
Impact des conditions nutritionnelles sur la quantité et sur la variété structurale et fonctionnelle des surfactines produites par *Bacillus Amyloliquefaciens*

Auteur : Fassotte, Cyril

Promoteur(s) : Ongena, Marc

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

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

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3094>

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.

**IMPACT DES CONDITIONS
NUTRITIONNELLES SUR LA QUANTITÉ ET
SUR LA VARIÉTÉ STRUCTURALE ET
FONCTIONNELLE DES SURFACTINES
PRODUITES PAR *BACILLUS*
*AMYLOLIQUEFACIENS***

CYRIL FASSOTTE

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

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR: MARC ONGENA

©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 le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT

**IMPACT DES CONDITIONS
NUTRITIONNELLES SUR LA QUANTITÉ ET
SUR LA VARIÉTÉ STRUCTURALE ET
FONCTIONNELLE DES SURFACTINES
PRODUITES PAR *BACILLUS*
*AMYLOLIQUEFACIENS***

CYRIL FASSOTTE

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

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR: MARC ONGENA

REMERCIEMENTS

J'adresserai mes premiers remerciements à Marc et Anthony pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée au cours de ces derniers mois. Leurs conseils avisés et le temps qu'ils m'ont consacré pour m'aiguiller dans la réalisation de ce mémoire ont été extrêmement importants. Travailler à leur côté était également toujours plaisant, ils ont su allier constructivité, efficacité, ambiance décontractée et humour pour chaque réunion (dont celles de crise).

Ensuite, je souhaiterais remercier Aurélien pour ses conseils et son encadrement en laboratoire. Merci aussi à Cathy pour sa disponibilité et sa bonne humeur et à Sébastien pour avoir réalisé avec moi la RT-qPCR qui nécessitait clairement au moins quatre bras.

Merci aussi à Marina et Margue sans qui le MiPI ne serait pas pareil.

Un grand merci à ma famille qui m'a permis de réaliser ces études. Un remerciement particulier pour ma mère qui, au cours de ces quelques années à la Fac, a toujours cru en moi, a consacré une part énorme de son temps à se soucier de mon avenir, a partagé mon stress dans les moments plus ardues et a su me supporter au fil des 21 blocus que j'ai endurés. Merci également pour les relectures de nombreuses versions provisoires de TFE, mine de rien, ça m'a fait gagner du temps. Merci à mon père pour ses encouragements ces dernières semaines (et notamment ses conseils consistant à faire bouillir du café dans du RedBull™ pour devenir efficace). Merci à Brigitte pour ses mots d'encouragement et ses bons conseils.

Clémentine, Chloé, Sophie : merci de vous êtes proposées pour relire un TFE de chimiste, je sais que ce n'est pas votre tasse de thé, mais ça m'a vraiment été utile ! Merci aussi pour les encouragements lors de la dernière ligne droite, vous avez su me remotiver quand il le fallait !

Amandine : merci (de ta compréhension).

Merci à tous mes partenaires chimistes, surtout Lydie, Amélie, Hugo et Amandine, on est une « bonne » team.

Pour mes partenaires de randos (Sergio, Slash, Limpi, Lucas, Belette, Kevin) avec qui j'ai partagé ces années d'études, je tiens à vous dire que ce n'aurait pas été pareil sans vous ! Merci pour tous ces moments inoubliables.

Un merci particulier à mes co-koteurs ! La CDG vaincra l'ennemi, toujours. (Merci Chewbie pour m'avoir supporté ce mois-ci).

Enfin, un salut exceptionnel aux Clochards Burlesques qui font des vieux murs de cette Faculté, un endroit où il fait bon vivre, que ce soit au soleil sur un plot ou en pleine action dans le « local » (Pas touche à la déco !). Merci les gars, vous avez été, vous êtes et vous serez toujours aussi moche ment parfaits !

RÉSUMÉ – ABSTRACT

RÉSUMÉ

Le présent travail analyse l'impact des conditions nutritionnelles sur la production de surfactines par *Bacillus amyloliquefaciens*. Cette analyse se fait au travers de trois aspects : la diversité structurale des surfactines, la dynamique de production de celles-ci et leurs activités biologiques. Dans un premier temps, la comparaison de différents milieux de cultures a permis de sélectionner le milieu RE (« recomposed exudates ») comme milieu reproduisant suffisamment bien les conditions nutritionnelles de la rhizosphère. La diversité structurale a été analysée par UPLC-MS et a mis en évidence, en comparaison au milieu riche LB, la production supplémentaire de trois variants de surfactine lorsque *B. amyloliquefaciens* est cultivé en milieu RE. Des analyses UPLC-MS et une RT-qPCR ont permis de comparer la quantité de surfactines et l'expression des gènes associés à la biosynthèse de celles-ci en milieu RE et en milieu LB. L'activité biologique des surfactines produites en milieu RE a été évaluée *via* deux expérimentations : un test d'antagonisme sur deux phytopathogènes bactériens et un test ROS (« reactive oxygen species ») permettant d'estimer le pouvoir éliciteur des surfactines.

ABSTRACT

The present work analyzes the impact of nutritional conditions on the production of surfactins by *Bacillus amyloliquefaciens*. These analyses are carried out through three aspects: the structural diversity of surfactins, the dynamics of their production and their biological activities. In a first step, the comparison of different culture media lead us to select the RE medium ("recomposed exudates") as a medium that reproduced the nutritional conditions of the rhizosphere sufficiently well. The structural diversity was analyzed by UPLC-MS and showed, in comparison with the rich LB medium, the additional production of three variants of surfactin when *B. amyloliquefaciens* is grown in RE medium. UPLC-MS and RT-qPCR analyzes were used to compare the amount of surfactins and the expression of the genes associated with the biosynthesis of these in RE and LB media. The biological activity of surfactins produced in RE medium was evaluated by two experiments: an antagonism test on two bacterial phytopathogens and a reactive oxygen species (ROS) test to estimate the eliciting power of surfactins.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	- 8 -
Introduction	- 10 -
Revue bibliographique	- 12 -
1 Bacillus sp. : source d'antibiotiques	- 12 -
1.1 Diversité des composés antimicrobiens produits par Bacillus sp.....	- 13 -
1.2 Non-ribosomal synthesized peptides (NRPs) & polyketides (PKs)	- 14 -
2 Les lipopeptides : métabolites polyvalents.....	- 16 -
2.1 Description générale des LPs	- 16 -
2.1.1 Diversité structurale	- 17 -
2.1.2 Diversité de fonctions.....	- 17 -
2.2 LPs chez Bacillus sp.....	- 18 -
2.2.1 Structures moléculaires des cLPs	- 18 -
2.2.2 Fonctions principales des cLPs dans le biocontrôle	- 21 -
3 Système immunitaire des végétaux	- 23 -
3.1 Défenses immunitaires	- 23 -
3.2 Surfactine & ISR	- 26 -
4 B. amyloliquefaciens & biocontrôle.....	- 27 -
Objectifs et stratégie du projet.....	- 30 -
Matériel & méthodes	- 31 -
1 Souches & milieux	- 31 -
1.1 Souches utilisées.....	- 31 -
1.2 Milieux de cultures.....	- 32 -
1.2.1 Milieux classiques	- 32 -
1.2.2 Milieu « exsudats naturels »	- 32 -
2 Cultures	- 33 -
2.1 Manipulations préalables à l'inoculation des milieux de cultures.....	- 33 -
2.2 Cultures liquides.....	- 33 -
2.2.1 Cultures en fioles.....	- 33 -
2.2.2 Cultures en microplaques	- 33 -
2.3 Cultures in planta.....	- 34 -

3	Techniques chromatographiques.....	- 35 -
3.1	Analyses UPLC-MS.....	- 35 -
3.1.1	Identification : méthode « fragmentation »	- 35 -
3.1.2	Quantification : méthode « 3 familles »	- 36 -
3.2	Fractionnement HPLC.....	- 36 -
4	Techniques PCR.....	- 37 -
4.1	Etape d'extraction de l'ARN.....	- 37 -
4.2	Etape RT.....	- 37 -
4.3	Etape qPCR	- 38 -
5	Tests « ROS » intracellulaires.....	- 39 -
5.1	Préparations des solutions	- 39 -
	Tests ROS.....	- 39 -
	Resultats	- 41 -
1	Caracterisation par UPLC-MS des homologues de surfactines produits selon différentes conditions de croissance.....	- 41 -
1.1	homologues de surfactines produits en milieu LB	- 45 -
1.2	homologues de surfactines produits in planta	- 47 -
1.3	homologues de surfactines produits en milieu « exsudats naturels »	- 50 -
1.4	homologues de surfactines produits en milieu « recomposed exudates » (RE)	- 52 -
1.5	Comparaison a des homologues produits par une souche de Bacillus endophyte en milieux LB et RE.....	- 54 -
2	Analyse comparée de la dynamique de production de surfactines en fonction du milieu de culture - 62 -	
2.1	Etude de l'évolution de la quantité de surfactines produite en milieux LB et RE par UPLC-MS.....	- 62 -
2.1.1	Dynamique de production de surfactines en milieu RE	- 62 -
2.1.2	Comparaison des quantités de surfactines produites en milieu LB et RE	- 63 -
2.2	Etude de l'évolution de l'expression du gène srfA en fonction de la biomasse et du milieu du culture par RT-qPCR.....	- 64 -
3	Etude des relations structure – fonction	- 66 -
3.1	Activité antimicrobienne : tests d'antagonisme.....	- 67 -
3.2	Activité élicitrice : tests ROS	- 70 -
	Discussion générale & perspectives	- 72 -
	Références bibliographiques	- 76 -

LISTE DES ABRÉVIATIONS

NRPs: Nonribosomal Peptides
NRPSs: Nonribosomal Peptide synthetases
LPs: Lipopeptides
PKs: Polyketides
PKSs: Polyketides synthases
PCP: Peptidyl Carrier Protein
TE: Thioestérase
CoA: Co-enzyme A
cLPs : cyclic Lipopeptides
a.a: acide aminé
PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern
DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern
MAMP: Microbe-Associated Molecular Pattern
PTI: Primary Innate Immunity
ETI: Effector-Triggered Immunity
Avr: Avirulence protein
HR: Hypersensitive Response
LAR: Local Acquired Resistance
SAR: Systemic Acquired Resistance
ISR: Induced Systemic Resistance
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
AND: Acide désoxyribonucléique
LB: Lysogeny Broth
RE: Recomposed Exudates
ROS: Reactive Oxygen species
DO: Densité Optique
PCR : Polymerase Chain Reaction

MS: Mass Spectrometry

UPLC: Ultra performance liquid chromatography

UPLC-MS: Ultra performance liquid chromatography Mass Spectrometry

HPLC: High-performance liquid chromatography

RT-qPCR: Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

ESI+: Electro Spray Ionization (positive)

DNase: Deoxyribonuclease

RNA: Ribonucleic Acid

ACN: Acetonitrile

MS-MS: Tandem mass spectrometry

AG: Acide Gras = FA

FA: Fatty Acid

INTRODUCTION

Depuis sa naissance, la pratique de l'agriculture a toujours été accompagnée des ravages liés aux insectes, bactéries, nématodes et autres indésirables dont les cycles de vie sont, d'une façon ou d'une autre, liés aux plantes cultivées. Les pathogènes bactériens et viraux, les « mauvaises herbes », les animaux et les insectes sont responsables, ensemble, de la perte de 20 à 40% de la production agricole mondiale (Savary *et al.*, 2012). Au début du XX^{ème} siècle, l'émergence des pesticides de synthèse (parmi lesquels se retrouvent les « célèbres » organophosphorés, pour ne citer qu'eux) apporte un certain nombre de solutions à ces problèmes. Mais la croissance démographique ainsi que l'évolution du modèle économique occidental et notre mode de consommation nous poussent à faire de ces produits phytosanitaires un usage intensif. Voilà maintenant quelques années que leurs effets néfastes pour l'environnement et la santé sont étudiés, voire ressentis (Pimentel *et al.*, 2005). Face à ces constats, des solutions dites biologiques ainsi que des engagements politiques durables ne cessent d'être créés et de se développer depuis plus de vingt ans (Willer *et al.*, 2016).

Parmi ces innovations, certains microorganismes et substances naturelles sont utilisés dans le but d'amoinrir les pertes agricoles. Les bactéries et les molécules bioactives (très souvent produites par ces mêmes-bactéries) présentant de tels effets sur les cultures sont appelées agents de bio-contrôle (Glare *et al.*, 2012). Il s'agit d'un terme générique qui regroupe beaucoup de modes de fonctionnement différents qui, pour certains, seront détaillés à la section 4. Pour donner une idée du progrès de la Science dans ce domaine, entre 2012 et 2017, l'augmentation annuelle de la diversité des agents de bio-contrôle est estimée à 16.1% (contre seulement 3% pour les pesticides classiques) (Villaverde *et al.*, 2016).

