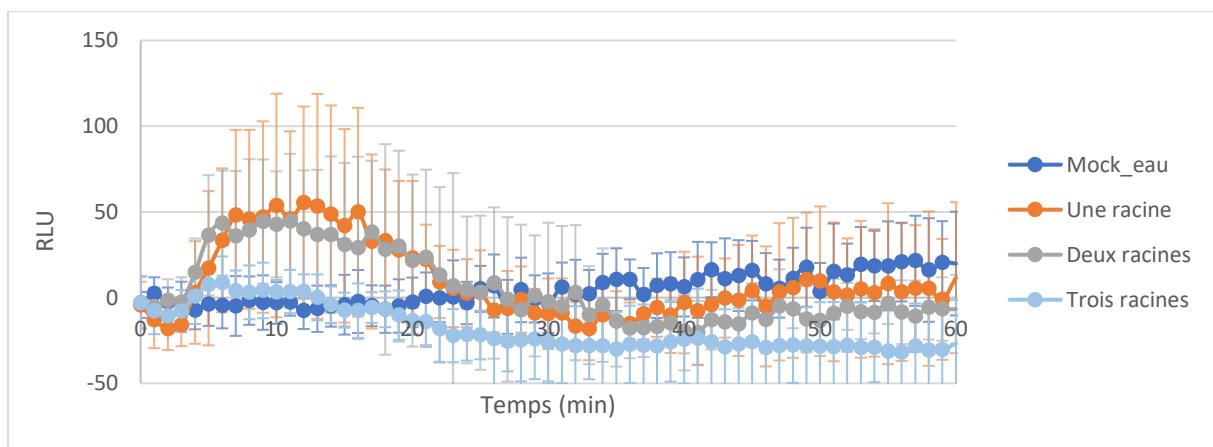


Figure 13: Intensité relative de luminescence obtenue après l'ajout de la flagelline avec une racine (la radicule), 2 racines (la radicule et une racine séminale), ou 3 racines (la radicule et les deux racines séminales) et sans ajout de flagelline (eau et la radicule) ($n=32$, 8 puits par condition, une répétition indépendante). Avant l'application de la flagelline (témoin positif), une analyse des racines avec le mix constitué du L-O12 et HRP est réalisée pendant 10 minutes afin de s'assurer de ne pas mesurer la réaction des racines avec ce mix. La dernière valeur d'intensité obtenue après ces 10 minutes de stabilité est retirée aux valeurs obtenues après l'ajout de la flagelline.

Après avoir mis au point le protocole pour le blé, l'effet direct des trois familles de lipopeptides a été évalué. La **Figure 14** montre que la fengycine à 0,5 μM et 10 μM dans 0,1 % de DMSO et la surfactine à 10 μM et 50 μM dans 0,1 % d'éthanol ne provoquent pas de production de ROS_{apo} racinaires significativement différente de leur contrôle respectif. En revanche, la mycosubtiline sous sa forme monomérique (10 μM) induit une production de ROS_{apo} significative en comparaison de son contrôle, marqué par un pic entre 10 et 20 minutes, tandis qu'elle ne provoque pas de réponse marquée sous sa forme micellaire (50 μM). La réactivité du système a été confirmée par la production rapide et intense de ROS_{apo} entre 5 et 15 minutes à la suite du traitement avec la flagelline.

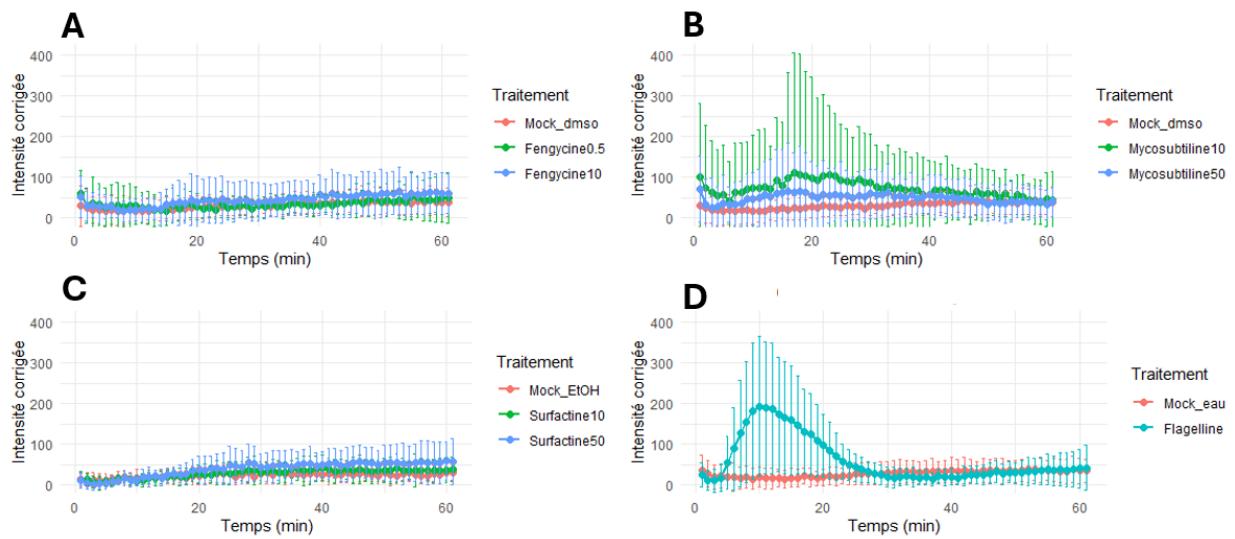


Figure 14: Intensité de luminescence corrigée (le bruit de fond a été retiré) en fonction du temps représentant la production de ROS_{apo} racinaires. (A) effet de la fengycine à 0,5 μM et 10 μM , $n_{\text{fengycine}0.5/10}=23$, $n_{\text{mock_dms0}}=35$. (B) effet de la mycosubtiline à 10 μM et 50 μM , $n_{\text{mycosubtiline}10}=19$, $n_{\text{mycosubtiline}50}=21$, $n_{\text{mock_dms0}}=35$. (C) effet de la surfactine à 10 μM et 50 μM , $n_{\text{surfactine}10}=22$, $n_{\text{surfactine}50}=21$, $n_{\text{mock_EtOH}}=22$. (D) effet du témoin positif, la flagelline, $n_{\text{flagelline}}=62$, $n_{\text{mock_eau}}=55$. Ces courbes proviennent de trois répétitions expérimentales indépendantes, avec un nombre total de puits par conditions (n) variant selon les traitements (chaque répétition comprenant 8 puits, certains ayant été exclus car ils donnaient des valeurs aberrantes).

La **Figure 15** présente sous forme de boxplots, l’AUC obtenue suite aux intensités de luminescence de la **Figure 14**. Cette représentation confirme les résultats obtenus pour la mycosubtiline à 10 µM qui montre une augmentation significative de la production de ROS_{apo} racinaires par rapport au DMSO (p-valeur = 0,0013). La flagelline, utilisée comme témoin positif, provoque également une réponse significative par rapport à l’eau (p-valeur <0,05). Les autres traitements, incluant la fengycine, la surfactine sous leurs deux formes et la mycosubtiline sous sa forme micellaire, ne montrent pas de différence significative avec leur contrôle.

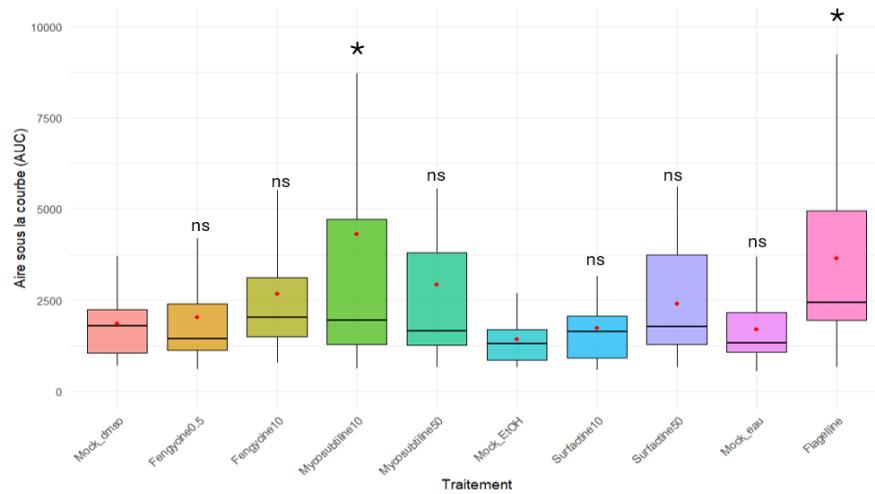


Figure 15 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS_{apo} racinaires mesurée par luminescence après application de lipopeptides (surfactine, fengycine et mycosubtiline) sous forme monomérique et micellaire, comparée aux témoins (mock_dmso, mock_EtOH, mock_eau). Chaque boîte à moustache représente l’étendue interquartile, la médiane (trait horizontal), les valeurs extrêmes, et les moyennes (points rouges). Les astérisques représentent les différences significatives (, p<0.05) et « ns » représente les traitements non significatifs.*

4.1.2. Espèces réactives de l'oxygène apoplastiques foliaires

La production de ROS_{apo} sur feuilles a été mesurée de la même manière que pour les racines. Néanmoins, il a été nécessaire d'adapter le temps de repos après l'ajout du mix (L-O12 et HRP) de 10 minutes à 4h afin d'obtenir un signal de luminescence stable avant l'ajout des traitements. La **Figure 16** montre que la fengycine et la mycosubtiline aux deux concentrations ne déclenchent aucune production de ROS_{apo} significative car les courbes sont similaires à celle du contrôle DMSO. De même, les deux concentrations de surfactine suivent la cinétique de leur contrôle d'éthanol avec une augmentation de l'intensité de luminescence au cours du temps. Cette tendance commune suggère un effet du solvant. La réactivité du système est cependant bien confirmée par la production de ROS_{apo} foliaire entre 5 et 15 min à la suite du traitement avec la flagelline.

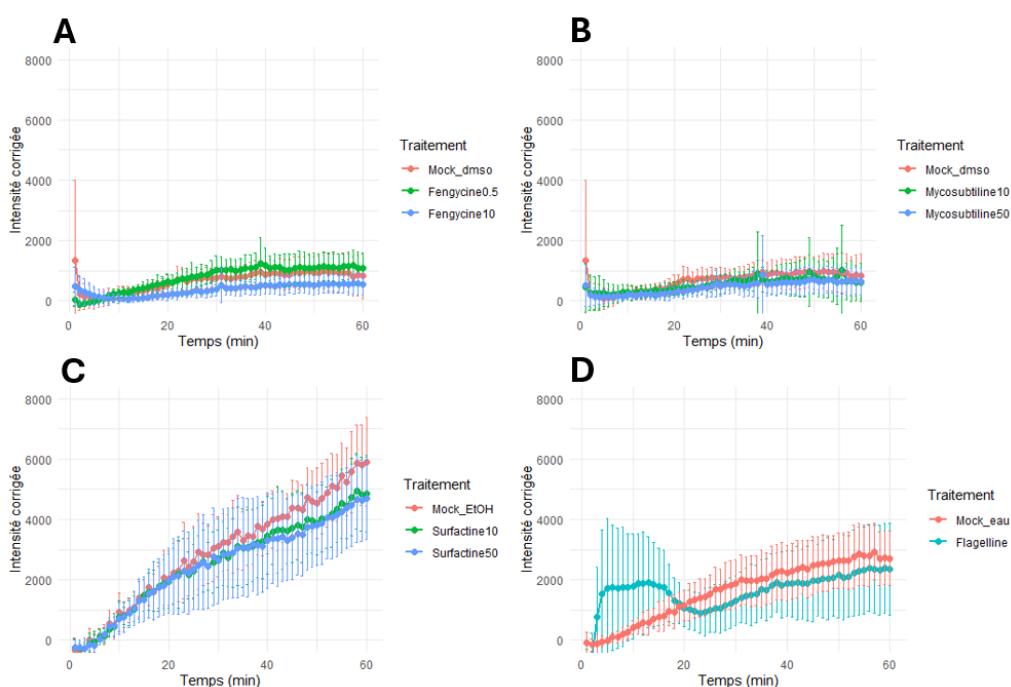


Figure 16 : Intensité de luminescence corrigée (le bruit de fond a été retiré) en fonction du temps représentant la production de ROS_{apo} sur feuilles. (A) effet de la fengycine à 0,5 μM et 10 μM , $n_{\text{fengycine}0.5/10}=23$, $n_{\text{mock_dmso}}=23$. (B) effet de la mycosubtiline à 10 μM et 50 μM , $n_{\text{mycosubtiline}10/50}=22$, $n_{\text{mock_dmso}}=23$. (C) effet de la surfactine à 10 μM et 50 μM , $n_{\text{surfactine}10/50}=23$, $n_{\text{mock_EtOH}}=21$. (D) effet du témoin positif, la flagelline, $n_{\text{flagelline}}=45$, $n_{\text{mock_eau}}=31$. Ces courbes proviennent de trois répétitions expérimentales indépendantes, avec un nombre total de puits par conditions (n) variant selon les traitements (chaque répétition comprenant 8 puits, certains ayant été exclus car donnaient des valeurs aberrantes).

Bien que la flagelline ait induit un pic caractéristique dans la **Figure 16**, les analyses statistiques dans la **Figure 17** ne révèlent pas de différence significative entre la flagelline et son contrôle (mock_eau). La fengycine et la mycosubtiline, à leurs deux concentrations, ne montrent également pas de différence significative avec leur contrôle DMSO. La surfactine aux deux concentrations provoque une réponse significativement inférieure à l'éthanol. Or, ce dernier induit lui-même une production significative de ROS_{apo} par rapport à l'eau (p-valeur <0,001), suggérant que l'effet du solvant éthanol masque la réponse réelle de la surfactine.

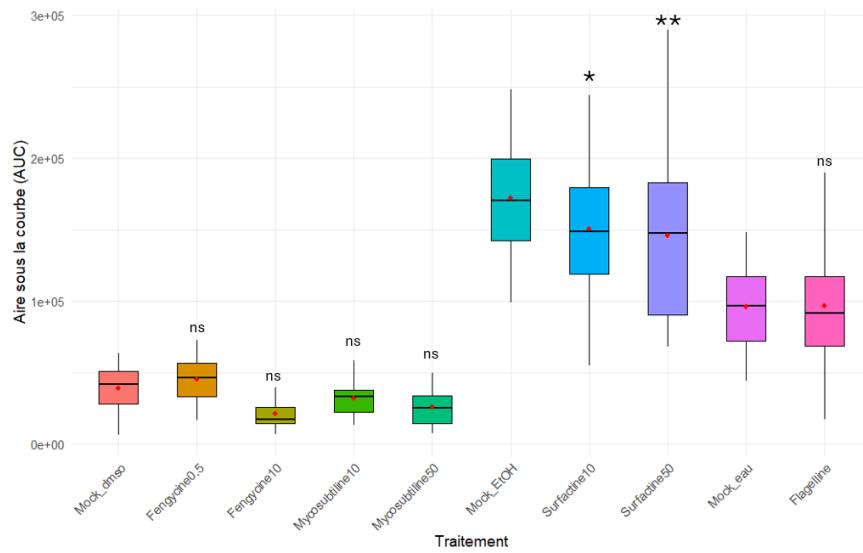


Figure 17 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS_{apo} foliaires mesurée par luminescence après application de lipopeptides (surfactine, fengycine et mycosubtiline) sous leur forme monomérique et micellaire, comparée aux témoins (mock_dmso, mock_EtOH, mock_eau). Chaque boîte à moustache représente l'étendue interquartile, la médiane (trait horizontal), les valeurs extrêmes, et les moyennes (points rouges). Les astérisques représentent les différences significatives (, p<0.05 ; **, p<0.01) et « ns » représente les traitements non significatifs. Chaque traitement est comparé statistiquement à son témoin spécifique.*

4.1.3. Espèces réactives de l'oxygène intracellulaires sur les racines

L'évaluation de la production de ROS_{intra} racinaires sous l'effet de différents traitements (**Figure 18**) n'a pas pu être validée par un contrôle positif à cause de l'absence de réponse de la flagelline et la chitine. En effet, ces deux éliciteurs ne provoquent pas de ROS_{intra} car leur signal est semblable à l'eau. De même, la surfactine aux deux concentrations ne se distingue pas du signal obtenu avec le mock éthanol (pas de différence significative). En revanche, les droites des deux concentrations de mycosubtiline et fengycine sont inférieures au DMSO. Un effet significatif négatif de la fengycine à 10 µM par rapport au mock DMSO (p-valeur = 0,026) est observé. La mycosubtiline à 50 µM a également un effet très négativement significatif par rapport au mock DMSO (p-valeur<0,001).