Jusque fin des années 90, les industries ne faisaient que suivre timidement les efforts scientifiques (Willer *et al.*, 2016). Depuis, le manque d'implication du secteur privé s'est largement atténué : les grandes entreprises de (bio-)technologies agricoles montrent un intérêt croissant envers le contrôle biologique des cultures (Glare *et al.*, 2012) et le marché du bio ne cesse de prendre de l'ampleur, du moins dans les pays développés (Figure 1) (Willer *et al.*, 2016). Cela peut s'expliquer d'une part les préoccupations sociétales quant enjeux de santé publique (Pimentel *et al.*, 2005). De plus, d'un point de vue économique, il devient de plus en plus difficile et coûteux de « découvrir » une nouvelle molécule potentiellement intéressante comme pesticide de synthèse. Il faut approximativement un screening de 140 000 composés différents pour en trouver un seul qui mériterait l'attention des industriels. S'ajoute à cela le développement du produit fini qui représente un budget de plus de 230 millions d'euros étalé sur environ 10 ans (contre 3 à 5 millions pour un bio-pesticide) (Marrone, 2011). Les agents de bio-contrôle deviennent donc davantage attractifs car le temps d'élaboration de tels agents et les coûts de production qui leur sont associés sont plus intéressants que ceux liés aux pesticides de synthèse.

World: Growth of the global market for organic food & drink, 1999-2014

Source: Organic Monitor

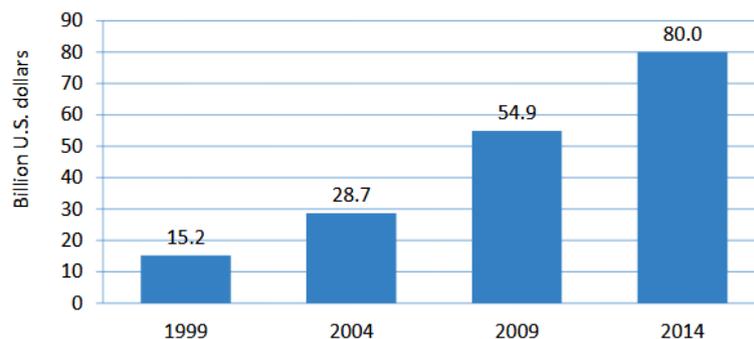


Figure 1: Evolution du marché mondial de l'alimentation biologique entre 1999 et 2014. Source : Willer *et al.*, 2016.

Parmi les microorganismes couramment utilisés à ces fins, le genre *Bacillus* est tout aussi intéressant que prometteur. En effet, *Bacillus* sp. secrètent un large éventail de métabolites d'intérêt, ce qui les rend assez polyvalents en tant qu'agents de bio-contrôle (Chen *et al.*, 2007). De plus, leur capacité à former de résistantes spores est un atout certain pour la formulation et le stockage de tels bio-pesticides. A ce titre, *Bacillus thuringiensis*, *amyloliquefaciens*, *subtilis* et *pumilus* ont déjà fait l'objet de produits biologiques fongicides disponibles dans le commerce (Pérez- Garcia *et al.*, 2011).

Comme évoqué plus haut, les *Bacillus* peuvent produire beaucoup de métabolites. En effet, Chen *et al.*, 2007, ont montré que 8.5% du génome de *B. amyloliquefaciens* FZB42 étaient consacrés à la production d'un certain type de métabolites secondaires antimicrobiens (les NRPs et PKs, cfr. section 1.2). Par ailleurs, le séquençage complet de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499 par Molinatto *et al.*, 2016, a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes impliqués non seulement dans la production de substances ayant une activité de bio-contrôle, mais aussi dans les interactions chimiques avec les racines des plantes hôtes.

Malgré l'importante diversité de composés antibiotiques produits par ces souches, l'efficacité du biocontrôle généré de la sorte est très variable. (Bing *et al.*, 2014.) Cette variabilité peut être expliquée par les différents contextes environnementaux et par le nombre et la complexité des interactions moléculaires qui règnent au sein de la rhizosphère². Les « dialogues » chimiques entre les organismes du sol, entre eux d'une part et avec la plante d'autre part, font de cet écosystème un environnement riche et extrêmement difficile à comprendre en détails. Chaque acteur pouvant influencer le comportement des autres (Cawoy2015, Dessaux *et al.*, 2016). Même si ce qui constitue exactement ces interactions reste encore une énigme à résoudre, il ressort des études qui ont déjà été faites à ce sujet qu'il ne faut plus considérer les intervenants de la rhizosphère séparément, mais bien comme un

² La rhizosphère est la zone du sol, confinée et riche en nutriments, qui est directement influencée par les exsudats et débris racinaires (Venturi & Keel, 2016 ; Dessaux *et al.*, 2016).

ensemble d'organismes qui ont co-évolué, s'influençant les uns les autres. Ce faisant, cet écosystème à part entière peut être qualifié « d'holobionte »³ (Dessaux *et al.*, 2016).

Il paraît évident que la plante joue un rôle majeur dans cette niche écologique en tentant d'en « bannir » ceux qui altèrent son développement et/ou sa santé et en « sélectionnant » les organismes qui lui sont bénéfiques (Bulgarelli *et al.*, 2012 ; Venturi and Keel, 2016). Parmi les bactéries du sol qui peuvent protéger les plantes et/ou promouvoir leur développement, le genre *Bacillus* en est un très bon exemple : certaines souches comptent parmi les agents de biocontrôle les plus efficaces (Cawoy *et al.*, 2014 ; McSpadden Gardener *et al.*, 2004). Les deux chapitres suivants sont consacrés à la présentation de ce dernier et aux moyens dont il dispose pour avoir un tel effet.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 *BACILLUS* SP. : SOURCE D'ANTIBIOTIQUES

Parmi les bactéries, le genre *Bacillus* constitue un genre ubiquitaire⁴ et extrêmement diversifié. Les *Bacillus* sont Gram positifs et ont en commun plusieurs caractéristiques : la façon dont ils tirent leur énergie, à savoir aérobies (respiration) et parfois anaérobies facultatifs (fermentation notamment), leur forme en bâtonnet, leur capacité à former des spores lors de conditions défavorables, etc. (Zhao *et al.*, 2016). Leurs rôles dans les écosystèmes sont aussi très variables et parfois importants. Nous pouvons relever ici le cas de *Bacillus megaterium*, impliqué dans la minéralisation du phosphore organique dans les sols. Si certaines espèces sont pathogènes (pour l'homme, les animaux, les plantes, ...), d'autres présentent des activités d'intérêts dans plusieurs domaines comme l'agriculture (biocontrôle), la santé (screening d'antibiotiques), ... (Zhao *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2007).

En ce qui concerne ces « *Bacillus* d'intérêts », certains sont utilisés pour les métabolites qu'ils produisent. En effet, plusieurs d'entre eux sécrètent des substances ayant des activités antimicrobiennes et/ou antifongiques. A titre d'exemple, dans le milieu médical, les tests de réactions à la bacitracine produite par *B. licheniformis* et *B. subtilis* permettent d'identifier certains types de streptocoques qui y sont particulièrement sensibles (Zarei *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2016). Il existe ainsi une très grande variété de composés antibactériens synthétisés par les *Bacillus*. Les scientifiques ont donc été naturellement amenés à les organiser et à les catégoriser (pour *Bacillus* sp., mais aussi pour les bactéries dans leur ensemble) (Tracanna *et al.*, 2017).

³ Association étroite entre individus d'espèces distinctes durant une période non négligeable de leur temps de vie. Les organismes faisant partie de cette association sont les biontes et le tout est l'holobionte (Dessaux *et al.*, 2016).

⁴ i.e. présents dans l'ensemble de la biosphère. Ils peuvent être retrouvés dans les sols, les roches, la poussière, les milieux aquatiques, le tube gastro-intestinal des animaux, etc. (Zhao *et al.*, 2016)

1.1 DIVERSITÉ DES COMPOSÉS ANTIMICROBIENS PRODUITS PAR *BACILLUS* SP.

En conséquence à l'essor de l'agriculture biologique et au nombre croissant de pathogènes qui développent de nouvelles formes de résistance aux antibiotiques couramment utilisés, le monde scientifique ne cesse de chercher et d'étudier de nouvelles classes de molécules qui ont un certain potentiel en tant qu'antibiotique (Zhao *et al.*, 2016 ; Tracanna *et al.*, 2017).

Il est possible d'établir une classification de ces composés antimicrobiens en fonction de la façon dont ils sont synthétisés au sein des microorganismes. A cette fin, il est nécessaire d'explorer et d'analyser des bases de données qui regroupent les séquences génomiques d'un grand nombre de *Bacillus*. Certains programmes, tels BAGEL3[®], antiSMASH[®] et BLAST[®], permettent de mettre en évidence des groupes de gènes impliqués dans la production de ces métabolites. De plus, avec ces outils, il est également possible de prédire les fonctions et/ou propriétés de certains composés encore inconnus en comparant leur séquence avec des séquences similaires encodées dans ces mêmes bases de données. (Zhao *et al.*, 2016 ; Tracanna 2017). Le tableau 1 dresse un aperçu de cette classification et donne quelques exemples de métabolites synthétisés par *Bacillus*.

VOIE DE SYNTHÈSE	CLASSIFICATION	EXEMPLES	RÉFÉRENCES
RIBOSOMALLY SYNTHESIZED ANTIMICROBIAL PEPTIDES (BACTÉRIOCINES)	Classe I Petites bactériocines (moins de 10 kDa) synthétisées <i>via</i> les ribosomes et subissant des modifications post-traductionnelles	Subtiline, amylocycline, plantazolicine, ...	(Abriouel <i>et al.</i> , 2010)
	Classe II Petites bactériocines (moins de 10 kDa) synthétisées <i>via</i> les ribosomes. Aucune modification post-traductionnelle	Coaguline, lichénine, ...	(Abriouel <i>et al.</i> , 2010)
	Classe III Grandes bactériocines (plus que 10 kDa)	Megacine, colicine, ...	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
NON-RIBOSOMAL SYNTHESIZED PEPTIDES (NRPS) AND POLYKETIDES (PKS)	Lipopeptides (LPs) Métabolites secondaires constitués d'une chaîne lipidique (acyle) hydrophobe liée à une partie polypeptidique hydrophile (cyclique ou linéaire)	Surfactine, bacillomycine, kurstakine, pumilacidine...	(Baltz <i>et al.</i> , 2014) (Falardeau <i>et al.</i> , 2013)
	Autres NRPS	Bacitracine, bacillibactine, ...	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
	Polyketides (PKS) Métabolites secondaires non-peptidiques, grande diversité de structures et de fonctions.	Difficidine, macrolactine, ...	(A. Argüelles Arias <i>et al.</i> , 2011)
	NRPS/PKS hybrid synthesized NRPS or PKS Métabolites synthétisés par des hybrides NRPS/PKS	Zwittermicine	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)

Tableau 1 : Classification et exemples des métabolites secondaires antimicrobiens produits par le genre *Bacillus*

Il est à noter que les grands groupes présentés dans le tableau ci-dessus peuvent être eux-mêmes divisés en plusieurs sous-classes, suivant divers critères. La classe I des bactériocines, par exemple, rassemble sept sous-classes selon les modifications post-traductionnelles subies par ces polypeptides

(Arnison *et al.*, 2013). Le but ici n'est pas de décrire en détail la synthèse de tous les métabolites antimicrobiens de *Bacillus*, mais bien de donner un aperçu de la diversité de ceux-ci.

Le présent travail s'intéresse particulièrement aux lipopeptides et plus précisément à la surfactine (cfr. sections 2 et 4). Il paraît donc nécessaire de présenter brièvement les processus complexes de production des NRPs. Une note complémentaire concernant les PKs est également donnée par la suite pour contextualiser l'ensemble de cette classe de métabolites secondaires hautement diversifiée dont la synthèse ne se fait pas *via* les ribosomes, contrairement à beaucoup d'autres.

1.2 NON-RIBOSOMAL SYNTHESIZED PEPTIDES (NRPs) & POLYKETIDES (PKs)

Cette catégorie de métabolites secondaires est de plus en plus investiguée, et ce, principalement grâce aux progrès scientifiques dans les domaines du séquençage et de la bioinformatique. En effet, ceux-ci ont permis de révéler, notamment chez *Bacillus* et *Streptomyces*, un nombre certain de groupes de gènes dits « cryptiques » (i.e. non-exprimés en conditions de laboratoire) qui seraient impliqués entre autres dans la synthèse de PKs et de NRPs (A. Argüelles Arias *et al.*, 2011). Ces mêmes domaines scientifiques permettent aussi, bien évidemment, l'étude de gènes non-cryptiques codant pour des NRPs et PKs (Ansari *et al.*, 2004). Comme évoqué au chapitre précédent, ces substances, « nouvelles » pour certaines, ont aux yeux des industriels un grand intérêt puisque leurs applications peuvent s'étendre de la pharmacologie à l'agriculture (Tracanna *et al.*, 2017).