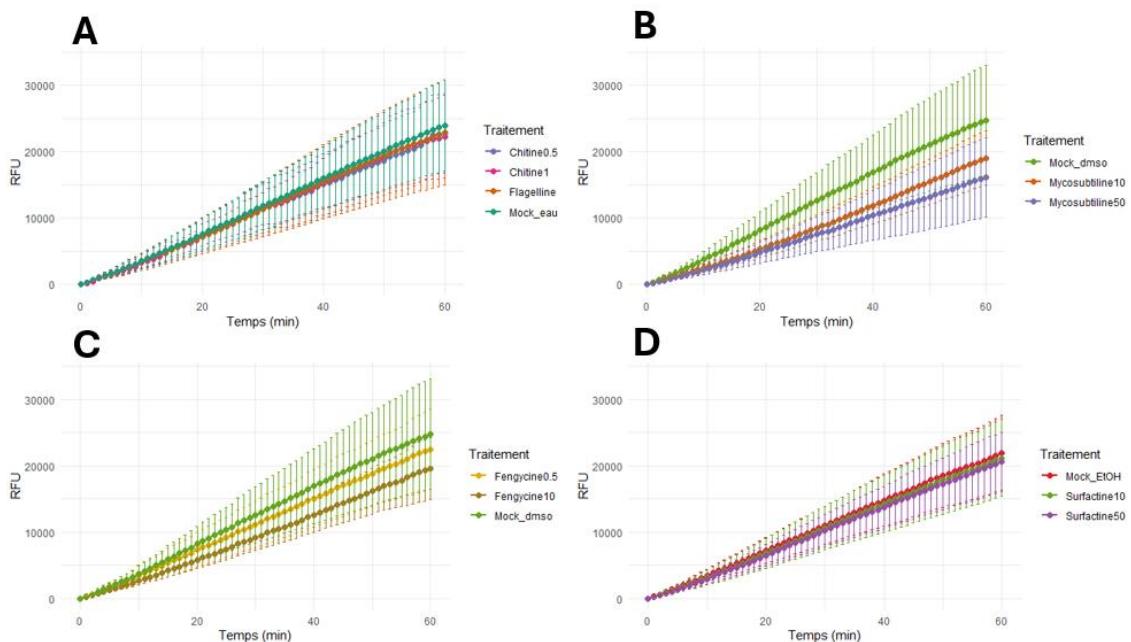
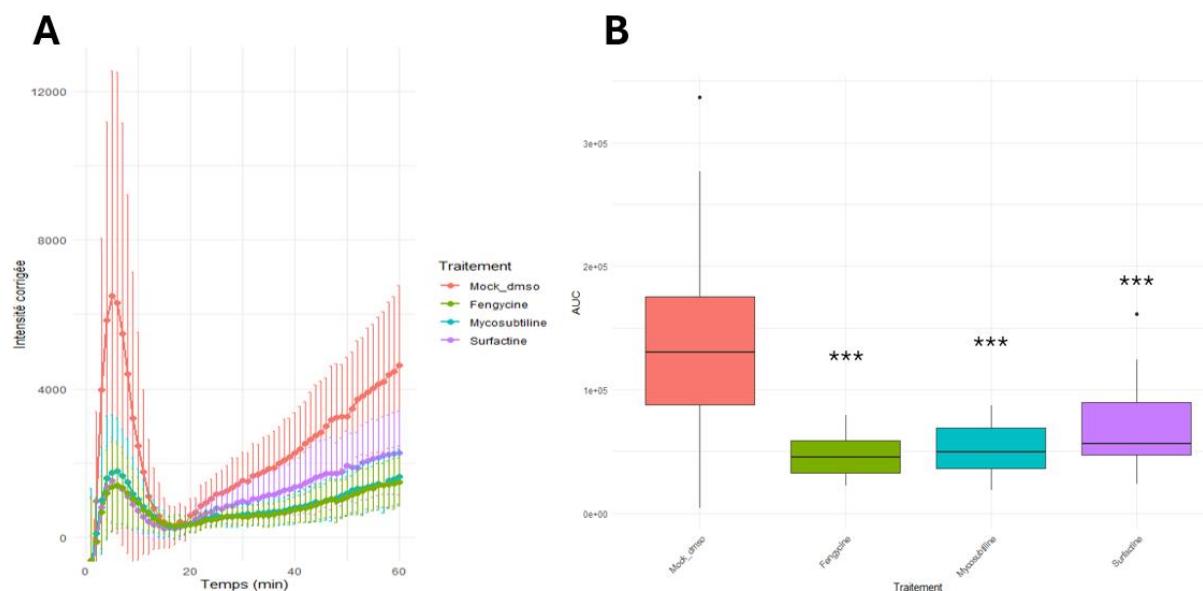


Figure 18 : Production au cours du temps de ROS intracellulaire produit par les racines suite à l'application de différents traitements. Les intensités de fluorescence relative (RFU) sont calculées par la soustraction de la première valeur au temps 0. Ces droites sont obtenues à partir de trois répétitions indépendantes où le nombre d'individus (n) varie entre 23 et 24 pour les lipopeptides (seulement deux valeurs extrêmement aberrantes ont été retirées grâce à la méthode IQR). Production de ROS_{intra} suite au traitement de (A) la chitine à deux concentrations ainsi que de la flagelline, (B) la mycosubtiline à 10 µM et 50 µM, (C) la fengycine à 0,5 µM et 10 µM, (D) la surfactine à 10 µM et 50 µM.

4.2. Capacité des lipopeptides à activer l'immunité systémique du blé

Lors de cette expérience, la réponse immunitaire systémique est évaluée en traitant les racines de *T. aestivum* avec différents lipopeptides sous leur forme monomérique pendant 24 heures, puis en mesurant la production de ROS_{apo} dans les feuilles en réponse à l'application de chitine. Le choix de la concentration en lipopeptides repose sur les résultats obtenus précédemment (cf 4.1.1), où la mycosubtiline à 10 µM induisait une production significativement différente de ROS_{apo} racinaires comparée au contrôle DMSO. L'objectif est de déterminer si l'application de lipopeptides au niveau racinaire amplifie les réponses immunitaires précoces dans les parties aériennes, notamment via la production de ROS_{apo}. La **Figure 19** montre que la courbe associée au mock DMSO induit une luminescence supérieure aux lipopeptides. Les racines prétraitées avec la surfactine, la fengycine ou la mycosubtiline induisent une production de ROS_{apo} foliaires en réponse à la chitine significativement plus faible que celle observée avec le contrôle DMSO (p -valeur <0,001).



*Figure 19 : (A) Production au cours du temps de ROS_{apo} foliaires, mesurant la réponse immunitaire systémique suite au traitement des racines avec les lipopeptides et le mock DMSO. L'intensité de luminescence corrigée correspond à la luminescence sans le bruit de fond. Ces courbes sont obtenues à partir de trois répétitions indépendantes où le nombre d'individus varie entre 22 et 24 en fonction du retrait des valeurs extrêmement aberrantes. (B) Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS_{apo} foliaires mesurant la réponse immunitaire systémique suite au traitement des racines avec les lipopeptides. Chaque boîte à moustache représente l'étendue interquartile, la médiane (trait horizontal) et les valeurs extrêmes. Les astérisques représentent les différences hautement significatives par rapport au mock DMSO (***, p <0,01).*

4.3. Effet des lipopeptides sur la viabilité et la perméabilité cellulaires du blé

Afin d'évaluer l'effet des lipopeptides sur la viabilité cellulaire, des protoplastes de *T. aestivum*, permettant d'observer directement l'intégrité des membranes plasmiques, ont été générés à partir de racines. Pour ce faire, deux sondes fluorescentes ont été utilisées, le FDA et le PI. Le FDA signale les cellules vivantes via une fluorescence verte résultant de son hydrolyse par des estérases cytoplasmiques⁸⁰. (*Annexe 10*) Le PI, quant à lui, signale les cellules endommagées en émettant une fluorescence rouge. Ceci est uniquement possible lorsque la membrane de la cellule est altérée; le PI peut ainsi s'intercaler dans l'ADN du noyau⁸¹. (*Annexe 11*) Les lipopeptides sont testés sous leur forme monomérique pour être dans les mêmes conditions que le test d'activation de l'immunité systémique (SIA).

La **Figure 20** montre que les lipopeptides n'impactent pas la viabilité des cellules. En effet, pour l'expérience avec le FDA, il n'y a pas de différence significative entre les différents lipopeptides, le mock DMSO et la solution seule de protoplaste (blanc) (p -valeur = 0,0915). L'expérience avec le PI confirme cette première expérience et montre qu'ils n'ont pas d'effet négatif sur l'intégrité de la MP des cellules car il n'y a de nouveau pas de différence entre le contrôle et les lipopeptides. Le triton, utilisé comme témoin positif, a permis de valider l'expérience vu qu'il impacte négativement l'intégrité des membranes plasmiques de manière très significative (p -valeur < 0,001).

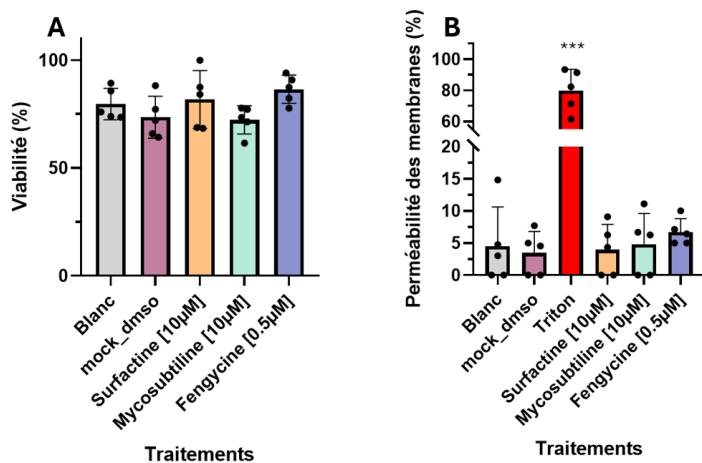


Figure 20 : Viabilité des protoplastes après application des trois familles de lipopeptides. (A) Pourcentage de viabilité des protoplastes suite au traitement par les différents lipopeptides, le DMSO (mock_dmso) ou le blanc (protoplastes seuls), évalué par le test au FDA. (B) Pourcentage de mort cellulaire par perméabilisation des membranes suite au traitement par les différents lipopeptides, le DMSO (mock_dmso), le blanc (protoplastes seuls) ou le témoin positif (triton), évalué au moyen du test avec le PI. Les astérisques représentent la significativité (***, p <0,001). Les données utilisées sont issues d'une expérience où cinq photos par traitement, à des zones différentes dans le puits, ont été capturées.

5. Discussion

5.1. Evaluation des réponses immunitaires précoce du blé face aux lipopeptides

L'effet direct des lipopeptides sur le blé a été évalué grâce à la mesure d'un événement précoce de l'immunité végétale, la production de ROS. Elle est une composante clé de plusieurs voies immunitaires (PTI, ETI et SAR) mais sa production varie selon ces voies. Dans la PTI, la production de ROS_{apo} est généralement rapide et courte. En effet, après application de la flagelline, un éliciteur simulant une attaque bactérienne, un pic est observé entre 10 et 15 minutes, suivi d'un retour à l'intensité de base après une heure^{55,79}. A l'inverse, l'ETI est associée à une production de ROS_{intracellular} intense et prolongée, survenant 1h30 à 3h après l'inoculation avec une bactérie avirulente et pouvant durer 24h. Un second burst de ROS_{apo} peut être observé avec la flagelline, mais à des niveaux inférieurs à ceux induits par ETI. Un autre éliciteur bactérien, les lipopolysaccharides, peut également induire un second burst, reproduisant les caractéristiques obtenues par l'ETI⁷⁹. Ainsi, la première production de ROS_{apo} est associée aux RBOHs présents dans la MP et la seconde est liée à l'ETI et est produite principalement par les chloroplastes. Cette réponse liée à l'ETI s'accompagne souvent d'une HR, menant à une mort cellulaire, et d'une augmentation de l'expression de gènes de défense. Ce sont les stromules, fins prolongements des chloroplastes, qui transmettent le signal obtenu par les ROS_{intracellular} au noyau⁸².

Dans ce travail, les ROS_{apo} se mesurent grâce à la luminescence générée par le luminol (L-O12) en présence de peroxydase (HRP). Cette réaction repose sur l'oxydation du luminol catalysé par la HRP en présence de H₂O₂ qui produit un intermédiaire instable qui émet de la lumière^{83,84}. Seule la mycosubtiline à 10 µM a induit une production de ROS_{apo} dans les racines, tandis qu'aucun lipopeptide n'a provoqué de production de ROS_{apo} sur les feuilles. Cette observation rejoint les résultats d'une étude dans laquelle les auteurs n'ont pas observé de production de ROS_{apo} dans les feuilles de blé, mais bien une production dans les épis de blé, en réponse à la chitine⁸⁵. Cela suggère que la production de ROS_{apo} peut varier selon le tissu étudié, ce qui pourrait expliquer pourquoi les racines perçoivent la mycosubtiline, contrairement aux feuilles. Cependant, malgré l'absence de production de ROS_{apo} foliaires, ces auteurs ont trouvé, dans la même étude, que l'application de la chitine activait l'expression de gènes de défense dans les feuilles⁸⁵. Ainsi, les lipopeptides pourraient induire une réponse similaire au niveau transcriptionnel. En effet, des études ont été réalisées sur l'effet de la fengycine (70 µM) et de la mycosubtiline (50 µM) sur les feuilles de blé et ont toutes deux montré que ces deux lipopeptides augmentaient l'expression de gènes de défense^{65,69}. Par ailleurs, une autre étude sur le blé a démontré que la surfactine (10 µM) appliquée sur les feuilles, induisait l'expression de gènes de défense codant pour des régulateurs des ROS, des gènes liés aux phytohormones de défense (SA, JA, ET), ou encore des composés antimicrobiens⁴⁶. Il semblerait que la production de ROS_{apo} varie selon les espèces. Par exemple, chez l'orge, une autre monocotylédone, la chitine induit une production de ROS_{apo} rapide et transitoire dans les feuilles, correspondant au profil classique obtenu chez *A. thaliana*⁸⁵. Si les lipopeptides étaient perçus par la plante comme PGPR, une accumulation de ROS_{apo} dans les feuilles serait attendue. Une étude sur

le blé⁸⁶ a montré que les activités PGPR de *Bacillus* sp. ne dépendaient pas du type de lipopeptide produit. En revanche, la nature du lipopeptide influençait fortement leur effet sur la viabilité des pucerons se nourrissant des feuilles traitées, avec la surfactine et la fengycine qui avaient un impact biocide plus marqué que l'iturine⁸⁶. Ainsi, il serait intéressant d'effectuer une analyse transcriptomique des racines et feuilles de blé pour mieux comprendre quels gènes sont impliqués dans la réponse à la flagelline et aux différents lipopeptides, comparer ces deux tissus, et également déterminer si les lipopeptides activent l'expression de gènes de défense.

La composition lipidique des membranes végétales joue un rôle important dans la perception des molécules exogènes, tels que les lipopeptides (cf point 1.3), ce qui pourrait expliquer la différence entre les racines et les feuilles. En effet, cette composition varie selon les grandes familles végétales, les monocotylédones et les dicotylédones, mais également au sein de ces familles et des différents tissus d'une même plante⁸⁷. Par exemple, chez *A. thaliana*, une dicotylédone, la mycosubtiline (10 µM) induit une production de ROS_{apo} sur feuilles ainsi que d'autres événements précoce de l'immunité (dépôt de callose, expression de gènes de défense, cascade MAPK)⁸⁸, alors que dans ce travail aucune production de ROS_{apo} sur les feuilles de blé n'a été observée. Ces résultats illustrent que la perception des lipopeptides varie selon l'espèce et suggèrent l'importance de la nature des membranes dans la perception des lipopeptides. De plus, certaines études suggèrent que l'état biophysique des membranes, notamment leur fluidité ou l'organisation locale des lipides en microdomaines, peut moduler la capacité des lipopeptides à s'insérer ou interagir avec la bicouche lipidique, influençant leur activité biologique. Ces mécanismes dépendent souvent de la proportion de lipopeptides par rapport aux lipides membranaires, ce qui détermine s'ils agissent comme des simples perturbateurs ou s'ils induisent une perméabilisation plus marquée. Ainsi, la reconnaissance des lipopeptides ne repose pas uniquement sur la composition lipidique mais aussi sur l'architecture et la dynamique des membranes végétales⁵³. Dans ce contexte, il semble pertinent de réaliser une étude biophysique comparative des membranes des racines et des feuilles du blé, afin d'en caractériser l'insertion des lipopeptides.

Il est aussi possible que la production de ROS_{apo} par les lipopeptides appliqués sur les feuilles soit minimisée à cause de la couche cireuse hydrophobe à leur surface. Les analyses de ROS_{apo} se réalisent sur les disques de feuilles, où la coupure crée des brèches dans cette barrière, facilitant la pénétration des composés. Dans un article étudiant les lipopeptides comme agent de biocontrôle contre *Z. tritici*, les lipopeptides sont suspendus dans du tween 20 (0,05%) qui permet d'augmenter la perméabilité et la répartition des lipopeptides sur les feuilles. De plus, lorsqu'elle est combinée à la mycosubtiline, la surfactine agit comme un surfactant, améliorant la pénétration, la rétention et le recouvrement foliaire de la mycosubtiline⁵⁶. Ainsi, l'ajout de tween 20 ou de surfactants naturels comme la surfactine pourrait constituer une stratégie intéressante pour améliorer l'efficacité des lipopeptides.

Par ailleurs, l'association de différents lipopeptides entre eux constitue une autre stratégie prometteuse pour renforcer leur efficacité. En effet, plusieurs études ont mis en évidence des effets synergiques entre différentes familles de lipopeptides. Dans l'étude mentionnée ci-dessus, la combinaison de la surfactine à la mycosubtiline renforçait leur activité antifongique⁵⁶. De plus, une autre étude portant sur un champignon affectant le pommier, *Venturia inaequalis*, a également mis en évidence un effet synergique entre les lipopeptides, avec une réduction significative de la maladie grâce aux mélanges fengycine/surfactine et mycosubtiline/surfactine⁷². Une autre étude a démontré qu'en association avec l'iturine, la fengycine est capable d'induire l'ISR du riz face à un champignon pathogène, *Pyricularia oryzae*⁶⁶. De plus, cette association surfactine/fengycine active chez la tomate et le pois, les enzymes de la voie des lipoxygénases, impliquée dans la biosynthèse de JA, une hormone centrale dans la régulation de l'ISR⁵⁰. Ces résultats suggèrent qu'il serait intéressant d'explorer l'efficacité de telles combinaisons de lipopeptides afin de déterminer si leur action synergique permet une induction plus marquée des réponses de défense, notamment via la production de ROS_{apo}.

Dans ce travail, l'absence de production de ROS_{apo} suite à l'application de la fengycine pourrait être expliquée par les concentrations utilisées. Une étude a montré qu'à 70 µM, la fengycine provoquait une accumulation de callose et une augmentation de H₂O₂ dans les feuilles de blé⁶⁵. Toutefois, dans cette étude, la détection de H₂O₂ se réalise avec un colorant (DAB, 3,3'-diaminobenzidine) qui reflète principalement les ROS_{apo}, mais peut également inclure une composante intracellulaire, notamment dans les tissus endommagés en raison du temps d'incubation prolongé (48h)⁶⁵. Il serait donc pertinent de réaliser de nouveaux essais avec des concentrations en fengycine plus élevées que celles choisies dans ce travail. Par ailleurs, il serait judicieux d'analyser les autres événements précoce de l'immunité des plantes comme l'accumulation de callose ou les influx de calcium. Ces derniers ont un rôle clé dans la régulation de la production de ROS⁸⁹, soulignant l'intérêt de les étudier lorsqu'ils sont induits par les différents lipopeptides afin de mieux comprendre leurs effets.

L'expérience d'activation de l'immunité systémique (SIA) a pour objectif de déterminer si un traitement appliqué aux racines améliore la tolérance de la plante à un stress ultérieur au niveau des feuilles⁹⁰. Les racines sont immergées dans des solutions contenant les lipopeptides pendant 24 heures et la production de ROS_{apo} foliaires est mesurée après l'application de la chitine, mimant une attaque fongique. Dans ce travail, aucun effet de priming n'a été observé. En effet, ce sont les racines prétraitées par le DMSO qui ont permis une production de ROS_{apo} plus importante au niveau des feuilles contrairement aux racines prétraitées aux lipopeptides. Les trois lipopeptides sous forme monomérique, réduisent significativement la production de ROS_{apo} par rapport au mock DMSO. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que les lipopeptides augmentent l'activité d'enzymes antioxydantes. En effet, une étude a montré qu'une préexposition à la sécheresse permettait d'atténuer les effets d'une sécheresse sévère ultérieure. Cette amélioration de tolérance au stress a été associée à des modifications de l'expression génétique, notamment via une augmentation des gènes codant pour des enzymes

antioxydantes contribuant à une meilleure gestion des ROS⁹⁰. De plus, une autre étude sur le priming du blé à la mycosubtiline (100 µM) a montré qu'elle induisait des modifications génétiques, notamment via une modification des histones qui ont un rôle dans la mémorisation du stress, via une surexpression de gènes de défense liés à la SAR, et via l'activation des gènes d'aquaporines qui régulent le transport de H₂O₂ au travers de la MP⁶⁹. Ainsi, il serait également pertinent d'analyser les modifications génétiques au niveau des feuilles après traitement racinaire au moyen d'une analyse transcriptomique.

Il convient toutefois de souligner que les résultats des tests SIA doivent être interprétés avec prudence car la reproductibilité s'est révélée aléatoire malgré des conditions expérimentales identiques entre répliques. Il a été constaté que des variations importantes dans les valeurs mesurées survenaient lorsque la température du lecteur de plaque (Tecan) augmentait, probablement en raison de fortes chaleurs. Cette hypothèse est en accord avec les études qui n'ont pas réussi à obtenir des résultats cohérents après l'application de la chitine sur les feuilles de blé⁸⁵, ou encore celles démontrant l'augmentation de production de ROS avec de hautes températures^{91,92}. Toutefois, ces résultats sont cohérents avec une étude ayant démontré que la surfactine ne suscitait pas d'effet de priming chez le blé, puisqu'aucune hausse de l'expression génique n'a été détectée après traitement ultérieur à l'H₂O₂⁴⁶. A l'inverse, une étude menée sur *A. thaliana* a montré que le prétraitement des racines par la surfactine à 10 µM induisait une production accrue de ROS_{apo} dans les feuilles⁹³. Cette divergence suggère une différence possible dans la perception ou la transduction du signal entre monocotylédones et dicotylédones. Une étude récente a mis en évidence un récepteur (TaCERK1) capable de reconnaître la chitine chez deux variétés (Fielder et Jinmai) de blé⁹⁴. Une identification et une quantification des récepteurs PRRs dans les MP de blé pourraient être intéressantes afin de mieux comprendre leur répartition au sein de la plante et selon la variété utilisée. Une adaptation d'une technique utilisant la microscopie confocale déjà testée sur *A. thaliana* pourrait être réalisée. Cette méthode utilise une protéine fluorescente verte (GFP) pour détecter et localiser les PRRs, en particulier les FLS2 reconnaissant la flagelline, dans les cellules de la couche la plus externe des cotylédons⁹⁵.

5.2. Evaluation de la signalisation intracellulaire du blé en réponse aux lipopeptides

Concernant les ROS_{intra} racinaires, elles sont quantifiées à l'aide d'une sonde DCFH-DA qui fluoresce lorsqu'elle est oxydée en DCF par les ROS_{intra}⁵⁷. Les résultats montrent que la surfactine (10 µM et 50 µM) n'a pas d'effet, mais que la mycosubtiline et la fengycine induisent une production plus faible comparée au mock DMSO. Il a été montré que la surfactine (100 µM) exerce un effet antifongique contre *Fusarium graminearum* via l'accumulation des ROS_{intra} dans le champignon et qui peut être liée à la mort cellulaire. Cette accumulation est associée à une perte de potentiel mitochondrial (différence de charge électrique entre l'intérieur et l'extérieur, nécessaire à la production d'adénosine triphosphate (ATP)), à l'activation d'enzymes impliquées dans la mort cellulaire (métacaspases) et à une condensation de la chromatine⁵⁷. Dans ce travail, la surfactine, testée à une concentration 10 fois plus faible, n'engendre aucune production de ROS_{intra} sur les racines de blé. De plus, les observations faites

sur les protoplastes par microscopie, ne montrent pas de dommage cellulaire. L'absence de production de ROS_{intra} par la surfactine pourrait s'expliquer par la génération d'un stress trop faible. En effet, le signal de ROS_{apo} se propage dans la cellule via des aquaporines, elles-mêmes régulées entre autres par des phosphorylations. Ainsi, si les aquaporines ne s'ouvrent pas, il n'y a pas de transfert de H₂O₂ intracellulaire et donc pas de production de ROS_{intra}⁹⁸. De plus, malgré l'absence de ROS_{intra}, la surfactine pourrait déclencher d'autres voies immunitaires non dépendantes des ROS. Par exemple, une étude sur la vigne a montré que la mycosubtiline et la surfactine activaient notamment les voies de SA⁵⁸. De plus, la surfactine à 10 µM augmente la production de ROS_{intra} racinaires chez *A. thaliana*⁵⁵. Ceci montre une fois de plus que la perception des stress diffère entre les grandes familles.

Par ailleurs, une étude sur l'interaction entre un champignon, *Blumeria graminis*, et *T. aestivum*, a mis en évidence un lien entre l'accumulation de ROS_{intra} et la mort cellulaire localisée. Cette HR, menant à la mort cellulaire, est déclenchée par l'activation de récepteurs NLRs, typiques de l'ETI⁹⁶. Ici, les lipopeptides testés induisent des niveaux de ROS_{intra} inférieurs au contrôle DMSO, ce qui suggère qu'ils ne déclenchent pas de réponse immunitaire forte ni de stress oxydatif intracellulaire. Cela soutient l'hypothèse que les lipopeptides sous forme monomérique n'induisent pas de mort cellulaire, ce qui est confirmé par les observations sur les protoplastes. Cette hypothèse est également cohérente avec les résultats des tests SIA, suggérant que les lipopeptides ne génèrent pas un stress perçu comme suffisant pour activer une réponse de type priming.

Etant donné que les lipopeptides étaient dissous dans la même concentration de DMSO que le contrôle, l'effet négatif significatif observé pour la mycosubtiline et la fengycine, semble spécifique à ces deux lipopeptides. Cela pourrait indiquer qu'ils augmentent la tolérance cellulaire au stress oxydatif. Une étude portant sur un virus infectant l'orge a montré qu'il induisait une réduction de la production de ROS_{intra}. Cette diminution résulte de l'interaction entre la protéine virale et une enzyme clé (glycolate oxydase) dans la génération de H₂O₂ au sein des peroxyosomes. En inhibant cette enzyme, le virus contourne les défenses immunitaires et facilite sa propagation⁹⁷. Bien que les lipopeptides étudiés dans ce travail ne soient pas pathogènes, leur application sur les racines induit également une diminution des ROS_{intra} par rapport au contrôle. Cette similarité suggère que les lipopeptides seraient peut-être capables d'influencer directement ou indirectement les voies de régulation des ROS. Il serait donc pertinent de mesurer l'activité enzymatique des catalases (CAT) et des peroxydases (PRX), deux classes d'enzymes régulatrices des ROS, après l'application des lipopeptides. Ceci permettrait de déterminer si les lipopeptides modulent l'activité de ces enzymes, contribuant ainsi à la diminution observée de ROS_{intra}⁸⁹. Cette hypothèse rejoint celle obtenue pour les ROS_{apo}. Par ailleurs, une découverte récente indique que l'accumulation des ROS est spécifique au type de stress subi, avec des ROS distincts selon les compartiments cellulaires. Ces signatures de ROS permettent d'activer des voies de signalisation adaptées à différents stress⁹⁸. Ainsi, la production des ROS induite par les lipopeptides pourrait dépendre

non seulement de leur influence sur les enzymes de régulation, mais aussi des compartiments cellulaires dans lesquels ces ROS sont produites, en fonction du stress perçu par la plante.

Cependant, l'expérimentation sur ROS_{intra} doit encore être améliorée en raison de l'absence de témoin positif. Sur les racines de *A. thaliana*, la surfactine peut servir de témoin positif car elle génère une accumulation significative de ROS_{intra}^{55,93}. Dans un autre article, les ROS_{intra} sont analysés sur les feuilles et les racines de tomates avec la même sonde, DCFH-DA, mais au microscope et avec un temps d'incubation de la sonde plus court et plus concentré⁹⁹. Une autre étude utilise une sonde fluorescente spécifique différente, roGFP2-Orp1, par fluorimétrie; ensuite, un microscope confocal est utilisé afin de localiser la production de ROS_{intra}¹⁰⁰. Un témoin positif pour cette expérience pourrait être le ter-butyl hydroperoxyde (TBHP, 200 µM) qui est utilisé pour la détection de ROS_{intra}¹⁰¹. Ce composé permet d'induire un stress oxydatif en augmentant la production de ROS_{intra}¹⁰². Ainsi, il serait pertinent de tester des temps différents d'incubation de la sonde DCFH-DA et de tester le TBHP comme témoin positif.

5.3. Evaluation de la toxicité des lipopeptides sur les protoplastes de blé

Les expériences sur les protoplastes ont mis en évidence que les lipopeptides sous leur forme monomérique n'étaient pas toxiques pour le blé. En effet, travailler avec des protoplastes permet de voir l'effet direct de ces derniers sur les membranes plasmiques car les protoplastes sont dépourvus de paroi cellulaire. Un article a montré qu'aucun effet phytotoxique de la mycosubtiline n'a été observé sur le blé, même à des hautes concentrations de 470 µM⁶⁹. De plus, une étude menée sur *A. thaliana* a évalué la viabilité des cellules racinaires en présence de surfactine à 10 µM et 50 µM, à l'aide du colorant Evan's blue, qui marque en bleu les cellules endommagées. A ces concentrations, la surfactine n'affectait pas la viabilité des racines⁵⁵. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la surfactine à 10 µM sur les protoplastes de blé. Cela suggère que sous forme monomérique et micellaire, la surfactine n'a pas d'effet délétère direct sur les MP des cellules. Il serait intéressant d'évaluer la viabilité des cellules de blé face à de plus hautes concentrations de surfactine et de fengycine.