La voie métabolique « classique » de synthèse des protéines passe par les ribosomes (organites « assembleurs d'acides aminés »). Ce n'est pas le cas des NRPs et des PKs. En effet, ils sont synthétisés *via* des mégaenzymes : les Non-ribosomal peptides synthases (NRPSs) et les Polyketides synthases (PKSs)⁵. Ces complexes protéiques, contrairement aux ribosomes, sont indépendants des ARN messagers ce qui leur permet de générer des NRPs et PKs avec des structures plus complexes et pouvant également contenir des acides aminés non-protéinogènes⁶. Il en résulte que ces deux catégories de métabolites sont extrêmement diversifiées, tant du point de vue de leur structure que du point de vue de leurs activités biologiques (Stein *et al.*, 2005 ; Finking *et al.*, 2004). Concrètement, ces mégaenzymes sont constituées de plusieurs unités, appelées « modules », qui catalysent les différentes réactions successives d'élongation et/ou de modification qui mènent, *in fine*, à la formation d'un NRP ou d'un PK (A. Argüelles Arias *et al.*, 2011)

Concernant les NRPSs, chaque module est responsable de l'incorporation d'un nouvel acide aminé (a.a.) et est divisé en au moins trois principaux domaines :

⁵ Ces mégaenzymes, elles, sont synthétisées par la voie « classique » : ARNs messenger, ARNs de transfert et ribosomes.

⁶ Un acide aminé non protéinogène est un acide aminé qui ne peut pas être incorporé dans les protéines lors de la traduction de l'ARN messenger par les ribosomes. De tels acides aminés peuvent malgré tout être présents dans les protéines, mais dans ce cas ils se forment à partir de résidus d'acides aminés protéinogènes par modification post-traductionnelle.

- **Domaine A** pour adénylation
- **Domaine T** pour thiolation (ou **PCP** pour peptidyl carrier protein)
- **Domaine C** pour condensation

Chacun d'eux catalyse une réaction impliquée dans l'intégration d'un nouvel a.a. au sein du peptide. Le domaine d'adénylation sélectionne et active l'acide aminé qui est apparenté au module en le transformant en un amino acyl adénylate (i.e. un résidu d'a.a. lié à l'adénine via un pyrophosphate). Ensuite, le domaine PCP assure la liaison entre le monomère ainsi activé et le reste du module. Il s'agit d'un lien covalent qui inclut une phosphopantéthéine (l'atome de soufre qui se trouve à son extrémité constituant la liaison thioester entre le reste de la PCP et l'a.a.). Enfin le domaine C catalyse l'établissement, par condensation (libération d'une molécule d'eau), du lien peptidique entre l'a.a. activé et l'a.a. qui le précède dans la séquence du NRP, i.e. l'a.a. concerné par le module précédent. Par conséquent, le premier module, qui initie la chaîne peptidique, ne contient généralement pas de domaine C. Quant au module chargé de l'insertion du dernier acide aminé, il contient, en plus, un « termination domain » constitué d'une thioestérase (TE) qui, en rompant le lien thioester (PCP – a.a.), permet de libérer le polypeptide ainsi formé et, le cas échéant, permet aussi sa cyclisation (Raaijmakers *et al.*, 2010 ; A. Argüelles Arias *et al.*, 2011). La figure 2 illustre la succession des plusieurs modules impliqués dans la formation de la surfactine.

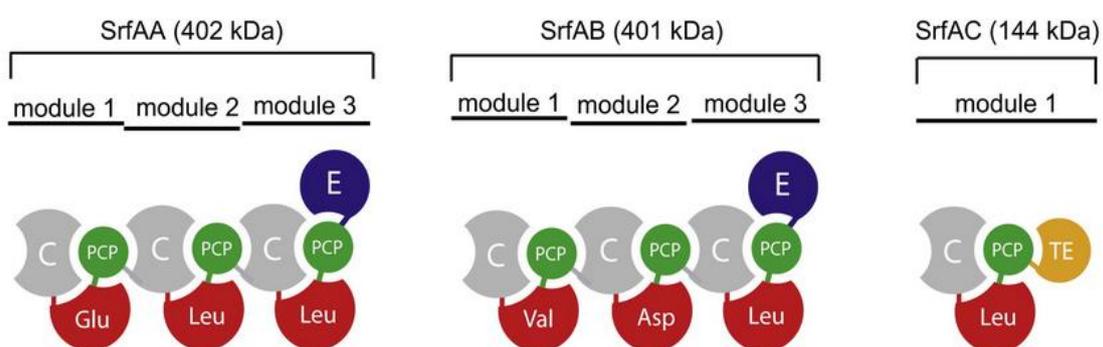


Figure 2 : Modules NRPS de la synthèse de la surfactine associés à leur a.a. Source : Kraas *et al.* 2010

Par ailleurs, un module peut contenir des domaines dits « secondaires » ou de « spécialisation » qui opèrent une ou plusieurs modification(s) chimique(s) sur l'acide aminé concerné par le module. La très grande diversité de NRPs qui existe découle, entre autres, de ce genre de domaines. Diversité de structures et d'activités qui ne saurait être générée par les ribosomes seuls (A. Argüelles Arias *et al.*, 2011). Les modules secondaires peuvent ainsi être responsables de toute une série de réactions chimiques sur les a.a. : oxydation, réduction, méthylation, formylation, hétérocyclisation, épimérisation... Cette dernière consiste en la formation d'un D-isomère⁷ de l'acide aminé. Les *Bacillus* présentent régulièrement des domaines d'épimérisation, notamment dans la production de

⁷ Les acides aminés sont « naturellement » de configuration L. Le domaine E permet dès lors de les transformer en leur énantiomère D (molécule brute identique mais symétriquement opposable en miroir à la forme L).

lipopeptides. Aucun de ces domaines n'a encore été trouvé chez le genre *Pseudomonas*, lui aussi pouvant être utilisé comme agent de biocontrôle (Raaijmakers *et al.* 2010).

Quant aux PKs, leur production est similaire à celle des NRPs dans la mesure où il s'agit également de complexes protéiques (mégaenzymes) subdivisés en différentes parties, chacune participant à l'élaboration du PK. Toutefois, ce ne sont plus des acides aminés qui sont assemblés, mais bien des monomères d'acyle co-enzyme A (CoA liée à un acide gras à longue chaîne par un lien thioester). Par conséquent, les domaines catalytiques ne sont plus les mêmes (i.e. les réactions d'élongation sont différentes). De plus, dans certains cas, on ne parlera plus de « modules » (i.e. protéines multifonctionnelles) car les enzymes qui catalysent les réactions sont simplement mono- ou bi-fonctionnelles. Autrement dit, le travail réalisé par un module NRPS est assuré par plusieurs enzymes distinctes dans le cas des PKs. (A. Argüelles Arias *et al.*, 2011).

2 LES LIPOPEPTIDES : MÉTABOLITES POLYVALENTS

Parmi les candidats en tant qu'antibiotiques NRPs et produits entre autres par *Bacillus* sp., les lipopeptides (LPs) constituent une classe de molécules prometteuses étudiées depuis quelques décennies. On y retrouve les polymyxines, octapeptines, polypeptines⁸, iturines, surfactines, fengycines, fusaricidines, tridecaptines, ainsi que d'autres exemples plus récents encore tels que la kurstakine. Toutes ces substances peuvent avoir des applications extrêmement diversifiées, comme explicité plus haut (Cochrane *et al.*, 2014 ; Zhao *et al.*, 2016). Dans le cadre de ce travail, une attention particulière sera réservée aux trois principales familles de lipopeptides produits par *Bacillus* et qui ont un intérêt dans le biocontrôle, à savoir : iturine, fengycine et surfactine. Leurs structures respectives sont détaillées au point 2.2.

2.1 DESCRIPTION GÉNÉRALE DES LPS

Les lipopeptides sont un groupe de métabolites secondaires⁹ structurellement très diversifiés, synthétisés par de nombreux genres de bactéries (*Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus* principalement) et champignons (dont *Aspergillus*). Les LPs sont caractérisés, comme leur nom l'indique, par une partie lipidique (sous forme d'une chaîne d'acide gras, apolaire, hydrophobe) et une partie oligopeptidique (cyclique ou linéaire, polaire, hydrophile) pouvant chacune adopter des structures variées. Ces deux parties, chimiquement très différentes, leur confèrent une propriété commune : ils sont amphiphiles, i.e. à la fois hydrophiles et hydrophobes et donc solubles dans les solvants polaires et apolaires. Cette propriété fait des LPs des agents biologiques tensioactifs. Ils ont

⁸ Ces trois dernières sont principalement produites par *Paenibacillus* (Cochrane *et al.*, 2014)

⁹ Métabolites qui n'est pas directement impliqué dans les fonctions vitales du microorganisme.

fait l'objet de nombreuses études ces dernières années pour leurs propriétés antimicrobiennes, cytotoxiques, antitumorales, immunosuppressives, ... (Raaijmakers *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2016).

2.1.1 DIVERSITÉ STRUCTURALE

Les bactéries du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Paenibacillus*, parmi d'autres, produisent des LPs dont la diversité de structures est considérable. Ces différentes structures sont dues d'une part à la variabilité de la longueur de la chaîne d'AG et aux différentes configurations isomériques que cette dernière peut adopter. D'autre part, la séquence, le nombre et la configuration de la partie peptidique contribuent aussi à la diversité des LPs (Nybroe & Sørensen, 2004; Stein *et al.*, 2005). Le point 2.2 dresse un portrait des principaux LPs produits par le genre *Bacillus*. Cette large gamme de structures moléculaires donne lieu, sans surprise, à une grande diversité de fonctions.

2.1.2 DIVERSITÉ DE FONCTIONS

Parmi les bactéries productrices de LPs, les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (abritant tous deux des espèces phytopathologiques et bénéfiques pour les plantes) ont été les plus investigués. Il en résulte une quantité importante d'informations relatives aux différentes fonctions des LPs (Ongena & Jacques, 2008).

Une des fonctions « phares » des lipopeptides est leur pouvoir antimicrobien, antifongique et/ou antiviral. Ces propriétés ont été mises en évidence à plusieurs reprises et seront développées ultérieurement dans le présent travail. (Raaijmakers *et al.*, 2010) (Nybroe & Sørensen, 2004 ; Huang *et al.*, 2006). Un autre exemple de fonction remarquable concerne les biofilms. En effet, certains de LPs en sont constitutifs, d'autres sont impliqués dans la régulation de production du biofilm. (Lopez *et al.* 2009). Cet aspect fera, lui aussi, l'objet de plus amples explications au point 2.2.2.

Certains LPs donnent la capacité à des *Bacillus* de stimuler le système immunitaire des végétaux, rien que par la colonisation de leurs racines (Ongena *et al.*, 2007). Ce phénomène est détaillé à la section 3.2. Par opposition, ces lipopeptides peuvent aussi permettre aux bactéries phytopathogènes qui les produisent d'accroître la virulence de la maladie, sans pour autant être forcément essentiels dans le processus d'infection (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Les LPs jouent aussi un « rôle protecteur » pour les microorganismes qui les sécrètent. En effet, la prédation représente un facteur important de mortalité chez les bactéries du sol. Afin d'augmenter leurs chances de s'y soustraire, différentes stratégies ont été mises au point au fil de leur évolution. Globalement, ces moyens de défenses peuvent être divisés en deux catégories : pré- et postingestion par un prédateur (nématodes, protozoaires, etc.). Le premier consiste majoritairement en des modifications de morphologie et de propriétés de surface dans le but de repousser l'agresseur. Le second implique plutôt la production de substances toxiques (Jousset *et al.*, 2006).

Le rôle des LPs ne se limite pas à ces quelques exemples. Ils peuvent encore avoir d'autres fonctions, comme la chélation d'ions métalliques facilitant l'absorption de ces derniers par les microorganismes (Raaijmakers *et al.*, 2010). Par ailleurs, certains lipopeptides ont la particularité d'avoir la partie peptidique sous forme de cycle. On parle alors de LPs cycliques (cLPs). Ils se révèlent être très intéressants pour le biocontrôle et constituent la grande majorité des lipopeptides synthétisés par le genre *Bacillus*. Leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles sont exposées à la section suivante.

2.2 LPS CHEZ *BACILLUS* SP.

Parmi les métabolites qui constituent l'antibiome de *Bacillus* sp. (*subtilis* / *amyloliquefaciens*, surtout), la large majorité sont les lipopeptides cycliques. Ils ont un très grand intérêt dans le cadre du biocontrôle pour deux raisons (Cawoy *et al.*, 2015 ; Debois *et al.*, 2014) :

- Ils sont produits en grande quantité en conditions de laboratoire, ce qui facilite les expérimentations
- Ils sont produits en quantité significative en conditions naturelles (rhizosphère)

Ces cLPs sont principalement regroupés en trois familles : iturine, fengycine et surfactine. Le fait qu'ils soient majoritaires, par rapport aux LPs linéaires, pourrait s'expliquer par leur plus faible liberté de conformation tridimensionnelle. En effet, la cyclisation de la partie oligopeptidique leur confère une bonne stabilité, condition primordiale pour assurer une activité biologique efficace (Sieber & Marahiel, 2003).