L'isolation des protoplastes a été réalisée en suivant un protocole développé pour *A. thaliana*. Toutefois, le rendement de protoplastes obtenus avec le blé était beaucoup moins élevé que celui de *A. thaliana*. Ceci pourrait s'expliquer par la différence de composition et de structure des parois cellulaires entre ces deux espèces. En effet, les monocotylédones comme le blé possèdent des parois riches en composés, comme la lignine, les rendant plus rigides¹⁰³. Ainsi, elles seraient plus résistantes à la digestion enzymatique que celles de *A. thaliana*. Une étude ayant isolé des protoplastes racinaires de blé a utilisé des enzymes plus puissantes, comme la cellulase cellulysin et la pectolyase, permettant une dégradation plus efficace des parois cellulaires¹⁰⁴. Adapter le protocole aux spécificités anatomiques du blé pourrait améliorer l'efficacité de l'isolement. Une fois le protocole adapté, il serait pertinent de réaliser davantage de répliques et de répétitions indépendantes car dans cette expérience, un seul réplica et une seule répétition ont pu être réalisés en raison de la faible quantité de protoplastes obtenue. De plus, d'autres tests pourraient également être effectués sur les protoplastes de blé comme la mesure de l'influx de

calcium réalisée sur *A. thaliana*⁹³, et la production de ROS_{intra}. Ces analyses sur protoplastes permettent de s'affranchir des barrières physiques telles que la paroi cellulaire et d'observer directement les réponses précoces déclenchées par les lipopeptides.

6. Conclusion

Ce travail visait à mieux comprendre le potentiel éliciteur des lipopeptides cycliques de *Bacillus subtilis* sur une espèce monocotylédone d'importance agronomique : le blé (*Triticum aestivum*). Différentes approches ont permis d'évaluer les effets des surfactines, fengycines et mycosubtilines sur les réponses immunitaires précoces du blé.

Dans un premier temps, l'évaluation des effets directs des lipopeptides a été réalisée via la mesure des ROS_{apo} et ROS_{intra} ce qui a permis de mettre en évidence une production différenciée selon le tissu et la concentration. La mycosubtiline sous sa forme monomérique, en particulier, s'est révélée capable d'induire une production significative de ROS_{apo} racinaires, tandis que cette induction est absente dans les feuilles. Cette distinction souligne des mécanismes de perception tissulaires spécifiques. En parallèle, la mycosubtiline ne provoque pas de stress oxydatif intracellulaire ni de phytotoxicité. A l'inverse, la fengycine et la surfactine ont montré des effets plus modérés ou nuls, suggérant des mécanismes de perception et d'action distincts.

Ensuite, la capacité des lipopeptides appliqués aux racines à déclencher une réponse immunitaire systémique au niveau des feuilles a été étudiée. Les résultats ont montré qu'aucun des trois lipopeptides sous sa forme monomérique appliqués sur les racines, n'induit d'augmentation de production de ROS_{apo} dans les feuilles.

Enfin, l'approche sur protoplastes racinaires a confirmé que les lipopeptides sous leur forme monomérique n'affectent pas la viabilité cellulaire ni l'intégrité des membranes plasmiques, indiquant que leur mode d'action ne provoque pas de dommage cellulaire direct mais agit plutôt par une modulation fine des mécanismes de défense.

Ce travail souligne l'intérêt de considérer les spécificités des monocotylédones dans l'étude de l'immunité végétale, en particulier dans un contexte de recherche de nouveaux agents de biocontrôle. Il apporte également des pistes pour mieux comprendre la relation entre la structure et l'activité des lipopeptides, avec la mycosubtiline apparaissant comme un candidat prometteur pour stimuler les défenses du blé sans effets indésirables. En combinant des approches transcriptomiques, biophysiques et microscopiques, il serait possible d'affiner la compréhension des mécanismes impliqués dans la perception des lipopeptides chez le blé, et donc de mieux appréhender leur utilisation.

7. Bibliographie

- (1) Khalid, A.; Hameed, A.; Tahir, M. F. Wheat Quality: A Review on Chemical Composition, Nutritional Attributes, Grain Anatomy, Types, Classification, and Function of Seed Storage Proteins in Bread Making Quality. *Front. Nutr.* **2023**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1053196>.
- (2) *Wheat in the world - B.C. Curtis.* <https://www.fao.org/4/y4011e/y4011e04.htm> (accessed 2025-03-24).
- (3) Maulenbay, A.; Rsaliyev, A. Fungal Disease Tolerance with a Focus on Wheat: A Review. *J Fungi (Basel)* **2024**, *10* (7), 482. <https://doi.org/10.3390/jof10070482>.
- (4) Hafeez, F. Y.; Naureen, Z.; Sarwar, A. Surfactin: An Emerging Biocontrol Tool for Agriculture Sustainability. In *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability : From Theory to Practices*; Kumar, A., Meena, V. S., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp 203–213. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_10.
- (5) Dhankhar, N.; Kumar, J. Impact of Increasing Pesticides and Fertilizers on Human Health: A Review. *Materials Today: Proceedings* **2023**. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.03.766>.
- (6) Rani, L.; Thapa, K.; Kanodia, N.; Sharma, N.; Singh, S.; Grewal, A. S.; Srivastav, A. L.; Kaushal, J. An Extensive Review on the Consequences of Chemical Pesticides on Human Health and Environment. *Journal of Cleaner Production* **2021**, *283*, 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>.
- (7) Duba, A.; Goriewa-Duba, K.; Wachowska, U. A Review of the Interactions between Wheat and Wheat Pathogens: Zymoseptoria Tritici, Fusarium Spp. and Parastagonospora Nodorum. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19* (4), 1138. <https://doi.org/10.3390/ijms19041138>.
- (8) Anuar, M. S. K.; Hashim, A. M.; Ho, C. L.; Wong, M.-Y.; Sundram, S.; Saidi, N. B.; Yusof, M. T. Synergism: Biocontrol Agents and Biostimulants in Reducing Abiotic and Biotic Stresses in Crop. *World J Microbiol Biotechnol* **2023**, *39* (5), 123. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03579-3>.
- (9) Hasan, A.; Tabassum, B.; Hashim, M.; Khan, N. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as a Plant Growth Enhancer for Sustainable Agriculture: A Review. *Bacteria* **2024**, *3* (2), 59–75. <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>.
- (10) Blake, C.; Christensen, M. N.; Kovács, Á. T. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by Bacillus Subtilis. *Mol Plant Microbe Interact* **2021**, *34* (1), 15–25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>.
- (11) Ben Mrid, R.; Benmrid, B.; Hafsa, J.; Boukcim, H.; Sobeh, M.; Yasri, A. Secondary Metabolites as Biostimulant and Bioprotectant Agents: A Review. *Science of The Total Environment* **2021**, *777*, 146204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146204>.
- (12) Sani, A.; Qin, W.-Q.; Li, J.-Y.; Liu, Y.-F.; Zhou, L.; Yang, S.-Z.; Mu, B.-Z. Structural Diversity and Applications of Lipopeptide Biosurfactants as Biocontrol Agents against Phytopathogens: A Review. *Microbiological Research* **2024**, *278*, 127518. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127518>.
- (13) Vlot, A. C.; Sales, J. H.; Lenk, M.; Bauer, K.; Brambilla, A.; Sommer, A.; Chen, Y.; Wenig, M.; Nayem, S. Systemic Propagation of Immunity in Plants. *New Phytologist* **2021**, *229* (3), 1234–1250. <https://doi.org/10.1111/nph.16953>.
- (14) Doughari, J. An Overview of Plant Immunity. *ResearchGate* **2024**.
- (15) Wan, J.; He, M.; Hou, Q.; Zou, L.; Yang, Y.; Wei, Y.; Chen, X. Cell Wall Associated Immunity in Plants. *Stress Biology* **2021**, *1* (1), 3. <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00003-4>.
- (16) Tiku, A. R. Antimicrobial Compounds and Their Role in Plant Defense. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*; Singh, A., Singh, I. K., Eds.; Springer: Singapore, 2018; pp 283–307. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_13.
- (17) Ali, S.; Tyagi, A.; Mir, Z. A. Plant Immunity: At the Crossroads of Pathogen Perception and Defense Response. *Plants* **2024**, *13* (11), 1434. <https://doi.org/10.3390/plants13111434>.
- (18) Cordelier, S.; Crouzet, J.; Gilliard, G.; Dorey, S.; Deleu, M.; Dhondt-Cordelier, S. Deciphering the Role of Plant Plasma Membrane Lipids in Response to Invasion Patterns: How Could Biology and Biophysics Help? *Journal of Experimental Botany* **2022**, *73* (9), 2765–2784. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab517>.

- (19) battle for chitin recognition in plant-microbe interactions | *FEMS Microbiology Reviews* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/femsre/article/39/2/171/634918> (accessed 2025-04-28).
- (20) Choi, H. W.; Klessig, D. F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in Plant Innate Immunity. *BMC Plant Biol* **2016**, *16* (1), 232. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>.
- (21) Klarzynski, O.; Fritig, B. Stimulation Des Défenses Naturelles Des Plantes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **2001**, *324* (10), 953–963. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01371-3](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01371-3).
- (22) Orozco-Mosqueda, Ma. del C.; Fadiji, A. E.; Babalola, O. O.; Santoyo, G. Bacterial Elicitors of the Plant Immune System: An Overview and the Way Forward. *Plant Stress* **2023**, *7*, 100138. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100138>.
- (23) Sierla, M.; Rahikainen, M.; Salojärvi, J.; Kangasjärvi, J.; Kangasjärvi, S. Apoplastic and Chloroplastic Redox Signaling Networks in Plant Stress Responses. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18* (16), 2220–2239. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5016>.
- (24) Li, P.; Lu, Y.-J.; Chen, H.; Day, B. The Lifecycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences* **2020**, *39* (1), 72–100. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1757829>.
- (25) Sun, T.; Zhang, Y. MAP Kinase Cascades in Plant Development and Immune Signaling. *EMBO reports* **2022**, *23* (2), e53817. <https://doi.org/10.15252/embr.202153817>.
- (26) Wang, Y.; Li, X.; Fan, B.; Zhu, C.; Chen, Z. Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (5), 2393. <https://doi.org/10.3390/ijms22052393>.
- (27) Jones, J. D. G.; Staskawicz, B. J.; Dangl, J. L. The Plant Immune System: From Discovery to Deployment. *Cell* **2024**, *187* (9), 2095–2116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.045>.
- (28) Balmer, D.; Planchamp, C.; Mauch-Mani, B. On the Move: Induced Resistance in Monocots. *Journal of Experimental Botany* **2013**, *64* (5), 1249–1261. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers248>.
- (29) Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. The Plant Immune System. *Nature* **2006**, *444* (7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- (30) Höning, M.; Roeber, V. M.; Schmülling, T.; Cortleven, A. Chemical Priming of Plant Defense Responses to Pathogen Attacks. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1146577>.
- (31) Yu, Y.; Gui, Y.; Li, Z.; Jiang, C.; Guo, J.; Niu, D. Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants* **2022**, *11* (3), 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>.
- (32) Sabelli, P. A. Seed Development: A Comparative Overview on Biology of Morphology, Physiology, and Biochemistry Between Monocot and Dicot Plants. In *Seed Development: OMICS Technologies toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield: OMICS in Seed Biology*; Agrawal, G. K., Rakwal, R., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2012; pp 3–25. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4749-4_1.
- (33) Bielach, A.; Hrtyan, M.; Tognetti, V. B. Plants under Stress: Involvement of Auxin and Cytokinin. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (7), 1427. <https://doi.org/10.3390/ijms18071427>.
- (34) Baran, B.; Ölmez, F.; Çapa, B.; Dikilitas, M. Defense Pathways of Wheat Plants Inoculated with Zymoseptoria Tritici under NaCl Stress Conditions: An Overview. *Life* **2024**, *14* (5), 648. <https://doi.org/10.3390/life14050648>.
- (35) Das, K.; Roychoudhury, A. Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers during Environmental Stress in Plants. *Front. Environ. Sci.* **2014**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>.
- (36) Wrzaczek, M.; Brosché, M.; Kangasjärvi, J. ROS Signaling Loops — Production, Perception, Regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **2013**, *16* (5), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.07.002>.
- (37) Pardo-Hernández, M.; López-Delacalle, M.; Martí-Guillén, J. M.; Martínez-Lorente, S. E.; Rivero, R. M. ROS and NO Phytomelatonin-Induced Signaling Mechanisms under Metal Toxicity in Plants: A Review. *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10* (5), 775. <https://doi.org/10.3390/antiox10050775>.

- (38) Caverzan, A.; Piasecki, C.; Chavarria, G.; C Neal Stewart, J.; Vargas, L. Defenses Against ROS in Crops and Weeds: The Effects of Interference and Herbicides. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20* (5), 1086. <https://doi.org/10.3390/ijms20051086>.
- (39) Chaouch, S.; Queval, G.; Noctor, G. AtRbohF Is a Crucial Modulator of Defence-Associated Metabolism and a Key Actor in the Interplay between Intracellular Oxidative Stress and Pathogenesis Responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* **2012**, *69* (4), 613–627. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04816.x>.
- (40) O'Brien, J. A.; Daudi, A.; Finch, P.; Butt, V. S.; Whitelegge, J. P.; Souda, P.; Ausubel, F. M.; Bolwell, G. P. A Peroxidase-Dependent Apoplastic Oxidative Burst in Cultured Arabidopsis Cells Functions in MAMP-Elicited Defense. *Plant Physiology* **2012**, *158* (4), 2013–2027. <https://doi.org/10.1104/pp.111.190140>.
- (41) Foyer, C. H.; Noctor, G. Redox Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18* (16), 2087–2090. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5278>.
- (42) Fortunato, S.; Lasorella, C.; Dipierro, N.; Vita, F.; de Pinto, M. C. Redox Signaling in Plant Heat Stress Response. *Antioxidants* **2023**, *12* (3), 605. <https://doi.org/10.3390/antiox12030605>.
- (43) Peláez-Vico, M. Á.; Fichman, Y.; Zandalinas, S. I.; Van Breusegem, F.; Karpiński, S. M.; Mittler, R. ROS and Redox Regulation of Cell-to-Cell and Systemic Signaling in Plants during Stress. *Free Radical Biology and Medicine* **2022**, *193*, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.10.305>.
- (44) Ding, L.-N.; Yang, G.-X.; Yang, R.-Y.; Cao, J.; Zhou, Y. Investigating interactions of salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways in monocots wheat - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576516300029> (accessed 2025-02-17).
- (45) Niu, E.; Zhang, Y.; Xu, H.; Xu, B.; Liang, Q.; Li, H.; Wang, J. A G-Type Lectin Receptor-like Kinase TaSRLK Confers Wheat Resistance to Stripe Rust by Regulating the Reactive Oxygen Species Signaling Pathway. *Stress Biology* **2025**, *5* (1), 37. <https://doi.org/10.1007/s44154-025-00225-w>.
- (46) Le Mire, G.; Siah, A.; Brisset, M.-N.; Gaucher, M.; Deleu, M.; Jijakli, M. H. Surfactin Protects Wheat against Zymoseptoria Tritici and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses. *Agriculture* **2018**, *8* (1), 11. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010011>.
- (47) Sur, S.; Romo, T. D.; Grossfield, A. Selectivity and Mechanism of Fengycin, an Antimicrobial Lipopeptide, from Molecular Dynamics. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (8), 2219–2226. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b11889>.
- (48) Yin, Y.; Wang, X.; Zhang, P.; Wang, P.; Wen, J. Strategies for Improving Fengycin Production: A Review. *Microb Cell Fact* **2024**, *23* (1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02425-x>.
- (49) Carolin C, F.; Kumar, P. S.; Ngueagni, P. T. A Review on New Aspects of Lipopeptide Biosurfactant: Types, Production, Properties and Its Application in the Bioremediation Process. *Journal of Hazardous Materials* **2021**, *407*, 124827. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124827>.
- (50) Maksimov, I. V.; Singh, B. P.; Cherepanova, E. A.; Burkhanova, G. F.; Khairullin, R. M. Prospects and Applications of Lipopeptide-Producing Bacteria for Plant Protection (Review). *Appl Biochem Microbiol* **2020**, *56* (1), 15–28. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010135>.
- (51) Deleu, M.; Crowet, J.-M.; Nasir, M. N.; Lins, L. Complementary Biophysical Tools to Investigate Lipid Specificity in the Interaction between Bioactive Molecules and the Plasma Membrane: A Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838* (12), 3171–3190. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.023>.
- (52) Sreedharan, S. M.; Rishi, N.; Singh, R. Microbial Lipopeptides: Properties, Mechanics and Engineering for Novel Lipopeptides. *Microbiological Research* **2023**, *271*, 127363. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127363>.
- (53) Gilliard, G.; Furlan, A. L.; Smeralda, W.; Pršić, J.; Deleu, M. Added Value of Biophysics to Study Lipid-Driven Biological Processes: The Case of Surfactins, a Class of Natural Amphiphile Molecules. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (22), 13831. <https://doi.org/10.3390/ijms232213831>.

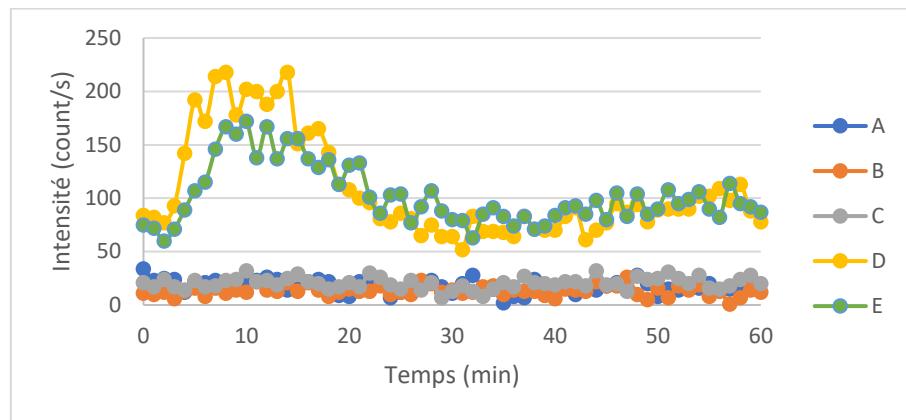
- (54) Chen, X.; Lu, Y.; Shan, M.; Zhao, H.; Lu, Z.; Lu, Y. A Mini-Review: Mechanism of Antimicrobial Action and Application of Surfactin. *World J Microbiol Biotechnol* **2022**, *38* (8), 143. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03323-3>.
- (55) Pršić, J.; Gilliard, G.; Ibrahim, H.; Argüelles-Arias, A.; Rondelli, V.; Crowet, J.-M.; Genva, M.; Luzuriaga-Loaiza, W. P.; Deboever, E.; Nasir, M. N.; Lins, L.; Mathelie-Guinlet, M.; Eschrig, S.; Ranf, S.; Dorey, S.; Coninck, B. D.; Nürnberger, T.; Mongrand, S.; Höfte, M.; Zipfel, C.; Dufrêne, Y. F.; Deleu, M.; Ongena, M. Mechanosensing and Sphingolipid-Docking Mediate Lipopeptide-Induced Immunity in Arabidopsis. *bioRxiv* July 4, 2023, p 2023.07.04.547613. <https://doi.org/10.1101/2023.07.04.547613>.
- (56) Mejri, S.; Siah, A.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Tisserant, B.; Krier, F.; Jacques, P.; Halama, P. *Biocontrol of the wheat pathogen Zymoseptoria tritici using cyclic lipopeptides from Bacillus subtilis | Environmental Science and Pollution Research*. Springer nature. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9241-9> (accessed 2025-02-17).
- (57) Liang, C.; Xi-xi, X.; Yun-xiang, S.; Qiu-hua, X.; Yang-yong, L.; Yuan-sen, H.; Ke, B. Surfactin Inhibits Fusarium Graminearum by Accumulating Intracellular ROS and Inducing Apoptosis Mechanisms. *World J Microbiol Biotechnol* **2023**, *39* (12), 340. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03790-2>.
- (58) Farace, G.; Fernandez, O.; Jacquens, L.; Coutte, F.; Krier, F.; Jacques, P.; Clément, C.; Barka, E. A.; Jacquard, C.; Dorey, S. Cyclic Lipopeptides from *Bacillus Subtilis* Activate Distinct Patterns of Defence Responses in Grapevine. *Molecular Plant Pathology* **2015**, *16* (2), 177–187. <https://doi.org/10.1111/mpp.12170>.
- (59) Chen, M.; Wang, H.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Sun, H.; Yu, L.; Zhang, Q.; Chen, X.; Xiao, H. Recent Advances in Antimicrobial Lipopeptide Fengycin Secreted by *Bacillus*: Structure, Biosynthesis, Antifungal Mechanisms, and Potential Application in Food Preservation. *Food Chemistry* **2025**, *489*, 144937. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144937>.
- (60) Wang, Z.; Liu, C.; Shi, Y.; Huang, M.; Song, Z.; Simal-Gandara, J.; Li, N.; Shi, J. Classification, Application, Multifarious Activities and Production Improvement of Lipopeptides Produced by *Bacillus*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2024**, *64* (21), 7451–7464. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2185588>.
- (61) Falardeau, J.; Wise, C.; Novitsky, L.; Avis, T. J. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus Subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *J Chem Ecol* **2013**, *39* (7), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>.
- (62) Deleu, M.; Paquot, M.; Nylander, T. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus Subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (7), 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.
- (63) Mantil, E.; Buznytska, I.; Daly, G.; Ianoul, A.; Avis, T. J. Role of Lipid Composition in the Interaction and Activity of the Antimicrobial Compound Fengycin with Complex Membrane Models. *J Membrane Biol* **2019**, *252* (6), 627–638. <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00100-6>.
- (64) Khan, N.; Maymon, M.; Hirsch, A. M. Combating Fusarium Infection Using *Bacillus*-Based Antimicrobials. *Microorganisms* **2017**, *5* (4), 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040075>.
- (65) Yuan, Q.-S.; Yang, P.; Liu, Y.-K.; Tabl, K. M.; Guo, M.-W.; Zhang, J.-B.; Wu, A.-B.; Liao, Y.-C.; Huang, T.; He, W.-J. Iturin and Fengycin Lipopeptides Inhibit Pathogenic Fusarium by Targeting Multiple Components of the Cell Membrane and Their Regulative Effects in Wheat. *Journal of Integrative Plant Biology* **2025**, *n/a* (*n/a*). <https://doi.org/10.1111/jipb.13933>.
- (66) Lam, V. B.; Meyer, T.; Arias, A. A.; Ongena, M.; Oni, F. E.; Höfte, M. *Bacillus* Cyclic Lipopeptides Iturin and Fengycin Control Rice Blast Caused by *Pyricularia Oryzae* in Potting and Acid Sulfate Soils by Direct Antagonism and Induced Systemic Resistance. *Microorganisms* **2021**, *9* (7), 1441. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071441>.
- (67) Nasir, M. N.; Thawani, A.; Kouzayha, A.; Besson, F. Interactions of the Natural Antimicrobial Mycosubtilin with Phospholipid Membrane Models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *78* (1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.034>.
- (68) PubChem. *Mycosubtiline*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3083700> (accessed 2025-04-13).
- (69) Platel, R.; Lucau-Danila, A.; Baltenweck, R.; Maia-Grondard, A.; Trapet, P.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Duret, M.; Halama, P.; Hilbert, J.-L.; Coutte, F.; Jacques, P.; Hugueney, P.;

- Reignault, P.; Siah, A. Deciphering Immune Responses Primed by a Bacterial Lipopeptide in Wheat towards Zymoseptoria Tritici. *Front. Plant Sci.* **2023**, *13*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074447>.
- (70) Yu, C.; Liu, X.; Zhang, X.; Zhang, M.; Gu, Y.; Ali, Q.; Mohamed, M. S. R.; Xu, J.; Shi, J.; Gao, X.; Wu, H.; Gu, Q. Mycosubtilin Produced by *Bacillus Subtilis* ATCC6633 Inhibits Growth and Mycotoxin Biosynthesis of *Fusarium Graminearum* and *Fusarium Verticillioides*. *Toxins* **2021**, *13* (11), 791. <https://doi.org/10.3390/toxins13110791>.
- (71) Mihalache, G.; Balaes, T.; Gostin, I.; Stefan, M.; Coutte, F.; Krier, F. Lipopeptides Produced by *Bacillus Subtilis* as New Biocontrol Products against Fusariosis in Ornamental Plants. *Environ Sci Pollut Res* **2018**, *25* (30), 29784–29793. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9162-7>.
- (72) Leconte, A.; Tournant, L.; Muchembled, J.; Paucellier, J.; Héquet, A.; Deracinois, B.; Deweer, C.; Krier, F.; Deleu, M.; Oste, S.; Jacques, P.; Coutte, F. Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus Subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia Inaequalis*). *Microorganisms* **2022**, *10* (9), 1810. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>.
- (73) Han, Q.; Wu, F.; Wang, X.; Qi, H.; Shi, L.; Ren, A.; Liu, Q.; Zhao, M.; Tang, C. The Bacterial Lipopeptide Iturins Induce *Verticillium Dahliae* Cell Death by Affecting Fungal Signalling Pathways and Mediate Plant Defence Responses Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity. *Environmental Microbiology* **2015**, *17* (4), 1166–1188.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12538>.
- (74) Feillet, P. *Le grain de blé: Composition et utilisation*; Quae, 2000.
- (75) Khaeim, H.; Kende, Z.; Balla, I.; Gyuricza, C.; Eser, A.; Tarnawa, Á. The Effect of Temperature and Water Stresses on Seed Germination and Seedling Growth of Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Sustainability* **2022**, *14* (7), 3887. <https://doi.org/10.3390/su14073887>.
- (76) Jauregi, P.; Coutte, F.; Catiau, L.; Lecouturier, D.; Jacques, P. Micelle Size Characterization of Lipopeptides Produced by *B. Subtilis* and Their Recovery by the Two-Step Ultrafiltration Process. *Separation and Purification Technology* **2013**, *104*, 175–182.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.11.017>.
- (77) Pais, I.; Moreira, R.; Semedo, J. N.; Reboredo, F. H.; Lidon, F. C.; Coutinho, J.; Maçãs, B.; Scotti-Campos, P. Phenotypic Diversity of Seminal Root Traits in Bread Wheat Germplasm from Different Origins. *Plants (Basel)* **2022**, *11* (21), 2842. <https://doi.org/10.3390/plants11212842>.
- (78) Timilsina, R.; Kim, J. H.; Nam, H. G.; Woo, H. R. Temporal Changes in Cell Division Rate and Genotoxic Stress Tolerance in Quiescent Center Cells of *Arabidopsis* Primary Root Apical Meristem. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 3599. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40383-2>.
- (79) Wu, B.; Qi, F.; Liang, Y. Fuels for ROS Signaling in Plant Immunity. *Trends in Plant Science* **2023**, *28* (10), 1124–1131. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.04.007>.
- (80) Pasternak, T.; Paponov, I. A.; Kondratenko, S. Optimizing Protocols for *Arabidopsis* Shoot and Root Protoplast Cultivation. *Plants (Basel)* **2021**, *10* (2), 375.
<https://doi.org/10.3390/plants10020375>.
- (81) Zhao, H.; Oczos, J.; Janowski, P.; Trembecka, D.; Dobrucki, J.; Darzynkiewicz, Z.; Włodkowic, D. Rationale for the Real-Time and Dynamic Cell Death Assays Using Propidium Iodide. *Cytometry A* **2010**, *77* (4), 399–405. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20867>.
- (82) Gan, P.; Tang, C.; Lu, Y.; Ren, C.; Nasab, H. R.; Kun, X.; Wang, X.; Li, L.; Kang, Z.; Wang, X.; Wang, J. Quantitative Phosphoproteomics Reveals Molecular Pathway Network in Wheat Resistance to Stripe Rust. *Stress Biology* **2024**, *4* (1), 32. <https://doi.org/10.1007/s44154-024-00170-0>.
- (83) Baker, C. J.; Mock, N. M. A Method to Detect Oxidative Stress by Monitoring Changes in the Extracellular Antioxidant Capacity in Plant Suspension Cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2004**, *64* (5), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.09.004>.
- (84) Akter, S.; Shahneawz Khan, M.; N. Smith, E.; Flashman, E. Measuring ROS and Redox Markers in Plant Cells. *RSC Chemical Biology* **2021**, *2* (5), 1384–1401.
<https://doi.org/10.1039/D1CB00071C>.
- (85) Hao, G.; Tiley, H.; McCormick, S. Chitin Triggers Tissue-Specific Immunity in Wheat Associated With Fusarium Head Blight. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.832502>.
- (86) Alekseev, V. Y.; Veselova, S. V.; Rumyantsev, S. D.; Burkhanova, G. F.; Cherepanova, E. A.; Maksimov, I. V. Bacteria of the Genus *Bacillus* and Their Lipopeptides Enhance Endurance of