Chaque famille inclut plusieurs représentants qui ont tous le même nombre de résidus d'acides aminés. Ces derniers peuvent changer d'un représentant à l'autre. En outre, un même représentant peut se retrouver sous différentes formes, ou « homologues », selon la longueur et/ou la configuration isomérique de la chaîne d'acide gras. Par conséquent, ces trois familles sont structurellement très hétérogènes (Ongena & Jacques, 2008).

2.2.1 STRUCTURES MOLÉCULAIRES DES CLPS

La figure 3, ci-dessous, illustre la structure-type du principal représentant des surfactines, iturines et fengycines.

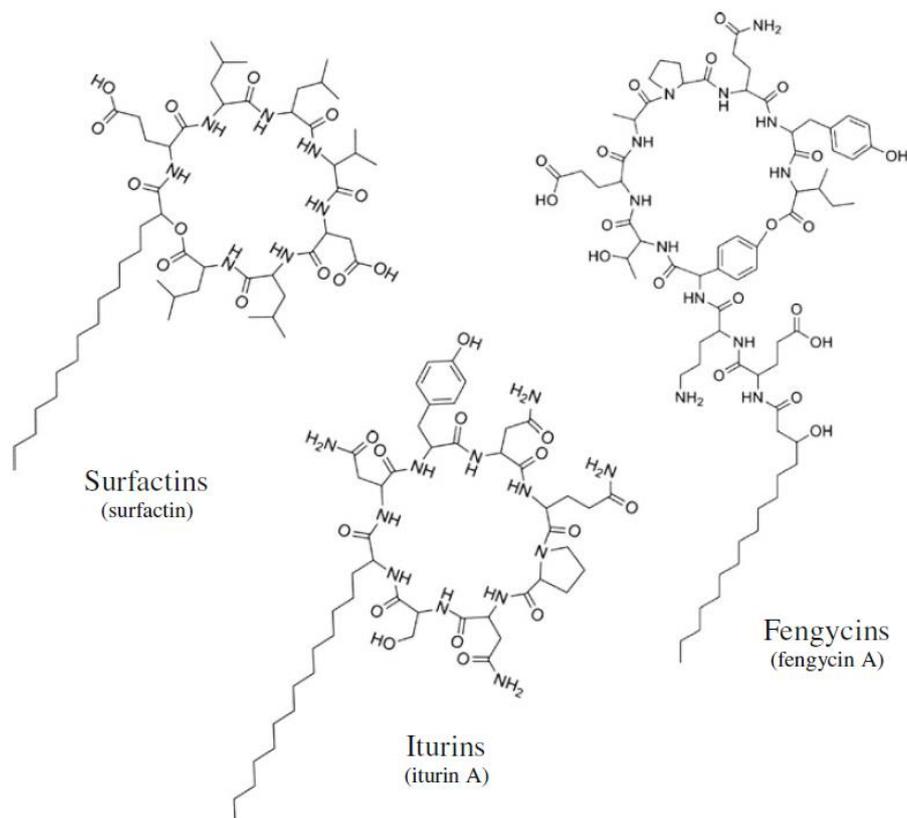


Figure 3 : Structure moléculaire des principaux représentants des trois familles de cLPs : surfactine, iturine et fengycine. Source : Falardeau et al., 2013.

La famille des surfactines comprend l'espérine, la lichenysine, la pumilacidine et la surfactine. Leur partie peptidique contient sept a.a. (heptapeptide) et est liée à un β -hydroxy acide gras *via* une liaison de type acyle (formée à partir de la fonction acide). Cette chaîne contient entre treize (parfois douze) et seize carbones (C13 – C12) et peut avoir les conformations : linéaire, iso ou anteiso¹⁰. Les iturines regroupent l'iturine A et B, la bacillomycine D, F et L et la mycosubtiline. Il s'agit aussi d'heptapeptides unis par un lien acyle à la partie lipidique. Cette dernière est un β -amino acide gras (C14 – C17) et présente les mêmes isomères que la surfactine. La troisième famille, les fengycines, sont des décapeptides. La partie hydrophobe est un β -hydroxy acide gras, C14 – C18, linéaire, iso ou anteiso, saturé ou non. On y retrouve la fengycine A et B et la plipastatine A et B. Le tableau 2 reprend les caractéristiques des représentants introduits ci-dessus.

¹⁰ Iso : Groupement méthyle sur le deuxième carbone de la chaîne en partant du CH₃ terminal. Anteiso : Groupement méthyle sur le troisième carbone de la chaîne en partant du CH₃ terminal.

FAMILLE	VARIANT	SÉQUENCE D'ACIDES AMINES	LONGUEUR DE LA CHAÎNE D'ACIDE GRAS
SURFACTINE	Espérine ¹	L-Glu - L-Leu - D-Leu - L-Val - L-Asp - D-Leu - L-Leu - COOH	C13 – C16
	Halobacilline	L-Gln ² - L-Lue ³ - D-Leu - L-Val ³ - L-Asp - D-Leu - L-Val ³	
	Pumilacidine	L-Glu - L-Leu - D-Leu - L-Leu - L-Asp - D-Leu - L-Val ³	
	Surfactine	L-Glu - L-Leu ⁴ - D-Leu - L-Val ⁵ - L-Asp - D-Leu - L-Val ⁵	
ITURINE	Bacillomycine D	L-Asn - D-Tyr - D-Asn - L-Pro - L-Glu - D-Ser - L-Thr	C14 – C17
	Bacillomycine F	L-Asn - D-Tyr - D-Asn - L-Gln - L-Pro - D-Asn - L-Thr	
	Bacillomycine L	L-Asp - D-Tyr - D-Asn - L-Ser - L-Gln - D-Ser - L-Thr	
	Bacillopeptine	L-Asn - D-Tyr - D-Asn - L-Ser - L-Glu - D-Ser - L-Thr	
	Iturine A	L-Asn - D-Tyr - D-Asn - L-Gln - L-Pro - D-Asn - L-Ser	
	Iturine B	L-Asp - D-Tyr - D-Asn - L-Gln - L-Pro - D-Asn - L-Ser	
	Mycosubtiline	L-Asn - D-Tyr - D-Asn - L-Gln - L-Pro - D-Ser - L-Asn	
FENGYCINE	Fengycine A	L-Glu - D-Orn - D-Tyr - D-aThr - L-Glu - D-Ala - L-Pro - L-Gln - L-Tyr - L-Ile	C14 – C18
	Fengycine B	L-Glu - D-Orn - D-Tyr - D-aThr - L-Glu - D-Val - L-Pro - L-Gln - L-Tyr - L-Ile	
	Plipastatine A	L-Glu - D-Orn - L-Tyr - D-aThr - L-Glu - D-Ala - L-Pro - L-Gln - L-Tyr - L-Ile	
	Plipastatine B	L-Glu - D-Orn - L-Tyr - D-aThr - L-Glu - D-Val - L-Pro - L-Gln - L-Tyr - L-Ile	

Tableau 2 : Caractéristiques des différents représentants de chacune des trois familles de cLPs. Les acides aminés en gras sont ceux qui sont conservés dans tous les représentants d'une même famille. Les informations données dans ce tableau sont relatives aux cas les plus souvent rencontrés. Certaines variations (séquence d'a.a. et/ou longueur de la chaîne) peuvent être observées selon les souches bactériennes. 1: Asp à la position 5 forme le cycle lactone. 2 : Peut aussi être L-Glu. 3 : Peut aussi être L-Ile 4 : Peut aussi être L-Val or L-Ile. 5 : Peut aussi être L-Leu, ou L-Ile. Adapté de Falardeau *et al.*, 2013.

Ces trois familles se distinguent également par la configuration de leur cycle. La surfactine a un cycle de type macrolactone (cyclisation de la séquence d'a.a. *via* une liaison ester). La fermeture du cycle se fait entre le groupement β -hydroxyle de l'AG et le C terminal du peptide. La formation du cycle de l'iturine se fait de façon analogue à la surfactine : le C terminal est lié à au groupement β -amine de l'AG. Ce cycle est alors qualifié de macrolactame puisque la cyclisation implique un lien amide (et non ester comme dans le cas précédent). Il s'agit à nouveau d'un cycle macrolactone dans le cas de la fengycine, mais ici, le C terminal est lié à la chaîne latérale de la tyrosine en position 3. (Raaijmakers *et al.*, 2010 ; Falardeau *et al.*, 2013).

Les procédés de synthèse de ces cLPs sont divers. En ce qui concerne la partie peptidique, les trois familles suivent le schéma présenté à la section 1.2. Pour ce qui est de l'assemblage avec la chaîne d'AG, plusieurs mécanismes sont possibles. Ils font intervenir différentes enzymes et sont assez complexes (Chooi & Tang, 2010). Aussi, les détails de ces processus sortent du cadre de ce travail. Il est toutefois intéressant de relever que la production de surfactine est maximale entre la phase exponentielle et stationnaire de croissance du microorganisme. Iturine et fengycine, produites ultérieurement, sont apparentées à la phase stationnaire (Raaijmakers *et al.*, 2010).

2.2.2 FONCTIONS PRINCIPALES DES CLPs DANS LE BIOCONTRÔLE

Certains exemples ont déjà été donnés à la section 2.1.2 Cette section a pour but de présenter plus en détails les trois grandes catégories de fonctions cruciales des cLPs dans le domaine du biocontrôle. Il s'agit de l'amélioration des capacités de *Bacillus* à coloniser la rhizosphère, l'antagonisme direct envers d'autres microorganismes du sol et, enfin, la stimulation des défenses immunitaires végétales.

Accès à la niche écologique (rhizosphère)

La capacité d'un microorganisme à coloniser une surface est la motilité. Lors de la colonisation, certaines bactéries ont la faculté de sécréter une matrice extracellulaire principalement constituée de polysaccharides et de protéines. Ceux-ci donnent lieu à la formation d'un gel hydraté qui permet de mieux adhérer aux surfaces, de maintenir les individus ensemble, de les protéger et de faciliter l'échange de signaux moléculaires et/ou de matériel génétique (Stewart & Franklin, 2008). En outre, cette matrice améliore l'adhérence des bactéries à la surface colonisée. Cette dernière propriété est notamment due à la présence de certains cLPs dans le biofilm (surfactine, entre autres), améliorant son caractère tensioactif. A ce titre, plusieurs travaux en laboratoire ont démontré que des souches de *Bacillus* (et de *Pseudomonas*), mutées de façon à les rendre incapables de produire certains cLPs, perdaient partiellement voire totalement leurs capacités de colonisation (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Les effets tensioactifs des cLPs, conséquence directe de leur caractère amphiphile, sont leur propriété centrale. En effet, bon nombre des fonctions (dont les trois décrites dans ce chapitre) de ces métabolites font directement intervenir leurs effets surfactants (Leclère *et al.* 2006) ont observé que la surfactine et la mycosubtiline pouvaient diminuer de façon remarquable la tension de surface de l'eau dans un milieu de culture (abaissement des interactions hydrophobes) (Falardeau *et al.*, 2013). En plus d'améliorer les propriétés chimiques du biofilm, la surfactine est une molécule signal dans la formation de ce dernier chez *B. subtilis* (Lopez *et al.* 2009).

Antagonisme direct

L'antagonisme est la faculté qu'a un organisme à inhiber la croissance d'un autre, à altérer son développement voire à le tuer. Il s'agit ici d'une des fonctions les plus étudiées dans la littérature scientifique puisqu'elle fait directement intervenir les propriétés antibiotiques des LPs. En effet des tests *in vitro* montrent clairement que ces métabolites présentent des activités inhibitrices de croissance ainsi qu'un potentiel lytique à l'encontre de nombreux microorganismes (bactéries, champignons dont oomycètes, ...) et de virus (Raaijmakers *et al.*, 2010). En ce qui concerne les virus, les cLPs interagiraient avec les enveloppes lipidiques de ceux-ci, conduisant à la désintégration des particules virales (Nybroe & Sørensen, 2004 ; Huang *et al.*, 2006).