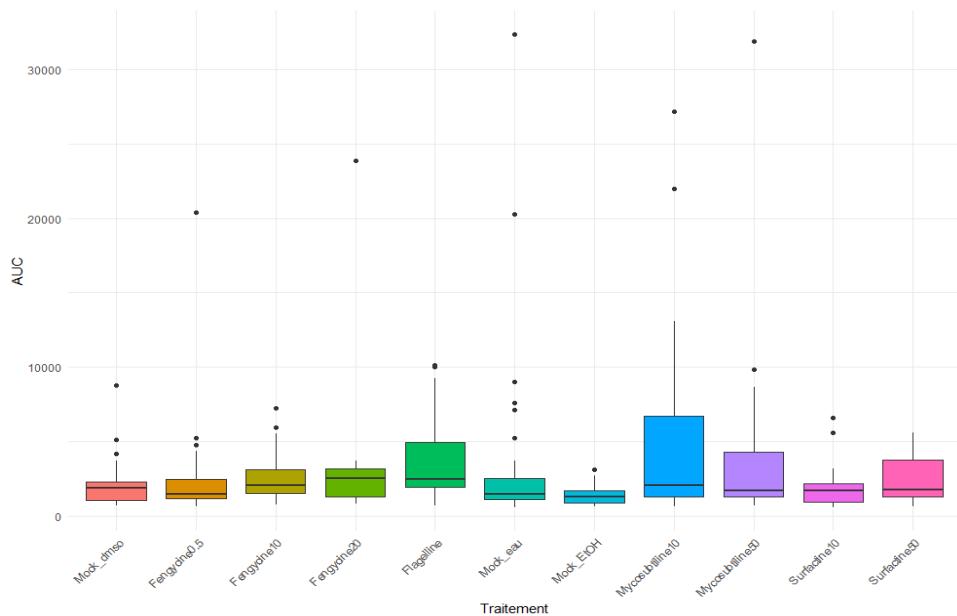
- Wheat Plants to the Greenbug Aphid *Schizaphis Graminum* Rond. *AIP Conference Proceedings* **2021**, 2388 (1), 030001. <https://doi.org/10.1063/5.0071841>.
- (87) Haslam, T. M.; Feussner, I. Diversity in Sphingolipid Metabolism across Land Plants. *Journal of Experimental Botany* **2022**, 73 (9), 2785–2798. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab558>.
- (88) Yang, Q.; Zhang, H.; You, J.; Yang, J.; Zhang, Q.; Zhao, J.; Aimaier, R.; Zhang, J.; Han, S.; Zhao, H.; Zhao, H. Transcriptome and Metabolome Analyses Reveal That *Bacillus Subtilis* BS-Z15 Lipopeptides Mycosubtilin Homologue Mediates Plant Defense Responses. *Front. Plant Sci.* **2023**, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1088220>.
- (89) Lee, J.; Han, M.; Shin, Y.; Lee, J.-M.; Heo, G.; Lee, Y. How Extracellular Reactive Oxygen Species Reach Their Intracellular Targets in Plants. *Molecules and Cells* **2023**, 46 (6), 329–336. <https://doi.org/10.14348/molcells.2023.2158>.
- (90) Locato, V.; Cimini, S.; De Gara, L. ROS and Redox Balance as Multifaceted Players of Cross-Tolerance: Epigenetic and Retrograde Control of Gene Expression. *Journal of Experimental Botany* **2018**, 69 (14), 3373–3391. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery168>.
- (91) Nyaupane, S.; Poudel, M. R.; Panthi, B.; Dhakal, A.; Paudel, H.; Bhandari, R. Drought Stress Effect, Tolerance, and Management in Wheat – a Review. *Cogent Food & Agriculture* **2024**, 10 (1), 2296094. <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2296094>.
- (92) Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M. H. M. B.; Parvin, K.; Bhuiyan, T. F.; Anee, T. I.; Nahar, K.; Hossen, M. S.; Zulfiqar, F.; Alam, M. M.; Fujita, M. Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21 (22), 8695. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>.
- (93) Gilliard, G.; Demortier, T.; Boubsti, F.; Jijakli, M. H.; Ongena, M.; De Clerck, C.; Deleu, M. Deciphering the Distinct Biocontrol Activities of Lipopeptides Fengycin and Surfactin through Their Differential Impact on Lipid Membranes. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2024**, 239, 113933. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.113933>.
- (94) Wang, L.; He, Y.; Guo, G.; Xia, X.; Dong, Y.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Fan, X.; Wu, L.; Zhou, X.; Zhang, Z.; Li, G. Overexpression of Plant Chitin Receptors in Wheat Confers Broad-Spectrum Resistance to Fungal Diseases. *The Plant Journal* **2024**, 120 (3), 1047–1063. <https://doi.org/10.1111/tpj.17035>.
- (95) Smith, J. M.; Leslie, M. E.; Robinson, S. J.; Korasick, D. A.; Zhang, T.; Backues, S. K.; Cornish, P. V.; Koo, A. J.; Bednarek, S. Y.; Heese, A. Loss of *Arabidopsis Thaliana* Dynamin-Related Protein 2B Reveals Separation of Innate Immune Signaling Pathways. *PLOS Pathogens* **2014**, 10 (12), e1004578. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004578>.
- (96) Li, Y.; Roychowdhury, R.; Govta, L.; Jaiwar, S.; Wei, Z.-Z.; Shams, I.; Fahima, T. Intracellular Reactive Oxygen Species-Aided Localized Cell Death Contributing to Immune Responses Against Wheat Powdery Mildew Pathogen. *Phytopathology®* **2023**, 113 (5), 884–892. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-22-0271-FI>.
- (97) Yang, M.; Li, Z.; Zhang, K.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Wang, X.; Han, C.; Yu, J.; Xu, K.; Li, D. Barley Stripe Mosaic Virus Γb Interacts with Glycolate Oxidase and Inhibits Peroxisomal ROS Production to Facilitate Virus Infection. *Molecular Plant* **2018**, 11 (2), 338–341. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.007>.
- (98) Mittler, R.; Zandalinas, S. I.; Fichman, Y.; Van Breusegem, F. Reactive Oxygen Species Signalling in Plant Stress Responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2022**, 23 (10), 663–679. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>.
- (99) Henry, G.; Deleu, M.; Jourdan, E.; Thonart, P.; Ongena, M. The Bacterial Lipopeptide Surfactin Targets the Lipid Fraction of the Plant Plasma Membrane to Trigger Immune-Related Defence Responses. *Cell Microbiol* **2011**, 13 (11), 1824–1837. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01664.x>.
- (100) Nietzel, T.; Elsässer, M.; Ruberti, C.; Steinbeck, J.; Ugalde, J. M.; Fuchs, P.; Wagner, S.; Ostermann, L.; Moseler, A.; Lemke, P.; Fricker, M. D.; Müller-Schüssele, S. J.; Moerschbacher, B. M.; Costa, A.; Meyer, A. J.; Schwarzländer, M. The Fluorescent Protein Sensor roGFP2-Orp1 Monitors in Vivo H₂O₂ and Thiol Redox Integration and Elucidates Intracellular H₂O₂ Dynamics during Elicitor-Induced Oxidative Burst in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **2019**, 221 (3), 1649–1664. <https://doi.org/10.1111/nph.15550>.

- (101) Lairikyengbam, D.; Wetterauer, B.; Schmiech, M.; Jahraus, B.; Kirchgessner, H.; Wetterauer, P.; Berschneider, K.; Beier, V.; Niesler, B.; Balta, E.; Samstag, Y. Comparative Analysis of Whole Plant, Flower and Root Extracts of Chamomilla Recutita L. and Characteristic Pure Compounds Reveals Differential Anti-Inflammatory Effects on Human T Cells. *Front. Immunol.* **2024**, *15*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1388962>.
- (102) Zhao, G.; Zhang, Y.; Tian, Y.; Huang, J.; Gao, P.; Zhao, Q.; Yang, Z. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Selenomethionine Promote Osteogenesis via Wnt/β-Catenin Pathway. *Biochemistry and Biophysics Reports* **2023**, *36*, 101559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101559>.
- (103) Penning, B. W. The Cell Wall-Related Gene Families of Wheat (*Triticum Aestivum*). *Diversity* **2023**, *15* (11), 1135. <https://doi.org/10.3390/d15111135>.
- (104) Lindberg, S.; Landberg, T.; Greger, M. Cadmium Uptake and Interaction with Phytochelatins in Wheat Protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* **2007**, *45* (1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.01.001>.

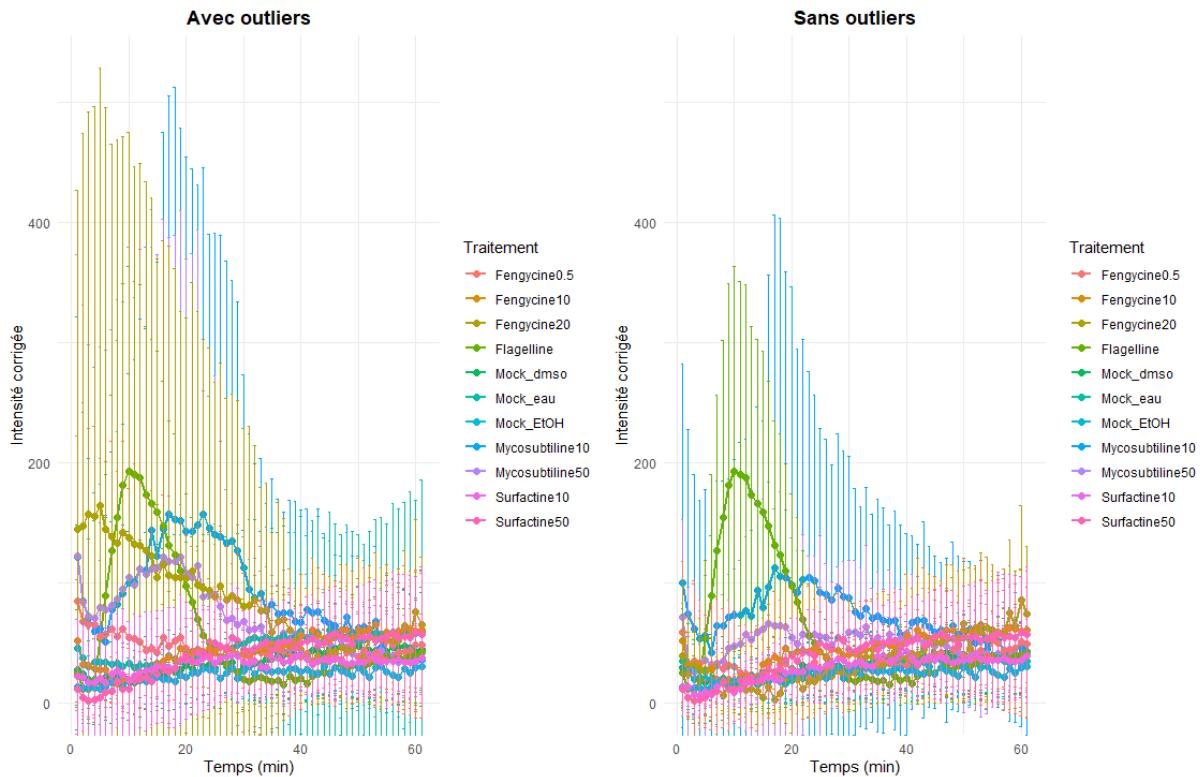
8. Annexes



Annexe 1 : Intensité de luminescence obtenue après l'ajout de flagelline sur les racines de blé. Cette figure représente un exemple de 5 puits traités avec de la flagelline, utilisés afin de déterminer le seuil de discrimination. Une corrélation est observée entre la réactivité à la flagelline et l'intensité moyenne enregistrée lors de la phase de repos (après l'ajout du mix luminol/peroxydase). Les puits présentant une intensité moyenne inférieure à 35 count/s après l'ajout du mix, sont considérés comme discriminés. Les courbes A, B et C ont une moyenne d'intensité après l'ajout du mix de respectivement 28, 13 et 26 . Les courbes D et E quant à elles ont une moyenne de 73 et 65. (Pour l'établissement du seuil, un nombre de puits supérieur à 5 a été analysé)



Annexe 2 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS_{apo} racinaires avec les valeurs aberrantes mesurée par luminescence après application de lipopeptides (surfactine, fengycine et mycosubtiline) sous forme monomérique et micellaire, comparée aux témoins (mock_dmso, mock_EtOH, mock_eau). Chaque boite à moustache représente l'étendue interquartile, la médiane (trait horizontal), les valeurs extrêmes.



Annexe 3 : Intensité de luminescence corrigée représentant la production de ROS_{apo} racinaires avec et sans valeurs aberrantes au cours du temps.

```

library(dplyr)
library(tidyr)
library(lme4)
library(emmeans)
library(ggplot2)
library(readxl)
install.packages("lmerTest")
library(lmerTest)
donnees<-read_excel("d:/Users/Utilisateur/Documents/Outlier/essaiR.xlsx") #Lecture des données
#création d'un vecteur de temps
temps <- 1:(ncol(donnees)-4) #les temps sont après la 4e colonne dans mon fichier
nomf<- function(x,p=0.15){      #définition de la fonction: moyenne des valeurs <quantile
  percent <- quantile(x, probs=p)
  mean(x[x<percent])
}
colonnes_signal <-grep("^t",names(donnees))           #soustraction du bruit de fond ligne par ligne
donnees$bruit_fond<-apply(donnees[,colonnes_signal],1,FUN=nomf)
#créer une version corrigée
donnees[,paste0("corr_ ",names(donnees)[colonnes_signal])]<- donnees[,colonnes_signal]-donnees$bruit_fond
install.packages("pracma")    #Calcul aire sous la courbe (AUC) pour chaque ligne
library(pracma)
donnees$AUC<-apply(donnees[,grep("^corr_t",names(donnees))],1,function(y){
  trapz(temps,y)
})
donnees$Traitement<-relevel(factor(donnees$Traitement),ref="Mock_dms0")    #fixer "mock_dms0" référence pour le facteur traitement

mod_auc<-lmer(AUC~Traitement + (1|Repetition)+(1|Plaque), data=donnees)      #modèle mixte
summary(mod_auc)
anova(mod_auc)
#comparaison multiples des traitements: entre-eux et avec la référence (mock_dms0)
emmeans_resultats<-emmeans(mod_auc,pairwise~Traitement)
emmeans_resultats
plot(emmeans_resultats$emmeans, comparisons=TRUE)
ggplot(donnees, aes(x = Traitement, y = AUC, fill = Traitement)) +          #Boxplot AUC

```

```

geom_boxplot() +
  labs(title = "Aire sous la courbe (AUC) par traitement",
       x = "Traitement",
       y = "AUC") +
  theme_minimal() +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1),
        legend.position = "none") # Retire la légende si elle est redondante
  cols_corr<- grep("corr_t",names(donnees),value=TRUE) #graphique des différentes moyennes des traitements avec ecart-types
  temps <- as.numeric(gsub("corr_t","",cols_corr))
  courbes_par_traitement<-data.frame()
  for (trt in unique(donnees$Traitement)){
    sous_donnee <- donnees[donnees$Traitement==trt,cols_corr]
    moyennes <- colMeans(sous_donnee, na.rm=TRUE)
    sds <- apply(sous_donnee, 2, sd, na.rm= TRUE)
    df_temps <- data.frame(
      Traitement=trt,
      Temps=temps,
      Moyenne=moyennes,
      SD=sds
    )
    courbes_par_traitement <- rbind(courbes_par_traitement, df_temps)
  }
  ggplot(courbes_par_traitement, aes(x=Temps, y= Moyenne, color=Traitement)) +
    geom_line(linewidth=1)+ #courbe
    geom_point(size=2)+ #points sur la courbes
    geom_errorbar(aes(ymin=Moyenne-SD, ymax=Moyenne+SD),width=0.5)+ #barre d'erreur
    #titres et axes
    labs(
      title="Evolution de l'intensité de luminescence par traitement sur racines (ROSapo)",
      x="Temps (min)",
      y="Intensité corrigée",
      color="Traitements" #titre de la legende
    )+
    scale_y_continuous(breaks=seq(0,max(courbes_par_traitement$Moyenne + courbes_par_traitement$SD),by=50))+ #graduation Y tous les
  50
  theme_minimal()#Theme esthétique du graphique
  theme(
    plot.title=element_text(hjust=0.5, size=14, face="bold"), #titre centré et en gras
    legend.position="right", #légende à droite
    legend.title = element_text(face="bold"), #titre legende en gras
    legend.text = element_text(size=10)
  )
  outliers_par_traitement <- donnees %>% #Calcul des bornes outlier par traitement
  group_by(Traitement) %>%
  mutate(
    Q1 = quantile(AUC, 0.25),
    Q3 = quantile(AUC, 0.75),
    IQR = Q3 - Q1,
    borne_inf = Q1 - 3 * IQR,
    borne_sup = Q3 + 3 * IQR,
    outlier_auc = AUC < borne_inf | AUC > borne_sup
  ) %>%
  ungroup()
  puits_outliers <- outliers_par_traitement %>%
    filter(outlier_auc == TRUE) %>%
    select(Puits, Traitement, AUC)
  print("Puits considérés comme outliers (AUC) dans leur traitement respectif :")
  print(puits_outliers,n=100)
  donnees_sans_outliers<- outliers_par_traitement %>% #creation de 2 jeux de donnees: avec et sans outliers
  filter(!outlier_auc)
  preparer_courbes<-function(donnees_filtrees){
    cols_corr<-grep("corr_t",names(donnees_filtrees), value=TRUE)
    temps <-as.numeric(gsub("corr_t","",cols_corr))
    courbes <-data.frame()
    for (trt in unique(donnees_filtrees$Traitement)){
      sous_donnee<-donnees_filtrees[donnees_filtrees$Traitement==trt,cols_corr]
      moyennes<-colMeans(sous_donnee, na.rm=TRUE)
      sds<-apply(sous_donnee,2, sd, na.rm=TRUE)
      df<-data.frame(
        Traitement=trt,

```

```

Temps=temps,
Moyenne=moyennes,
SD=sds
)
courbes <-rbind(courbes,df)
}
return(courbes)
}
courbes_avec<- preparer_courbes(donnees) #calcul courbes avec/sans outlier
courbes_sans<- preparer_courbes(donnees_sans_outliers)
#creation de 2 graph
install.packages("gridExtra")
library(gridExtra) #pour afficher graph côté à côté
#calcul Y max pour fixer une échelle commune aux 2 graph
ymax <- max(
  courbes_avec$Moyenne + courbes_avec$SD,
  courbes_sans$Moyenne + courbes_sans$SD
)
g1 <- ggplot(courbes_avec, aes(x = Temps, y = Moyenne, color = Traitement)) +
  geom_line(linewidth = 1) +
  geom_point(size = 2) +
  geom_errorbar(aes(ymin = Moyenne - SD, ymax = Moyenne + SD), width = 0.5) +
  labs(title = "Avec outliers", x = "Temps (min)", y = "Intensité corrigée") +
  coord_cartesian(ylim = c(0,ymax))+
  theme_minimal() +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5, face = "bold"))
g2 <- ggplot(courbes_sans, aes(x = Temps, y = Moyenne, color = Traitement)) +
  geom_line(linewidth = 1) +
  geom_point(size = 2) +
  geom_errorbar(aes(ymin = Moyenne - SD, ymax = Moyenne + SD), width = 0.5) +
  labs(title = "Sans outliers", x = "Temps (min)", y = "Intensité corrigée") +
  coord_cartesian(ylim = c(0,ymax))+
  theme_minimal() +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5, face = "bold"))
gridExtra::grid.arrange(g1,g2,ncol=2)
temp <- as.numeric(gsub("corr_t","",grep("^corr_t",names(donnees_sans_outliers), value=TRUE))) #Recalcul AUC SANS outliers
donnees_sans_outliers$AUC <- apply(
  donnees_sans_outliers[,grep ("^corr_t",names(donnees_sans_outliers))],
  1,
  function(y) trapz(temp,y)
)
donnees_sans_outliers$Traitement <- factor(donnees_sans_outliers$Traitement)
donnees_sans_outliers$Traitement <- relevel(donnees_sans_outliers$Traitement, ref = "Mock_dmso") # référence "Mock_dmso"
mod_auc_dmso <- lmer(AUC ~ Traitement + (1 | Repetition) + (1 | Plaque), data = donnees_sans_outliers)
emmmeans_dmso <- emmeans(mod_auc_dmso, pairwise ~ Traitement)
res_dmso_summary <- summary(emmeans_dmso$contrasts)
donnees_sans_outliers$Traitement <- relevel(donnees_sans_outliers$Traitement, ref = "Mock_EtOH") #référence "Mock_EtOH"
mod_auc_etoh <- lmer(AUC ~ Traitement + (1 | Repetition) + (1 | Plaque), data = donnees_sans_outliers)
emmmeans_etoh <- emmeans(mod_auc_etoh, pairwise ~ Traitement)
res_etoh_summary <- summary(emmeans_etoh$contrasts)
# Traitements à comparer
comparaison_dmso <- c("Fengycine0.5", "Fengycine10", "Mycosubtiline10", "Mycosubtiline50")
comparaison_etoh <- c("Surfactine10", "Surfactine50")
ordre <- c(          # Ordre souhaité (ne garder que ceux présents)
  "Mock_dmso", "Fengycine0.5", "Fengycine10", "Mycosubtiline10", "Mycosubtiline50",
  "Mock_EtOH", "Surfactine10", "Surfactine50",
  "Mock_eau", "Flagelline"
)
donnees_filtrees <- donnees_sans_outliers %>%
  filter(Traitement %in% ordre)
# Forcer l'ordre des niveaux uniquement sur les traitements présents après filtrage
donnees_filtrees$Traitement <- factor(donnees_filtrees$Traitement, levels = ordre)
levels(donnees_filtrees$Traitement)      # Vérifier que plus aucun NA n'est dans les niveaux
ggplot(donnees_filtrees, aes(x = Traitement, y = AUC, fill = Traitement)) +  # Plot sans NA
  geom_boxplot(outlier.shape = NA, alpha = 0.7, color = "black") +
  stat_summary(fun = mean, geom = "point", shape = 20, size = 3, color = "red") +
  coord_cartesian(ylim = c(0, 10000)) +
  theme_minimal(base_size = 14) +
  labs(
    title = "Boxplot de l'AUC par traitement (sans outliers), ROSapo sur racines",

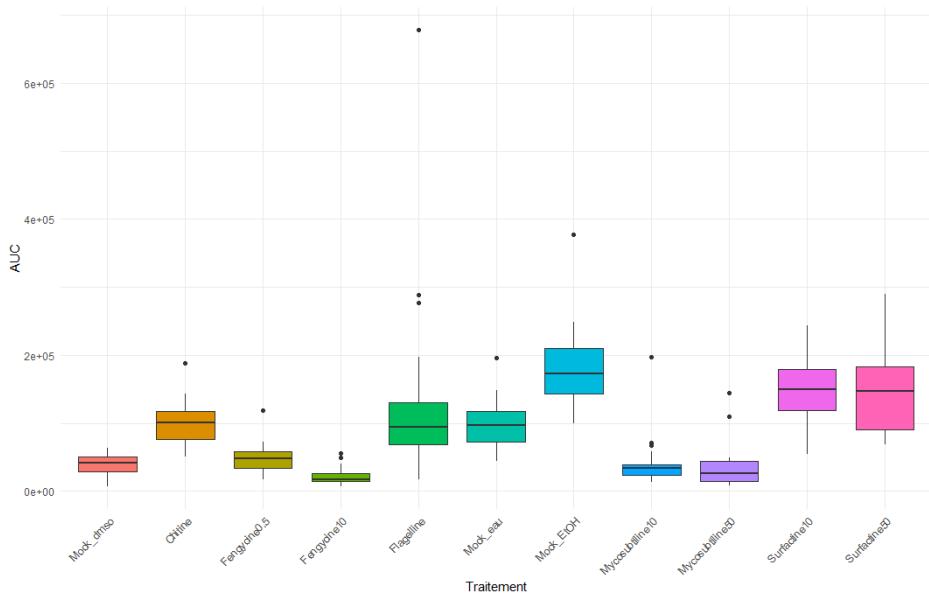
```

```

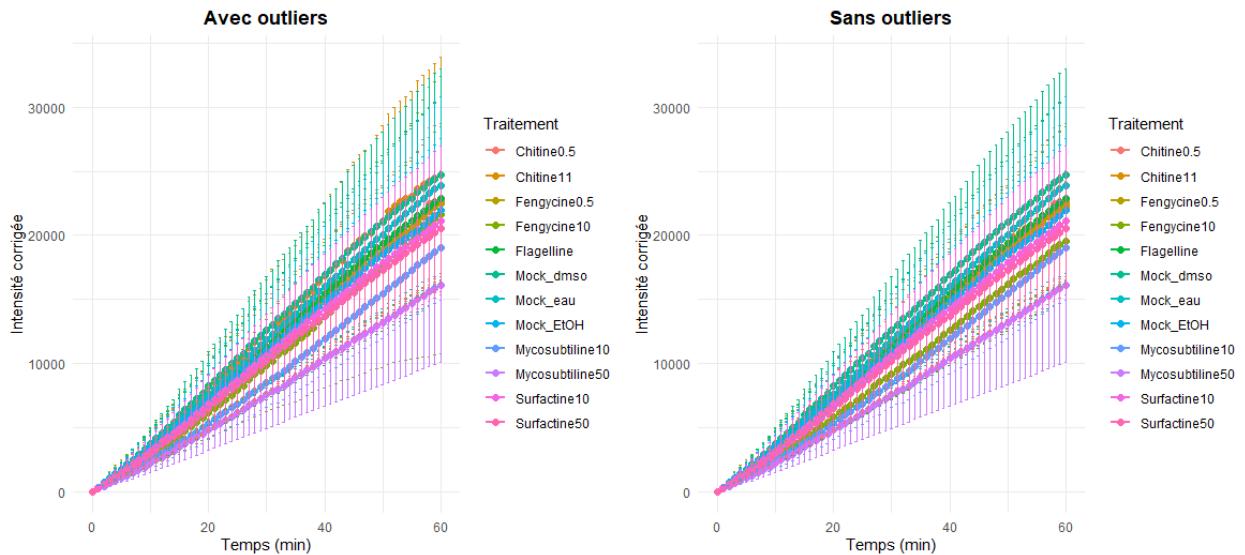
x = "Traitement",
y = "Aire sous la courbe (AUC)"
) +
theme(
  axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1),
  legend.position = "none")
coef_dms0 <- coef(summary(mod_auc_dms0))      #récupérer le tableau fixe de façon plus propre
coef_eto0 <- coef(summary(mod_auc_eto0))
print(coef_dms0)
print(coef_eto0)

```

Annexe 4 : Code pour la réalisation des graphiques de cinétiques de la production de ROS_{apo}, ainsi que le retrait des valeurs aberrantes via la méthode IQR, et les analyses statistiques.



Annexe 5 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS_{apo} foliaires avec les valeurs aberrantes, mesurée par luminescence après application de lipopeptides (surfactine, fengycine et mycosubtiline) sous forme monomérique et micellaire, comparée aux témoins (mock_dms0, mock_EtOH, mock_eau). Chaque boîte à moustache représente l'étendue interquartile, la médiane (trait horizontal), les valeurs extrêmes.



Annexe 6 : Production au cours du temps de ROS intracellulaires racinaires produits par les racines suite à l'application de différents traitements, avec et sans valeurs aberrantes. Les intensités de fluorescence corrigées sont calculées par la soustraction de la première valeur au temps 0.

```

library(readxl)
library(dplyr)
library(tidyr)
library(ggplot2)
library(gridExtra)
library(purrr)
library(broom)
library(car)
install.packages("FSA")
library(FSA)
donnees<-read_excel("d:/Users/Utilisateur/Documents/TFE/ROSintra_racines_final.xlsx")      #Lecture des données
temps <- colnames(donnees)[5:ncol(donnees)] #selection de la colonne de temps (voir selon le fichier)
donnees[temps]<- lapply(donnees[[temps]], as.numeric) #conversion des valeurs en numérique (car présence NA)
donnees_long <- donnees %>% #Passage en format long : 1 ligne = 1 mesure
  pivot_longer(cols = all_of(temps), names_to = "Temps", values_to = "Intensite") %>%
  mutate(Temps = as.numeric(gsub("t", "", Temps)))    # Retire le "t" pour convertir en chiffre
  temps_interp <- sort(unique(donnees_long$Temps))    #Définir les temps communs à interpoler (si analyse à différents temps, j'avais toutes
les 4min et 120s)
  donnees_interp <- donnees_long %>%
  group_by(Puits, Traitement) %>%
  arrange(Temps) %>%
  group_modify(~ {
    if (sum(!is.na(.x$Intensite)) >= 2) {
      tibble(
        Temps = temps_interp,
        Intensite = approx(x = .x$Temps, y = .x$Intensite, xout = temps_interp, rule = 2)$y
      )
    } else {
      tibble(Temps = temps_interp, Intensite = NA_real_)
    }
  }) %>%
  ungroup()
  courbes_avec <- donnees_interp %>%          #Calcul des stats AVEC outliers
  group_by(Traitement, Temps) %>%
  summarise(
    Moyenne = mean(Intensite, na.rm = TRUE),
    SD = sd(Intensite, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  )
  intensite_par_puit <- donnees_interp %>% #Détection des outliers par médiane par Puits x Traitement
  group_by(Puits, Traitement) %>%

```

```

summarise(
  Mediane = median(Intensite, na.rm = TRUE),
  .groups = "drop"
)
outliers_par_puit <- intensite_par_puit %>%
  group_by(Traitement) %>%
  mutate(
    Q1 = quantile(Mediane, 0.25, na.rm = TRUE),
    Q3 = quantile(Mediane, 0.75, na.rm = TRUE),
    IQR = Q3 - Q1,
    borne_inf = Q1 - 3 * IQR,
    borne_sup = Q3 + 3 * IQR,
    outlier = Mediane < borne_inf | Mediane > borne_sup
  ) %>%
  ungroup()
puits_outliers <- outliers_par_puit %>%
  filter(outlier == TRUE) %>%
  select(Puits, Traitement)
print(puits_outliers)
donnees_sans_outliers <- donnees_interp %>% #Retirer les outliers
anti_join(puits_outliers, by = c("Puits", "Traitement"))
#Calcul des stats SANS outliers
courbes_sans <- donnees_sans_outliers %>%
  group_by(Traitement, Temps) %>%
  summarise(
    Moyenne = mean(Intensite, na.rm = TRUE),
    SD = sd(Intensite, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  )
ymax <- max(                                #Échelle Y commune
  courbes_avec$Moyenne + courbes_avec$SD,
  courbes_sans$Moyenne + courbes_sans$SD,
  na.rm = TRUE
)
g1 <- ggplot(courbes_avec, aes(x = Temps, y = Moyenne, color = Traitement)) +      #Graphique AVEC outliers
  geom_line(linewidth = 1) +
  geom_point(size = 2) +
  geom_errorbar(aes(ymin = Moyenne - SD, ymax = Moyenne + SD), width = 0.5) +
  labs(title = "Avec outliers", x = "Temps (min)", y = "Intensité corrigée") +
  coord_cartesian(ylim = c(0, ymax)) +
  theme_minimal() +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5, face = "bold"))
g2 <- ggplot(courbes_sans, aes(x = Temps, y = Moyenne, color = Traitement)) +      #Graphique SANS outliers
  geom_line(linewidth = 1) +
  geom_point(size = 2) +
  geom_errorbar(aes(ymin = Moyenne - SD, ymax = Moyenne + SD), width = 0.5) +
  labs(title = "Sans outliers", x = "Temps (min)", y = "Intensité corrigée") +
  coord_cartesian(ylim = c(0, ymax)) +
  theme_minimal() +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5, face = "bold"))
grid.arrange(g1, g2, ncol = 2)      #Affichage côté à côté
ymax <- max( #Création de 4 graphiques, Echelle commune
  courbes_avec$Moyenne + courbes_avec$SD,
  courbes_sans$Moyenne + courbes_sans$SD,
  na.rm = TRUE
)
groupes <- list(                      #définition groupes de traitement
  G1 = c("Mock_eau", "Flagelline", "Chitine0.5", "Chitine11"),
  G2 = c("Mock_dmso", "Mycosubtiline10", "Mycosubtiline50"),
  G3 = c("Mock_dmso", "Fengycine0.5", "Fengycine10"),
  G4 = c("Mock_EtOH", "Surfactine10", "Surfactine50")
)
#definition couleurs
palette_G1 <- c("Mock_eau" = "#1b9e77", "Flagelline" = "#d95f02", "Chitine0.5" = "#7570b3", "Chitine11" = "#e7298a")
palette_G2 <- c("Mock_dmso" = "#66a61e", "Mycosubtiline10" = "#d95f02", "Mycosubtiline50" = "#7570b3")
palette_G3 <- c("Mock_dmso" = "#66a61e", "Fengycine0.5" = "#e6ab02", "Fengycine10" = "#a6761d")
palette_G4 <- c("Mock_EtOH" = "#e41a1c", "Surfactine10" = "#66a61e", "Surfactine50" = "#984ea3")
graph_list <- lapply(names(groupes), function(nom) {          #generation graph
  traitements <- groupes[[nom]]
  data_group <- courbes_sans %>% filter(Traitement %in% traitements)
})