Activité antifongique Concernant l'antagonisme envers les mycètes, les iturines présentent une forte activité antifongique. Il en va de même pour les fengycines, particulièrement sur les champignons filamenteux (Deleu *et al.*, 2008). En revanche, iturines et fengycines ont une activité antibactérienne très limitée. Ces deux familles moléculaires sont donc principalement importantes dans le cadre de l'antagonisme envers les mycètes. Cela pourrait partiellement s'expliquer par le fait qu'elles entrent en interaction avec eux dans certains de leurs processus physiologiques intracellulaires. Une des conséquences notables est l'inhibition de la synthèse de toxines (Hu *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2014). L'action de ces deux cLPs a été démontrée sur plusieurs espèces de champignons. Citons ici les cas d'antagonisme à l'encontre de *Fusarium graminearum* par la fengycine (Wang *et al.* 2007) et d'*Aspergillus flavus* par l'iturine (Raaijmakers *et al.*, 2010). En outre, la viscosinamide (un autre type de cLPs) purifiée, utilisée lors d'expérimentations, provoque également une inhibition de croissance des hyphes mycéliens. Cette inhibition est accompagnée d'une altération de leurs mitochondries, au niveau de leur organisation et de leur activité. Une acidification du cytoplasme des hyphes et une diminution de leur hydrophobicité peuvent aussi être observées (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Activité antibactérienne Si quasiment aucune activité antifongique n'a encore été mise en évidence chez la surfactine, elle joue un rôle très important dans l'antagonisme à l'encontre des autres bactéries (Cawoy *et al.*, 2015). Ce sont encore une fois les propriétés surfactantes de ce cLP qui se révèlent être les plus importantes. En effet, comme il l'a déjà été stipulé, la majorité des rôles attribués à ces métabolites secondaires peut être imputables au fait que ces derniers soient d'excellents agents tensioactifs biologiques. La conséquence la plus importante est sans doute leur capacité à interagir avec les membranes lipidiques des autres organismes (Raaijmakers *et al.*, 2010 ; Cawoy *et al.*, 2015). Certes, le phénomène d'antagonisme n'est pas exclusivement attribuable à la perturbation des membranes cytoplasmiques, comme certains des exemples cités l'illustrent. Mais ces interactions sont primordiales dans l'effet d'antagonisme : elles mènent généralement à la formation de pores dans les membranes « cibles », provoquant ainsi une dérégulation des équilibres osmotiques. Ce qui mène au final à la mort de la cellule (Pérez-García *et al.* 2011). L'insertion du lipopeptide dans la membrane dépend à la fois de la composition de la membrane et des caractéristiques moléculaires et structurales du cLP. A ce sujet, l'effet de la surfactine a été étudié. Il apparaît que la chaîne d'AG est importante : plus elle est longue (hydrophobicité augmentée), plus elle peut s'insérer au cœur d'une bio-membrane (bicouche phospholipidique dont l'intérieur est hydrophobe, par définition) (Razafindralambo *et al.* 2009).

Cette action des cLPs sur les membranes plasmiques présentent un autre avantage : les chances qu'un agent pathogène développe une forme de résistance à ce type d'antagonisme sont faibles. En effet, le « re-design » des membranes cellulaires est fort peu probable au vu des contraintes évolutives que cela représente. Les membranes jouent un rôle central dans la physiologie des organismes, les modifier conduirait à une « réforme » métabolique trop coûteuse (Avis, 2007).

L'impact antagoniste des cLPs sur les bactéries a surtout été observé chez les Gram positives. En effet, les Gram négatives bénéficient d'une protection supplémentaire grâce à leur membrane externe (constituée de lipides, de lipopolysaccharides, ...). Le manque d'activité des cLPs à leur rencontre serait directement imputable à cette caractéristique (Nybroe & Sørensen, 2004).

Stimulation des défenses immunitaires végétales

La stimulation du système immunitaire chez les plantes par les cLPs met en jeu les mêmes concepts que dans le cas de l'antagonisme : les interactions avec les membranes plasmiques. Mais dans ce cas, vis-à-vis de la plante-hôte. En effet, les interactions de la surfactine¹¹ avec la membrane cytoplasmique des cellules racinaires, peuvent déclencher des mécanismes « précoces » de défense immunitaire dans l'entièreté de la plante. Celle-ci parvient alors à se défendre de façon plus efficace contre des pathogènes s'attaquant aux feuilles par exemple (Ongena *et al.*, 2007). L'ISR est expliquée et mise en contexte à la section 3.

Même si les mécanismes et signaux moléculaires enclenchés au niveau des racines en présence de surfactine sont encore mal compris, il est clair que ce métabolite influence la façon dont la plante se défend des pathogènes (Venturi & Keel, 2016). C'est pourquoi la section suivante est consacrée à quelques éléments de physiologie végétale en ce qui concerne le système immunitaire des plantes.

3 SYSTÈME IMMUNITAIRE DES VÉGÉTAUX

Les végétaux sont en permanence exposés à d'éventuelles attaques extérieures, que ce soient des animaux herbivores, des insectes, des nématodes, des bactéries ou virus pathogènes. Face à cette menace permanente, beaucoup de moyens de défense ont été élaborés, tous basés sur l'immunité innée de la plante et sur les signaux moléculaires qui peuvent transiter dans tout son organisme. En comparaison au règne animal, l'absence non seulement de cellules immunitaires mobiles mais aussi d'un système d'immunité adaptatif, a contraint les végétaux à se munir de mécanismes de défense diversifiés et mobilisables rapidement. De ce fait, les signaux ont une importance capitale dans la survie de la plante : ils permettent d'amorcer des processus de défense systémique (i.e. dans l'entièreté de la plante) depuis une infection locale par exemple. Mieux encore, ces processus systémiques peuvent être entamés grâce à la perception de certains microorganismes non-pathogènes (Henry, 2011).

3.1 DÉFENSES IMMUNITAIRES

Le système immunitaire peut être divisé en deux grandes catégories : constitutif et induit. Le premier est relatif à toutes les défenses passives élaborées au cours de l'évolution. Il s'agit par exemple de la

¹¹ Remarquons ici que les iturines et fengycines ne présentent pas ce type d'activité (Cawoy *et al.*, 2015).

cuticule, une couche protectrice recouvrant certaines parties de la plante et empêchant l'intrusion d'agents pathogènes. Le second est dit « actif » et se déclenche suite à un stimulus ou plusieurs stimuli. (Henry, 2011) C'est ce dernier qui est développé dans la suite de cette section.

La perception de signaux moléculaires, appelés éliciteurs¹², indiquent à la plante la présence d'un agent pathogène. Le système induit réagit alors en déclenchant à son tour une cascade de signaux qui aboutissent à l'expression des moyens de défense *sensu stricto*. Ces défenses sont assez variées : renforcement des parois, alcalinisation du pH extracellulaire, production de substances toxiques pour la plupart des pathogènes, etc. Ces substances sont, entre autres, des enzymes hydrolytiques, des PRP (« pathogen related proteins »), ... (Jones *et al.*, 2006). Citons aussi le cas des espèces oxydatives (ou ROS pour « reactive oxygen species ») qui peuvent également servir en laboratoire comme indicateur de la « situation immunitaire » d'une plante (ou d'une partie de la plante). Par ailleurs, les ROS constituent à la fois un moyen de défense et un moyen de signalisation moléculaire impliqués dans l'immunité des plantes. C'est le cas pour la globalité des mécanismes déclenchés : ils s'influencent et s'équilibrent les uns les autres (Kalyanaraman *et al.*, 2011 ; Jones *et al.*, 2006).

Le système induit est constitué de deux lignes de défense, chacune amorcée par différents types d'éliciteurs. La première ligne, qui constitue la défense innée de base, est activée par des éliciteurs généraux. Ceux-ci peuvent être classés selon leur provenance (Nicaise *et al.*, 2009)

- Molécule apparentée à un agent pathogène : **PAMP** (« pathogen-associated molecular pattern »). Ex. : protéines membranaires, toxines.
- Molécule apparentée à des dommages subis par la plante : **DAMP** (« damage-associated molecular pattern »). Ex. : débris de parois cellulaires.
- Molécule apparentée à un microorganisme non-pathogène : **MAMP** (« microbe-associated molecular pattern »). Ex. : protéines membranaires, sécrétions de métabolites.

La perception de molécules associées à l'une de ces catégories d'éliciteurs généraux entraîne la production d'une succession de signaux cellulaires provoquant la réponse immunitaire basique, ou PTI pour « PAMP-triggered immunity », ou encore « primary innate immunity » (figure 3). (Nicaise *et al.*, 2009). La PTI est généralement suffisamment efficace pour enrayer la prolifération de l'agent pathogène. Néanmoins, certains parviennent tout de même à contourner ces premières réactions en sécrétant des substances (brins d'ADN, protéines, ...) qui inhibent la PTI. Ces substances sont appelées effecteurs ou éliciteurs spécifiques et agissent soit en interrompant la signalisation immunitaire de la plante, soit en empêchant directement la biosynthèse de ces signaux (Jones *et al.*, 2006). Face à la pression de sélection que ces pathogènes ont dû provoquer, le règne végétal a développé une seconde ligne de réponse immunitaire : l'ETI (« effector-triggered immunity »).

¹² Molécule qui déclenche les mécanismes de défense des plantes avec production de substances défensives.

L'ETI (ou « secondary innate immunity », figure 3) se déclenche suite à l'interception d'effecteurs par des protéines végétales dites de résistance (« R protein »). Ce qui en résulte est la formation d'un complexe appelé « avirulence protein » (Avr). Les « R proteins » sont codées par des « gènes de résistance » ou « R genes » et sont chacune hautement spécifiques à un effecteur (Jones *et al.*, 2006), (Boller *et al.*, 2009). Une fois la R protein activée (i.e. l'Avr formé), l'ETI se traduit concrètement par les mêmes réponses physiologiques que celles provoquées par la PTI (production de ROS, etc.). Cependant, elles sont d'une intensité telle, qu'elles sont qualifiées de HR (« hypersensitive response ») conduisant à la mort programmée de la cellule végétale (apoptose). Ce phénomène de nécrose locale permet simplement d'empêcher la progression de l'infection (Spoel *et al.*, 2012 ; Martin *et al.*, 2003). Dans le cadre du biocontrôle, c'est bien évidemment la PTI qui est intéressante, elle peut s'exprimer de deux manières différentes : locale ou systémique.

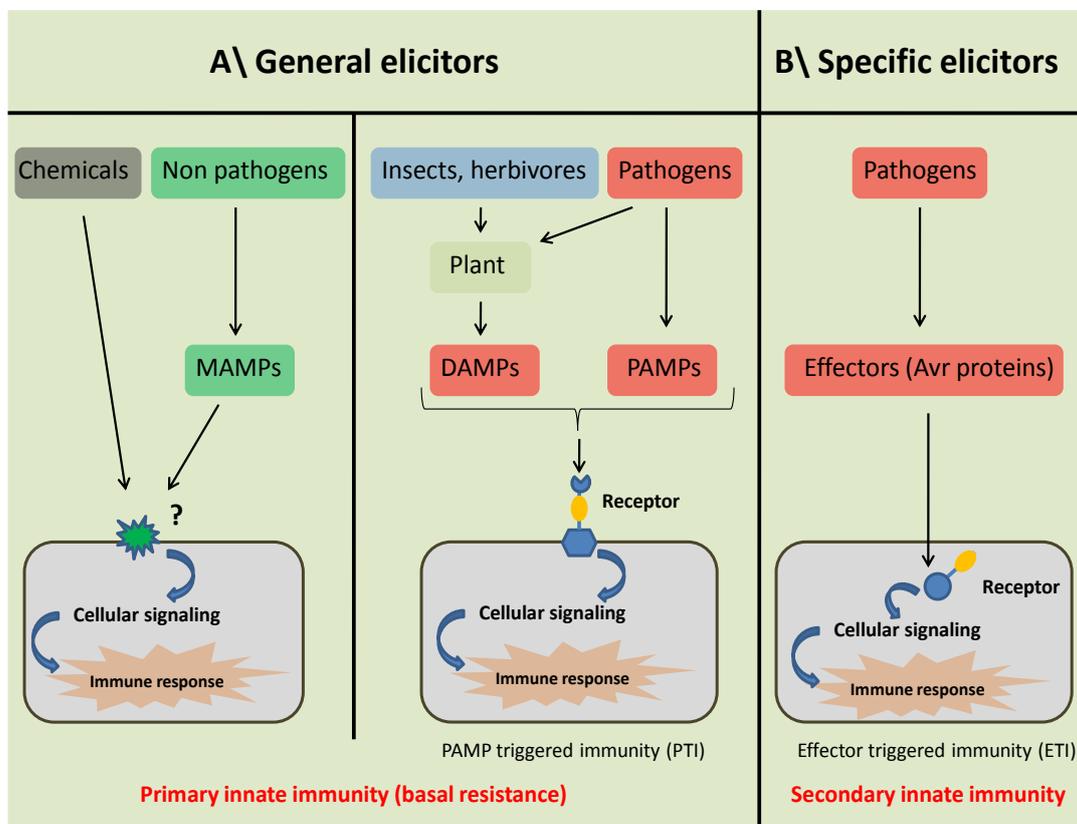


Figure 3 : Illustration de la succession d'évènements et de réactions conduisant à la Primary innate immunity et à la Secondary innate immunity. Source : Henry, 2011

Lors d'une attaque par un agent pathogène, la PTI s'établit dans un premier temps sur le « site » infecté. Cette zone, et uniquement cette zone, développe la réponse immunitaire : ce phénomène est appelé « local acquired resistance » ou LAR (Henry, 2011). Depuis ce site, des signaux moléculaires peuvent être envoyés vers les tissus non infectés. Ces signaux¹³ déclenchent les réponses immunitaires basiques dans l'entièreté de la plante et provoquent ainsi un état de « systemic acquired resistance » ou SAR. Cela permet à la plante de prévenir une attaque ultérieure par le pathogène, quel que soit

¹³ L'acide salicylique est un signal clé dans cette voie de communication conduisant à la SAR (Vlot *et al.*, 2008).

l'organe concerné (Spoel *et al.*, 2012). LAR et SAR sont toutes deux déclenchées par la perception de PAMPs et/ou de DAMPs.