```

```

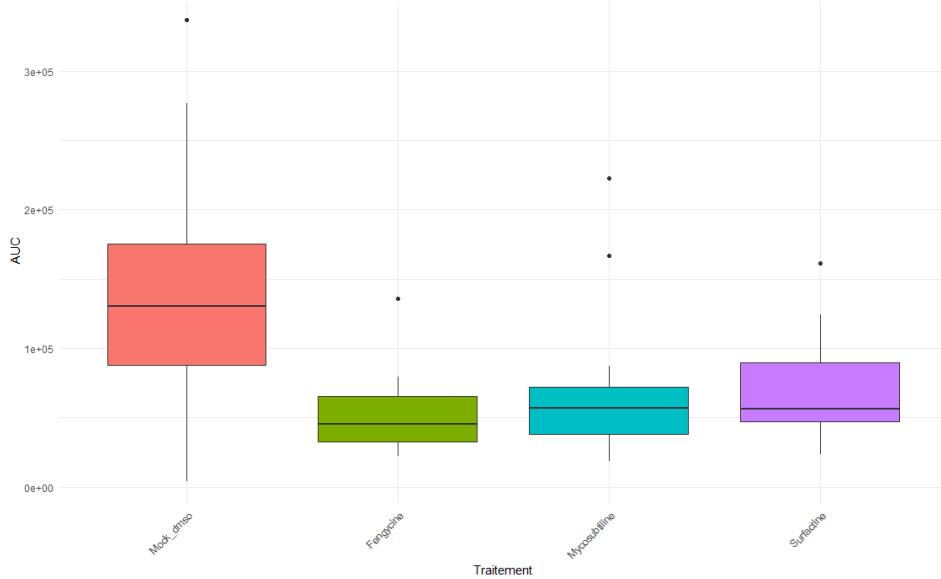
palette <- switch(nom,
  G1 = palette_G1,
  G2 = palette_G2,
  G3 = palette_G3,
  G4 = palette_G4)
ggplot(data_group, aes(x = Temps, y = Moyenne, color = Traitement)) +
  geom_line(linewidth = 1) +
  geom_point(size = 2) +
  geom_errorbar(aes(ymin = Moyenne - SD, ymax = Moyenne + SD), width = 0.5) +
  scale_color_manual(values = palette) +
  labs(title = nom, x = "Temps (min)", y = "RFU") +
  coord_cartesian(ylim = c(0, ymax)) +
  theme_minimal() +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5, face = "bold"))
})
grid.arrange(grobs = graph_list, ncol = 2)
print(unique(courbes_sans$Traitement))
puits_finaux <- donnees_sans_outliers %>%
  group_by(Puits, Traitement) %>%
  filter(Temps == max(Temps)) %>%
  ungroup()
diagnostics_anova <- list() # Comparaison statistique (ANOVA + Tukey HSD)
resultats <- map(names(groupes), function(nom) {
  traitements <- groupes[[nom]]
  data_test <- puits_finaux %>% filter(Traitement %in% traitements)
  if (length(unique(data_test$Traitement)) > 1) {
    # ANOVA
    mod <- aov(Intensite ~ Traitement, data = data_test)
    shapiro_res <- shapiro.test(residuals(mod))
    levene_res <- leveneTest(Intensite ~ as.factor(Traitement), data = data_test)
    # Vérification conditions ANOVA
    conditions_ok <- ifelse(shapiro_res$p.value > 0.05 & levene_res$`Pr(>F)`[1] > 0.05, "OK", "Non OK")
    if (conditions_ok == "OK") {
      # ANOVA + Tukey
      tukey <- TukeyHSD(mod)
      tukey_tidy <- tidy(tukey) %>% mutate(Groupe = nom, Test = "Tukey")
      diagnostics <- tibble(Groupe = nom, Shapiro_p = shapiro_res$p.value, Levene_p = levene_res$`Pr(>F)`[1], Conditions_OK = conditions_ok)
      return(list(tukey = tukey_tidy, diagnostics = diagnostics, kruskal = NULL))
    } else {
      # Kruskal-Wallis
      kruskal_res <- kruskal.test(Intensite ~ Traitement, data = data_test)
      # Test post-hoc Dunn si Kruskal significatif
      if (kruskal_res$p.value < 0.05) {
        dunn_res <- dunnTest(Intensite ~ Traitement, data = data_test, method = "bonferroni")
        dunn_tidy <- dunn_res$res %>%
          rename(term = Comparison, adj.p.value = P.adj) %>%
          mutate(Groupe = nom, Test = "Dunn")
      } else {
        dunn_tidy <- tibble(term = NA, adj.p.value = NA, Groupe = nom, Test = "Dunn")
      }
      diagnostics <- tibble(Groupe = nom, Shapiro_p = shapiro_res$p.value, Levene_p = levene_res$`Pr(>F)`[1], Conditions_OK = conditions_ok)
      return(list(tukey = NULL, diagnostics = diagnostics, kruskal = tibble(statistic = kruskal_res$statistic, p.value = kruskal_res$p.value, Groupe = nom), dunn = dunn_tidy))
    }
  } else {
    # Pas assez de groupes
    diagnostics <- tibble(Groupe = nom, Shapiro_p = NA, Levene_p = NA, Conditions_OK = "Non testé")
    tukey_tidy <- tibble(term = NA, contrast = NA, estimate = NA, conf.low = NA, conf.high = NA, adj.p.value = NA, Groupe = nom, Test = "Tukey")
    return(list(tukey = tukey_tidy, diagnostics = diagnostics, kruskal = NULL, dunn = NULL))
  }
})
tests_tukey <- map_df(resultats, "tukey") %>% filter(!is.na(adj.p.value)) # Extraction des résultats
diagnostics_anova <- map_df(resultats, "diagnostics")
tests_kruskal <- map_df(resultats, "kruskal")
tests_dunn <- map_df(resultats, "dunn") %>% filter(!is.na(adj.p.value))
print(diagnostics_anova) # Affichage des diagnostics
print(tests_tukey %>% filter(adj.p.value < 0.05)) # Affichage des tests significatifs

```

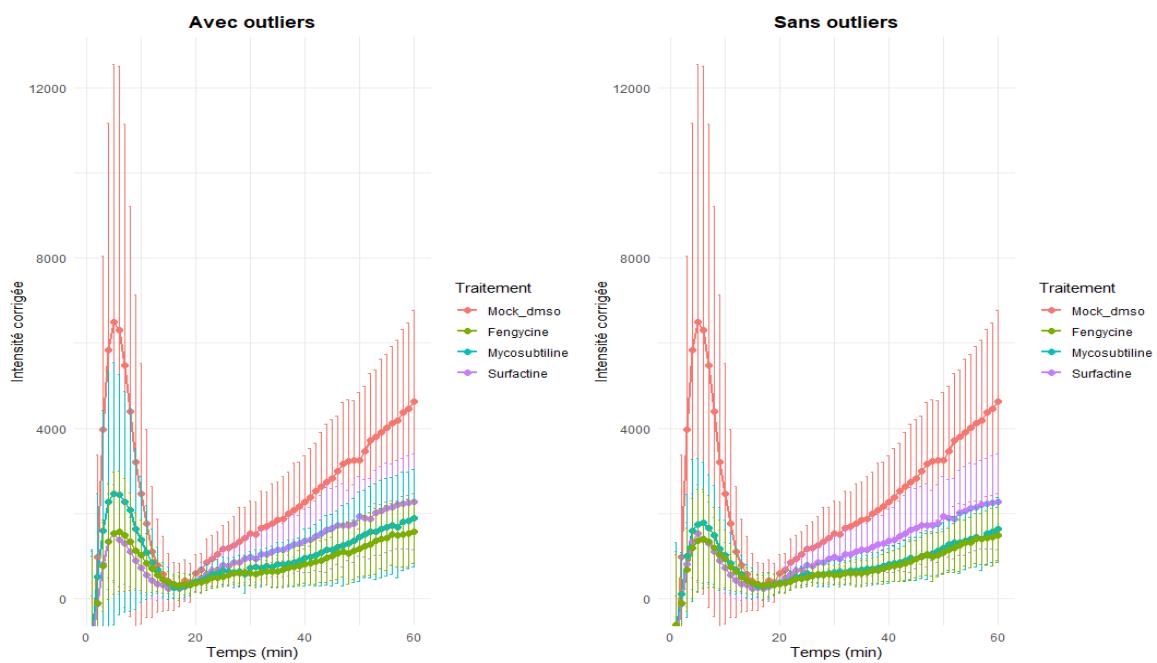
```

print(tests_kruskal %>% filter(p.value < 0.05))
print(tests_dunn %>% filter(adj.p.value < 0.05))
print(tests_resultats %>% filter(!is.na(adj.p.value) & adj.p.value < 0.05)) #Affichage des résultats significatifs
Annexe 7 : Code pour la réalisation des graphiques de cinétiques de la production de ROSintra, ainsi que le retrait des valeurs aberrantes via la méthode IQR, et les analyses statistiques.

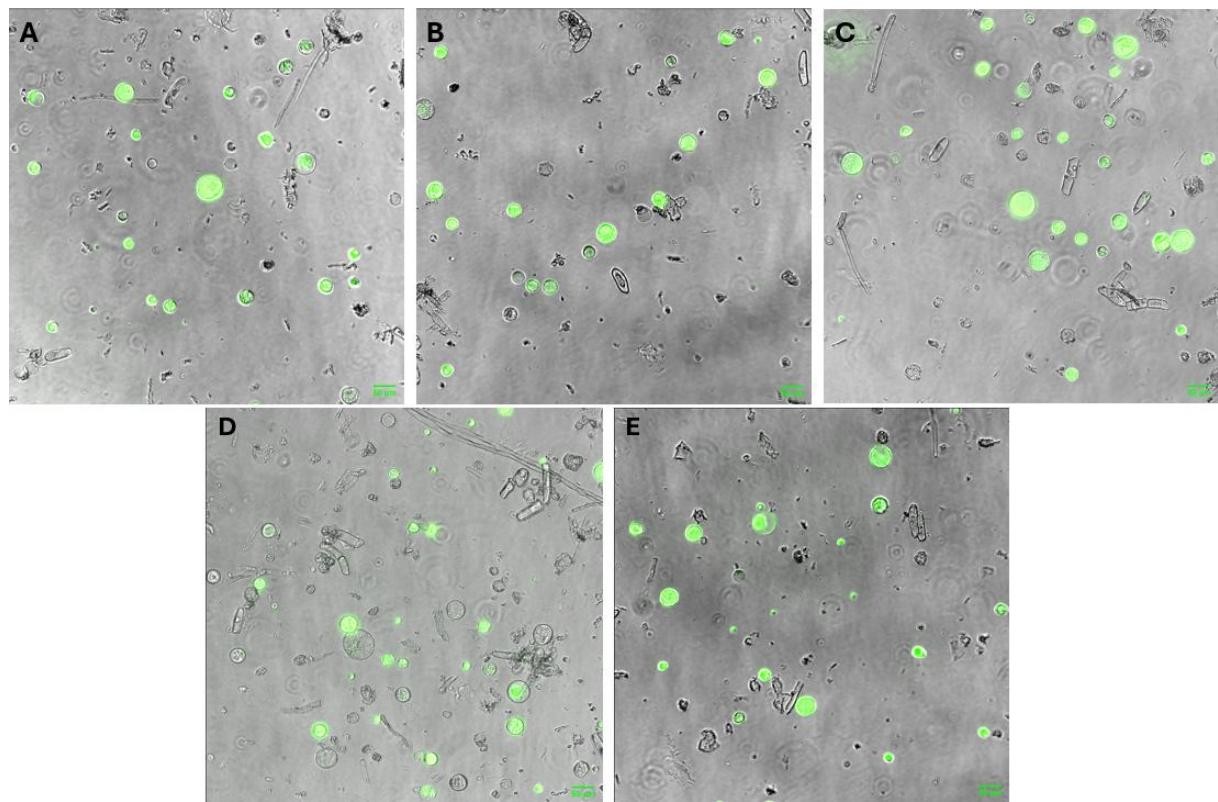
```



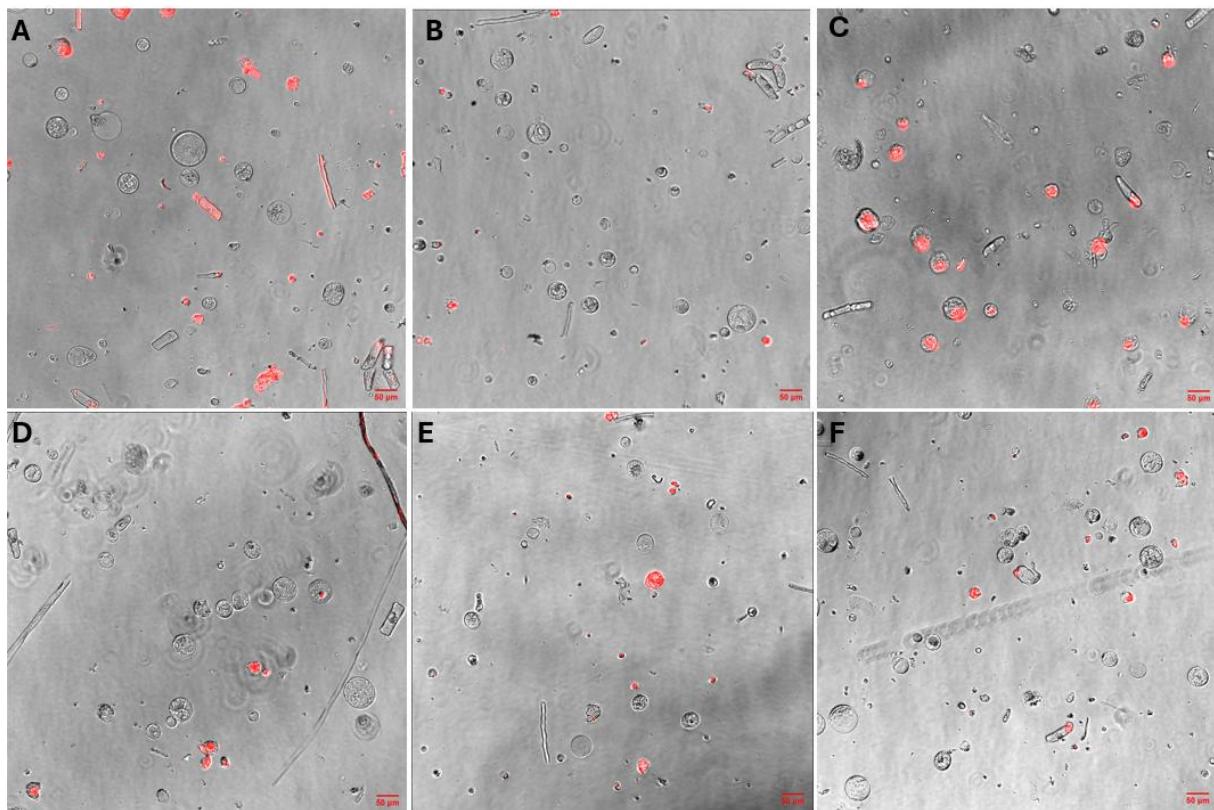
Annexe 8 : Aires sous la courbe de la cinétique de la production de ROS_{apo} foliaires avec les valeurs aberrantes lors des tests SIA, mesurée par luminescence après application de chitine. Les racines sont prétraitées avec les différents lipopeptides (surfactine, fengycine et mycosubtiline) sous forme monomérique. Chaque boîte à moustache représente l'étendue interquartile, la médiane (trait horizontal), les valeurs extrêmes.



Annexe 9 : Intensité de luminescence corrigée représentant la production de ROS_{apo} foliaires avec et sans valeurs aberrantes au cours du temps pour les tests SIA.



Annexe 10 : Images microscopiques des protoplastes avec la sonde FDA, évaluation de la viabilité des protoplastes. (A)Blanc/protoplastes seuls, (B)mock_dmso, (C) Surfactine [10 μ M], (D) Mycosubtiline [10 μ M], (E)Fengycine [0,5 μ M].



Annexe 11 : Images microscopiques des protoplastes avec le PI, test de perméabilisation des membranes. (A) Blanc, (B) mock_dmso, (C) Triton, (D) Surfactine [10µM], (E) Mycosubtiline [10µM], (F) Fengycine [0,5µM].