Un second type de résistance systémique peut être induit par des microorganismes bénéfiques pour la plante, et cette dernière les « reconnaît » donc *via* les MAMPs. Il s'agit de « l'induced systemic resistance » (ISR). Globalement, l'ISR est très similaire à la SAR puisqu'elles déclenchent toutes les deux la « primary innate immunity » de façon systémique pour empêcher plus rapidement et efficacement une attaque. (Vlot *et al.*, 2008). Cette alerte immunitaire généralisée est appelée aussi « priming ». Il existe cependant quelques différences entre le profil du priming généré par la SAR et celui de l'ISR. En effet, dans le cas de l'ISR, on n'observe moins de changements dans l'expression des gènes de défense. Cela est sans doute dû au fait que ces modifications représentent un investissement en énergie et en ressources trop important en l'absence de pathogène (Pieterse *et al.*, 2002). De plus, comparé à la SAR, « l'induced systemic resistance » implique des signaux moléculaires partiellement différents. Dans ce dernier cas, les voies métaboliques de signalisation concernent principalement l'acide jasmonique et l'éthylène (pieterse *et al.*, 2002 ; Henry, 2011).

Plusieurs éliciteurs généraux sont produits par des rhizobactéries bénéfiques pour les plantes. Le genre *Bacillus*, pour ne citer que lui, sécrète différentes substances qui agissent comme MAMP : le 2,3-butandiole, l'acétoïne, l'acide 2-aminobenzoïque et, bien sûr, la surfactine (Cawoy *et al.*, 2014 ; Jourdan *et al.* 2009 ; Ongena and Jacques 2008).

3.2 SURFACTINE & ISR

La surfactine possède, en plus de ses autres activités, la capacité d'induire l'ISR. Les iturines et fengycines sont très peu actives de ce point de vue, si ce n'est pas actives du tout. Des expérimentations faites sur *B. amyloliquefaciens* l'indiquent. En effet, des cultures avec une faible concentration en surfactine et diverses concentrations en iturines et fengycines ne montraient qu'une très faible activité élicitrice sur des plants de tabac (Cawoy *et al.*, 2014 ; Jourdan *et al.* 2009). Les effets éliciteurs de la surfactine ont également été mis en évidence sur le haricot et la tomate (Ongena *et al.* 2005, Ongena *et al.* 2007), mais aussi sur *Arabidopsis thaliana* (Cawoy *et al.*, 2014) et sur le melon (Cawoy *et al.*, 2014).

De plus, un parallèle peut être fait entre la quantité de surfactine produite et l'importance de l'ISR provoquée. Des tests ont été réalisés sur plusieurs souches de *B. amyloliquefaciens* dont les productions en surfactine variaient de l'une à l'autre, en termes de quantité et de diversité. Les souches qui produisaient peu de surfactine, induisaient significativement moins l'ISR que celles qui étaient considérées comme « productrices fortes » (Cawoy *et al.*, 2014).

Concrètement, les effets éliciteurs de la surfactine se traduisent chez la plante par des changements métaboliques associés à diverses réponses immunitaires. Ces effets peuvent apparaître rapidement tels

que la modification des flux d'ions traversant la membrane plasmique (conduisant, entre autres, à l'alcalinisation du pH extracellulaire, ou la production de ROS. D'autres changements sont exprimés plus tard¹⁴ (renforcement des parois cellulaires, ...) (Cawoy *et al.*, 2014 ; Jourdan *et al.*, 2009 ; Ongena *et al.* 2007).

Concernant les interactions avec les membranes, il semble que la surfactine ne soit associée à aucun récepteur spécifique, ce qui expliquerait son efficacité sur une gamme très large de végétaux (Cawoy *et al.*, 2014). De fait, la surfactine conserve ses capacités d'éliciteur sur une suspension de cellules végétales ayant subi un traitement à la protéase. Ce type de traitement détruit les protéines membranaires (récepteurs, etc.). Tout cela suggère que l'action de ce cLP consiste en fait à s'introduire partiellement dans la membrane cytoplasmique. Afin de ne pas détruire la membrane, cette insertion doit être suffisamment limitée, mais d'autre part, elle doit également être suffisamment profonde pour déclencher les réponses immunitaires de la plante (Falardeau *et al.*, 2013).

La surfactine joue ainsi un rôle majeur, dans l'ISR, mais aussi dans l'antagonisme et dans la motilité. Malgré les différentes observations, il y a encore beaucoup à comprendre sur ce qui influence la production de surfactine : interaction avec des pathogènes ou d'autres microorganismes (Cawoy *et al.* 2015 ; Liu *et al.*, 2014), "reconnaissance" des parois végétales par la bactérie productrice (Debois *et al.*, 2015), ... Les productions de surfactine et autres cLPs varient aussi d'une espèce à l'autre, comme expliqué plus haut. A ce titre, parmi les producteurs « forts » de lipopeptides, dont la surfactine, *Bacillus amyloliquefaciens* n'est pas le moindre. Il a déjà été évoqué précédemment pour les mêmes raisons et la dernière section de cette revue bibliographique est consacrée à sa présentation.

4 B. AMYLOLIQUEFACIENS & BIOCONTRÔLE

B. amyloliquefaciens est une bactérie du sol, Gram positive, non pathogène dont la taille est comprise entre 0.7 - 0.9 µm de large sur 1.8 – 3.0 µm de long (forme de bâtonnet). Les individus sont souvent regroupés en chaîne par l'intermédiaire d'un biofilm qui leur permet notamment de coloniser plus rapidement et plus efficacement leur environnement (Raaijmakers *et al.*, 2010 ; Priest *et al.*, 1987). Comme son nom le suggère, ce microorganisme a la capacité d'hydrolyser l'amidon grâce à la production d'amylase, même si cette caractéristique est loin de lui être spécifique : depuis certains champignons jusqu'aux humains, beaucoup d'organismes ont cette faculté (Priest *et al.*, 1987). De nombreuses souches existent, leur optimum de croissance se situe entre 30 et 40°C, à pH 7. Elles sont toutes aérobies obligatoires. *B. amyloliquefaciens* présente également la faculté de former des endospores (i.e. spore se formant au sein du cytoplasme) face à des situations défavorables telles que de hautes températures, un stress hydrique, des radiations, etc. (Borriss *et al.*, 2010). Génétiquement

¹⁴ Ils sont toujours exprimés plus tardivement, indépendamment d'une quelconque action élicitrice.

parlant, l'ADN de *B. amyloliquefaciens* est circulaire et comptabilise environ 4 millions de bps. Il contient ainsi près de 3700 séquences codantes pour des protéines (Chen *et al.*, 2007).

Le taxon de *B. amyloliquefaciens* a longtemps fait polémique par sa proximité phénotypique et génétique avec son proche parent *B. subtilis*. Le nom « *amyloliquefaciens* » a été proposé la première fois en 1943 par Fukumoto et ce n'est qu'en 1980 qu'il a été reconnu officiellement par la communauté scientifique. Il était toutefois considéré comme une sous-espèce de *B. subtilis*. Grâce aux avancées techniques permettant le séquençage d'ADN, en 1987, Priest *et al.*, en ont fait une espèce à part entière, toujours incluse dans le groupe *subtilis*. Plus récemment encore, sur base de comparaison génomique complète et de techniques d'analyse de pointe, Borriss *et al.* (2010) proposent de diviser l'espèce en deux sous-espèces : *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* et *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

Le nombre de métabolites secondaires (notamment antibiotiques) sécrétés par *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* est remarquable. Comparés au groupe *subtilis*, et même à certaines souches de *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*, les gènes consacrés à la production de ces substances sont plus de deux fois plus nombreux (Barbe *et al.*, 2009 ; Borriss *et al.*, 2010). Cette particularité en fait un microorganisme de choix pour le contrôle biologique des cultures. En effet, la sécrétion de composés antimicrobiens permet d'une part de protéger la plante contre une multitude de pathogènes et d'autre part de stimuler les défenses immunitaires végétales (Molinatto *et al.*, 2017). Les bactéries du sol présentant de telles propriétés et/ou qui favorisent la croissance des plantes sont regroupées sous l'acronyme « PGPR » pour plant growth promoting rhizobacteria.

Les racines des plantes libèrent constamment une grande variété de composés organiques dans leur environnement direct. Par conséquent, la fine couche du sol enveloppant les racines (i.e. la rhizosphère) constitue une niche écologique favorable pour l'établissement de populations microbiennes (Dessaux *et al.*, 2016). Ces différentes communautés incluent évidemment les PGPR, qui procurent à la plante les effets bénéfiques déjà expliqués.

Pour qu'un PGPR soit compétitif dans cet environnement, il doit présenter plusieurs caractéristiques pouvant être regroupées en trois catégories (Cawoy *et al.*, 2015) :

- Faculté à coloniser la rhizosphère
- Antagonisme direct
- Faculté à provoquer l'ISR

Etant donné que *B. amyloliquefaciens* est un bon producteur de chaque famille de cLPs, il possède donc les facultés décrites ci-dessus (cfr. section 2.2.2). Cette espèce compte parmi les agents de biocontrôle les plus efficaces (Cawoy *et al.*, 2014).

Cependant, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, le contexte nutritionnel impacte la production de cLPs ainsi que les propriétés générales de biocontrôle de *Bacillus* (Vacheron *et al.*, 2013). C'est ici le sujet de ce mémoire. Plus particulièrement, ce travail pose la question : « Dans quelles mesures le milieu nutritif influence la production de surfactines et quelles en sont les conséquences sur l'activité de bio-contrôle de *B. amyloliquefaciens* ? ».

OBJECTIFS ET STRATÉGIE DU PROJET

Ce travail analyse l'impact des conditions nutritionnelles sur la production de surfactine par *Bacillus amyloliquefaciens* au travers de trois grands axes.

La stratégie consiste à déterminer, dans un premier temps, la diversité des surfactines produites en milieu synthétique couramment utilisé au laboratoire pour cultiver ce genre de bactéries (LB). Sur base de l'identification de ces surfactines dites « standards », l'objectif du travail est d'identifier les modifications apportées à ce panel d'homologues de surfactines lorsque la bactérie se développe sur les racines de plantules (cultures *in planta*) et d'évaluer l'influence du contexte nutritionnel naturel indépendamment de tout autre facteur en analysant les molécules produites en exsudats naturels (collectés directement à partir des plantules) et celles produites dans un milieu dit Recomposed Exudates (RE) imitant les exsudats naturels mais plus simple à utiliser en laboratoire.

Pour terminer, une comparaison des panels de surfactines produits, selon le milieu de culture, par *Bacillus amyloliquefaciens* et par *Bacillus pumilus* (souche endophyte) est effectuée. Le but est d'étendre (ou non) les observations à d'autres espèces de *Bacillus* ne partageant pas le même mode de vie que les souches de *B. amyloliquefaciens* étudiées qui sont essentiellement épiphytes.

Le deuxième axe porte sur l'étude de la quantité et de la dynamique de production de surfactines par *B. amyloliquefaciens* en milieu LB et RE que ce soit au niveau des lipopeptides formés ou au niveau de l'expression des gènes de biosynthèse. Le troisième et dernier axe concerne les variations d'activités biologiques des surfactines formées selon les différents contextes nutritionnels. Deux activités distinctes et capitales dans le biocontrôle tenteront d'être estimées : l'antagonisme à l'encontre de phytopathogènes bactériens et l'activité élicitrice de l'immunité (test ROS) sur racines de plantules de tomate

Au final, l'objectif est de pouvoir dresser un portrait des modifications (points de vue diversité, quantité et activité) apportées à la gamme des surfactines synthétisées par *B. amyloliquefaciens* lorsque l'on passe d'un milieu optimisé à un milieu se rapprochant le plus possible du contexte nutritionnel naturel.

MATÉRIEL & MÉTHODES

1 SOUCHES & MILIEUX

1.1 SOUCHES UTILISÉES

Le tableau ci-dessous regroupe la totalité des souches bactériennes utilisées lors des différentes manipulations en laboratoire.

TAXON	SOUCHE / PATHOVAR	REMARQUE	PROVENANCE	RÉFÉRENCE
<i>Bacillus</i>				
<i>B. amyloliquefaciens</i>	FZB42	Souche de référence des <i>B. amyloliquefaciens</i>	Borriss Rainer	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>B. amyloliquefaciens</i>	98S		MiPI	
<i>B. amyloliquefaciens</i>	S499	Souche contenant le plasmide pS499	MiPI	Molinatto <i>et al.</i> , 2017
<i>B. amyloliquefaciens</i>	14A	Souche S499 curée du plasmide pS499	Giulia Molinatto	Molinatto <i>et al.</i> , 2017
<i>B. amyloliquefaciens</i>	GA1		MiPI	Arguelles Arias <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus pumilus</i>	endo412	Bactérie endophyte	MiPI	
<i>Bacillus</i> sp.	41ph	Bactérie endophyte	MiPI	
<i>Phytopathogènes</i>				
<i>Xanthomonas campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		DSMZ ¹ N°3586	
<i>Clavibacter michiganensis</i>	pv. <i>tessellarius</i>		DSMZ ¹ N°20741	

Tableau 3 : Liste des souches utilisées en laboratoire. La première série (*Bacillus*) sont les souches de biocontrôle. La seconde série (phytopathogènes) sont les bactéries qui ont été utilisées dans les tests d'antagonisme (cfr. 1.2). 1 : « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen », centre de ressources biologiques. Les numéros DSMZ correspondent aux pathovars utilisés.

1.2 MILIEUX DE CULTURES

1.2.1 MILIEUX CLASSIQUES

MILIEU	COMPOSITION POUR 1 L
LB (liq. / sol.)	10 g de tryptone, 10 g de NaCl, 5 g d'extrait de levures (+ 18 g d'agar pour LB solide)
RE (liq.)	<p style="text-align: center;">RE</p> <p>825 ml de ddH₂O. 125 ml de solution A : KH₂PO₄ 5 mM, Mops 100 mM, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, extrait de levures 1 g/L, Fe₂(SO₄)₃ 1.2 mg/L, MnSO₄ 0.4 mg/L, CuSO₄ 1.6 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 4 mg/L. 50 ml de solution B : glucose 1 g/L, fructose 1.7 g/L, maltose 0.2 g/L, ribose 0.3 g/L, citrate 2 g/L, oxalate 2 g/L, succinate 1.5 g/L, malate 0.5 g/L, fumarate 0.5 g/L, casamino acids 0.5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1 g/L. (inspiré de kamilova <i>et al.</i>, 2006)</p>
Hoagland (sol.)	<p style="text-align: center;">RE+Val</p> <p>Idem + 2g de L-valine (Sigma Aldrich)</p> <p>1 ml de NH₄H₂PO₄ (1 M), 6 ml de KNO₃ (1 M), 4 ml de Ca(NO₃)₂ (1 M), 2 ml de MgSO₄ (1 M), 1 ml de H₃BO₃ (2.86 mg/l), 1 ml de MnCl₂·4H₂O (1.81 mg/l), 1 ml de ZnSO₄·7H₂O (0.22 mg/l), 1 ml de CuSO₄·5H₂O (0.08 mg/l), 1 ml de H₂MoO₄·H₂O (0.02 mg/l) et 1 ml de FeSO₄·7H₂O (24.9 mg/l), 22 g d'agar</p>

Tableau 4 : Composition des milieux de cultures « classiques » utilisés dans les différentes expérimentations.

1.2.2 MILIEU « EXSUDATS NATURELS »

Il s'agit d'un milieu particulier dans le sens où il a fallu récolter des exsudats racinaires de plantules de tomates pendant plusieurs jours. Après quelques manipulations supplémentaires décrites ci-après, ces récoltes ont ensuite servi de milieu de culture liquide.

- Dans des vials de 10 ml remplis d'eau, placer une plantule de tomate germée depuis ± 4 jours (1 plantule / vial)
- Maintenir constant le niveau d'eau des vials pendant 10 jours
- Récolter le contenu des vials après 10 jours
- Pooler l'ensemble du contenu de tous les vials
- Ajouter du (NH₄)₂SO₄ de façon à obtenir une [(NH₄)₂SO₄] de 1 g/l
- Ajuster à pH 7 avec du KOH
- Filtrer sur 0.22 µm

2 CULTURES

Les différents types de cultures réalisés sont une étape intermédiaire (voire préliminaire) des différentes expérimentations entreprises. Selon les expériences, les cultures servent *in fine*, à l'analyse des surnageants par UPLC-MS (identification et quantification des surfactines), au fractionnement des surnageants par HPLC (purification des surfactines), à la mesure de DO (pour taux de croissance ou effet d'inhibition), à la récolte des culots (en vue de la RT-qPCR).

2.1 MANIPULATIONS PRÉALABLES À L'INOCULATION DES MILIEUX DE CULTURES

Avant l'inoculation des cultures proprement dite, les microorganismes concernés sont repiqués sur boîte LB à l'aide de seeds sous forme de microbilles (VWR) conservés à -80 °C. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C (pour *Bacillus* et phytopathogènes) pendant 24 h et 48 h respectivement pour les *Bacillus* et pour les phytopathogènes.

2.2 CULTURES LIQUIDES

2.2.1 CULTURES EN FIOLES

Une fois la culture solide à terme, le matériel bactérien est récolté sur une pointe de spatule et transféré en fiole de 250 ml (contenant 100 ml de milieu). La fiole est incubée à 28 °C pendant 24 h. Agitation sur plaque à 270 rpm. Chaque culture est réalisée en triplicat.

Remarque pour les cultures relatives à la RT-qPCR (section 4) : Réalisation au préalable de précultures en fioles (méthode comme ci-dessus). Après les 24 h d'incubation, transfert d'un volume X de préculture dans une fiole de 150 ml (contenant 40-X ml de milieu). X = volume nécessaire de préculture à injecter pour obtenir une DO initiale de 0.1 dans la culture ($X < 5$ ml). Détermination de X par mesure de la DO de la préculture au spectromètre à 600 nm (V-1200 Spectrophotometer, VWR). La fiole est incubée à 28 °C pendant 24 h. Agitation : sur plaque à 270 rpm.

2.2.2 CULTURES EN MICROPLAQUES

Préparation de l'inoculum

Une fois la culture solide à terme, le matériel bactérien est récolté et suspendu dans un petit volume (généralement 1.5 ml) d'une solution de NaCl (0.85%, m/m). La suspension subit un lavage de 3 min à 13000 rpm. Cette opération est effectuée deux fois dans le cas des phytopathogènes.

La DO des suspensions bactériennes est mesurée au spectromètre à 600 nm. Cette mesure permet de réaliser les éventuelles dilutions nécessaires pour obtenir une DO d'inoculum de façon à ce que la DO initiale dans le puits soit de 0.1 (peu importe la bactérie). Si besoin, conservation de l'inoculum à 4 °C pendant max 6 h.

Préparation de la microplaque

Les puits d'une même microplaque contiennent tous le même volume d'inoculum et le même volume de milieu. Chaque type de puits fait l'objet de trois répétitions (deux répétitions pour l'expérience 1.5, cfr. tableau 5). L'expérience 3.1 est relative au test d'antagonisme. Les puits de cette microplaque contiennent, en plus, un même volume d'un type de surnageant issu de cultures en fioles (LB, RE ou RE+Val) de cinq souches de Bacillus : FZB42, 98S, S499, 14A ou 41ph. Ces surnageants ont été dilués dans du NaCl (0.85%, m/m) de façon à obtenir une concentration finale en surfactine de 1, 2 ou 5 μ M dans chaque puits.

Les renvois aux numéros de sections dans la première colonne du tableau 5 se réfèrent aux numéros de la partie « Résultat ». Certaines des microplaques sont incubées au SpectraMax. Il s'agit d'un dispositif d'incubation permettant de mesurer simultanément la DO de chaque puits d'une microplaque (« SpectraMax M2^e », Molecular Devices ; Paramètres : T : 25°C ; mesure absorbance : 600 nm).

N° EXPÉRIENCE	BUT EXPÉRIENCE	SOUCHES	MILIEUX	NOMBRE DE PUIITS	INCUBATION
1.1.	Analyse UPLC-MS	S499	LB	48	Spectramax, 40 h
1.3.	Analyse UPLC-MS	S499	Exsudats naturels	12	28 °C, 24 h
1.4.	Analyse UPLC-MS	FZB42, 98S, S499, 14A, GA1	RE	48	SpectraMax, 40 h
1.5.	Analyse UPLC-MS, Mesure croissance (DO)	S499, endo412	LB, RE, RE+Val	48	SpectraMax, 24 h
3.1.	Mesure inhibition de croissance (DO)	<i>Clavibacter</i> , <i>Xanthomonas</i>	LB	96	SpectraMax, 24 h, 1 mesure / 30 min

Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques de chaque microplaque réalisée : souche(s) inoculée(s) (une seule par puits), milieux de culture dans les puits (un seul par puits), nombre de puits que contient la microplaque et paramètres d'incubations (Spectramax : « SpectraMax M2^e » (Molecular Devices) ; Paramètres : T : 25°C ; mesure absorbance : 600 nm). Le numéro de l'expérience se réfère au numéro de section de la partie « Résultats ».

2.3 CULTURES IN PLANTA

Culture de S499 sur plantules de tomates. L'objectif final est l'analyse par UPLC-MS (section 3.1) des homologues et variants de surfactines produits.

- Stérilisation des graines dans de l'EtOH (75%, v/v) et rinçage → culture plantules sur milieu Hoagland (T° ambiante, 7 j)
- Inoculation des racines : une fois la culture solide de S499 (section 2.1) à terme, préparer un inoculum de DO = 1 dans du NaCl (0.85%, v/v), déposer 5 μ l de cet inoculum sur le début de la racine (i.e. limite de la séparation tige / racine) → colonisation pendant 3 jours à 19 °C

- Extraction des surfactines : à l'aide d'un scalpel découper le milieu Hoagland entourant les 4 cm de racine à partir de l'extrémité de celle-ci. Transférer dans un falcon de 50 ml et couvrir les prélèvements (milieu+racine) avec 3 ml d'ACN 50% + 1% Ac formique → vortexer vigoureusement toutes les heures pendant 6 h
- Centrifuger (14000 rpm, 2 min) et récupérer les surnageants → Analyses UPLC-MS

3 TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Remarque : Chaque échantillon injecté à l'UPLC-MS et/ou à l'HPLC fait l'objet d'une filtration préalable sur 0.22 µm.

3.1 ANALYSES UPLC-MS

Les analyses UPLC-MS sont utilisées à deux fins, pour chacune d'entre elles, une méthode particulière est utilisée. La première est d'identifier les homologues et variants de surfactines présents dans un échantillon (surnageant de culture par exemple) : « méthode fragmentation ». La seconde consiste en l'évaluation de la concentration en surfactine dans l'échantillon¹⁵ : « méthode 3 familles ». Ces deux méthodes sont décrites aux points 2.1.1 et 2.1.2. Le software utilisé pour analyser les résultats est MassLynx.

- Système UPLC : Acquity H-Class SQ detector (Waters)
- Colonne chromatographique : C18 BEH, 1.7 µm, 5.1x15 mm (Waters)
- Solvants :
 - A : Eau + acide formique (0.1 %, v/v)
 - B : Acétonitrile + acide formique (0.1 %, v/v)

3.1.1 IDENTIFICATION : MÉTHODE « FRAGMENTATION »

Méthode UPLC

- Volume d'injection : 10 µl ; flux de la phase mobile : 0.6 ml/min.
- Elution :
 - 0 à 3.4 min : 25 % A
 - 3.4 à 3.5 min : 25 % A → 20 % A
 - 3.5 à 3.6 min : 20 % A → 5 % A
 - 3.6 à 5.1 min : 5 % A
 - 5.1 à 5.2 min : 5 % A → 25 % A

¹⁵ L'identification d'homologues et de variants est également possible *via* cette méthode.

5.2 à 7 min : 25 % A

Méthode MS (ionisation : ESI +)

- Voltage de cône : 120 V
- Température de la source : 130 °C
- Température de désolvation : 400 °C
- Flux de cône : N₂ à 50 l/h
- Flux de désolvation : N₂ à 1000 l/h
- Voltage capillaire : 3 kV
- Gamme du spectre MS : 800 → 1550 m/z

3.1.2 QUANTIFICATION : MÉTHODE « 3 FAMILLES »

Méthode UPLC

- Volume d'injection : 10 µl ; flux de la phase mobile : 0.6 ml/min.
- Elution :
 - 0 à 2.43 min : 70 % A → 5 % A
 - 2.43 à 5.1 min : 5 % A
 - 5.1 à 5.2 min : 5 % A → 70 % A
 - 5.2 à 7 min : 70 % A

Méthode MS (ionisation : ESI +)

Idem que la méthode « fragmentation », sauf pour la gamme du spectre : 800 → 1550 m/z.

3.2 FRACTIONNEMENT HPLC

L'HPLC a été utilisée dans le cadre du fractionnement de surnageants contenant différents homologues et variants de surfactines. Le but du fractionnement est de purifier chaque homologue séparément. Les surnageants sont issus de cultures en fioles RE+Val de S499, 98S et 14A (cfr. section 2.2.1). Les surnageants des trois souches ont été rassemblés, ce qui donne lieu à pool : RE+Val(S499+98S+14A).

Cet échantillon a été concentré sur cartouche C18 (cartouche C18 Chromafix, 300mg ; élution ACN 100%) avant passage en HPLC.

- Système HPLC : Agilent 1100 Series (Agilent)
- Colonne chromatographique : Eclipse Plus C18, 5 µm, 3x15 mm (Agilent)
- Solvants :
 - A : Eau + acide trifluoroacétique (0.1 %, v/v)
 - B : Acétonitrile + acide trifluoroacétique (0.1 %, v/v)

- Détecteur UV – Vis : 215 nm
- Volume d'injection : 100 µl ; flux d'éluant : 1 ml/min ; élution :
 - 0 à 25 min : 25 % A
 - 25 à 30 min : 25 % → 0 % A
 - 30 à 35 min : 0 % A
 - 35 à 38 min : 0 % A → 25 % A
 - 38 à 43 min : 25 % A

Chaque fraction récoltée (1 fraction/min) est ensuite destinée à être testée en microplaque en présence de phytopathogènes (test d'antagonisme). Enfin, l'analyse de l'évolution de la DO des pathogènes permet d'estimer le pouvoir inhibiteur de chaque fraction. La méthode des tests d'antagonisme est identique à celle décrite précédemment à la section 2.2.2 (expérience 3.1).

4 TECHNIQUES PCR

Cette manipulation vise à évaluer, par qPCR, la quantité d'ARN transcrits depuis le gène *srfA* de *B. amyloliquefaciens* S499 en fonction du milieu de culture : LB, RE et RE+Val (fioles de 40 ml, trois répétitions). Plusieurs prélèvements de ces cultures ont été effectués à des temps différents (3, 6, 9, 12 et 24 h). Après centrifugation, les culots sont conservés à -80 °C. Ensuite, la RT-qPCR comporte trois grandes étapes :

- L'extraction de l'ARN des culots (comprenant également un traitement DNase pour dégrader les molécules d'ADN présentes dans l'échantillon)
- La transcription inverse pour transformer l'ARN extrait en ADN
- La qPCR proprement dite pour amplifier la séquence ADN *srfA*.

4.1 ÉTAPE D'EXTRACTION DE L'ARN

Utilisation d'un kit commercial : NucleoSpin RNA isolation (Macherey Nagel). Le traitement DNase est inclus dans le kit. Le mode opératoire est celui décrit par les recommandations du fournisseur.

4.2 ÉTAPE RT

Utilisation d'un kit commercial : Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec). Le traitement DNase est inclus dans le kit. Le mode opératoire est celui décrit par les recommandations du fournisseur.

Le thermocycleur utilisé est le StepOne RealTime PCR Thermocycler System (Thermo Fisher). Le programme de température est le suivant :

ETAPE	TEMPS & TEMPÉRATURE
Initiation	10 min, 25 °C
« Reverse ranscription »	30 min, 48 °C
Inactivation de la RTase	5 min, 95 °C

Tableau 6 : Programme de température de la RT-PCR effectué sur l'ARN extrait des cultures *Bacillus amyloliquefaciens* S499 et de *Bacillus* sp. 412.

4.3 ETAPE QPCR

Utilisation d'un kit commercial : MESA Green qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentec). Le mode opératoire est celui décrit par les recommandations du fournisseur. La quantification se fait *via* le fluorochrome SYBR Green (se fixe sur l'ADN double brin). La quantité de séquences *srfA* amplifiées est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence mesurée. Le gène de la gyrase (*gyr*) est utilisé comme référence car il est admis que son expression est constante au cours du temps, quelles que soient les conditions. La quantification de l'expression de *srfA* se fait donc en comparaison à celle de *gyr*.

Séquence des primers utilisés :

- *srfA* forward (5'ATTGTTTACGGTCGCTCTGG3')
- *srfA* reverse (5'CGCTGCGATAGTCAAAATCA3')
- *gyr* forward (5'GAGACGCACTGAAATCGTGA3')
- *gyr* reverse (5'GCCGGGAGACGTTTAACATA3')

Le thermocycleur utilisé est le StepOne RealTime PCR Thermocycler System (Thermo Fisher). Le programme de température est le suivant :

ETAPE	TEMPS & TEMPÉRATURE	RÉPÉTITION
Dénaturation	10 min, 95 °C	X1
Amplification	Dénaturation	15 sec, 95 °C
	Hybridation & élongation	1 min, 60 °C
Dernière amplification	Dénaturation	15 sec, 95 °C
	Hybridation & élongation	1 min, 60 °C
Inactivation	15 sec, 95 °C	X1

Tableau 7 : Programme de température de la qPCR effectué sur l'ARN extrait des cultures *Bacillus amyloliquefaciens* S499 et de *Bacillus* sp. 412. Cet ARN a préalablement été retranscrit en ADN par une RT-PCR. La fluorescence est mesurée à chaque hybridation (SYBR Green ne se fixe que sur l'ADN double brin).

Le software utilisé pour l'analyse des résultats est la version 2.3 de StepOne (Thermo Fisher).

5 TESTS « ROS » INTRACELLULAIRES

Le but de cette manipulation est de comparer l'effet éliciteur des surfactines issues d'une culture en fiole RE de S499. A cette fin, la production de ROS générés à l'intérieur des cellules racinaires de plantules de tomates est mesurée. Cette mesure est effectuée *via* la fluorescence d'un composé, le DCFH-DA, qui a la capacité de rentrer dans les cellules. Cette substance réagit alors avec les ROS pour former un composé fluorescent. La fluorescence observée est donc proportionnelle à la quantité de ROS présents dans les cellules de la racine. Les mesures sont comparées à deux autres tests ROS réalisés avec :

- La flagelline, provoquant elle aussi l'apparition de ROS, est utilisée comme contrôle positif : solution 1 μM
- La surfactine standard : solution 20 μM

Le mode opératoire détaillé est décrit ci-dessous :

5.1 PRÉPARATIONS DES SOLUTIONS

- Solution de DCFH-DA de 15 μM (Conserver à l'abri de la lumière) :
2,2 mg de poudre de DCFH-DA
40 ml de Na_2CO_3 à 7,7mg/ml dans de l'eau distillée.
- Solution de surfactines standards : dans de l'eau distillée, préparation d'une solution à 20 μM à base de poudre de surfactines commerciale
- Solution de surfactines issues d'une culture de S499 en milieu RE dont le surnageant a été concentré sur C18 300 mg et récupérer dans de l'ACN 100%. Quantification de la [surfactines] par UPLC-MS et dilution pour obtenir du 20 μM .

TESTS ROS

- Cultiver sur milieu Hoagland des plantules de tomates (de façon identique à la culture présentée à la section 2.3) pendant 1 à 2 semaines (l'idéal est d'avoir des racines de 5-6 cm).
- Pour chaque plantule, découper trois segments de 0.5 cm à partir de l'extrémité de la racine.
- Placer dans un des puits d'une microplaque à 96 puits (noire, opaque) les trois segments. Les puits sont préalablement remplis avec 200 μl d'eau du robinet stérilisée sur filtre 0.22 μm .
- Laisser reposer 2h
- Prélever l'eau et la remplacer par 200 μl de la solution de DCFH-DA 15 μM
- Retirer le DCFH-DA des puits après 15 min.
- Ajouter 200 μl de solution contenant (9 répétitions pour chaque solution) :
 - le témoin flagelline, 1 μM

- la surfactine standard, 20 μ M
 - la surfactine issue de la culture RE, 20 μ M.
- Pour les blancs, ajouter 200 μ l d'eau distillée à la place des solutions élicitrices
- Préparer un blanco supplémentaire avec 200 μ l d'ACN 100%
- Effectuer une mesure de fluorescence au Spectramax toutes les 20 min pendant 3 h et une mesure après 17h (excitation 485 nm ; émission 530 nm ; agitation 5 sec avant mesure).

RESULTATS

1 CARACTERISATION PAR UPLC-MS DES HOMOLOGUES DE SURFACTINES PRODUITS SELON DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CROISSANCE

La première partie du travail a été consacrée à l'étude détaillée des homologues de surfactines dites « standards » (Figure 6) disponibles au laboratoire et purifiés à partir d'une culture gros volume dans un milieu optimisé, suivie d'une extraction par précipitation acide, puis d'une extraction solide/liquide. Une procédure HPLC préparative à partir de l'extrait semi-purifié permet finalement d'obtenir ces surfactines. Tout au long de ce manuscrit, les surfactines décrites peuvent varier entre elles de deux façons :

- Homologues : variation de la longueur de la chaîne d'acide gras. Un même homologue peut avoir trois configurations isomériques de la chaîne d'AG (Acide Gras) différentes : linéaire, iso et anteiso.
- Variants : variation de la séquence d'acides aminés du cycle peptidique.

Les spectres globaux de ces standards de surfactines sont montrés dans la figure 6. L'ionisation en MS se fait en ESI+, les ions sont générés sous forme d'adduits H⁺ ou Na⁺. On retrouve différents homologues qui ont tous la séquence **AG – Glu – Leu – Leu – Val – Asp – Leu – Leu**.

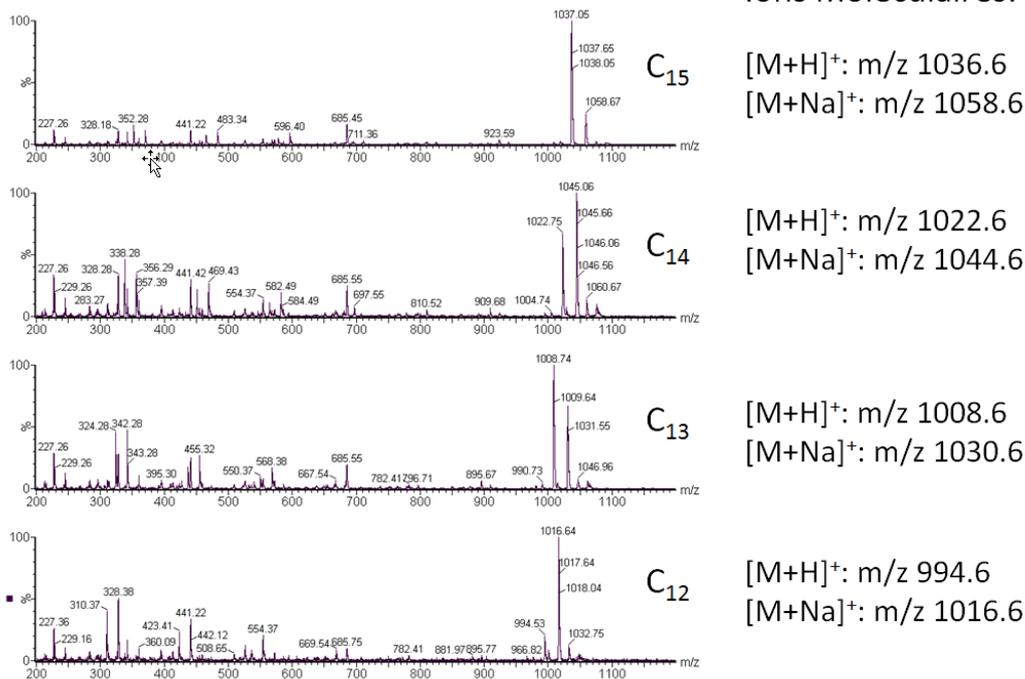


Figure 6 : Full scan des spectres de masse des quatre principaux homologues de surfactines pures (standard). C₁₅, C₁₄, etc. se réfèrent au nombre de carbones que contient la chaîne d'acide gras (donc au type d'homologue de surfactine). $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ sont les ions moléculaires : M = molécule analysée, H ou Na = atome d'ionisation, m = masse, z = charge (ici z = 1 puisque l'ionisation se fait via H⁺ ou Na⁺). Méthode UPLC-MS : fragmentation.

Ces spectres reflètent donc les formes produites par *B. amyloliquefaciens* cultivé en milieu optimisé (variation de la longueur de la chaîne carbonée uniquement) (Jajor *et al.*, 2016).

Afin d'identifier les différents fragments de surfactine retrouvés sur les spectres, la figure 7 présente le schéma de fragmentation de la surfactine :

- Fragments contenant l'acide gras (m/z augmenté de 14, masse molaire de CH₂, quand on passe à l'homologue contenant un carbone de plus dans la chaîne) : b1 (FA-Glu), b2 (FA-Glu-Leu), b3 (FA-Glu-Leu-Leu), b5 (FA-Glu-Leu-Leu-Val-Asp), b6 (FA-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu).
- Fragments internes (aucune différence de m/z entre les homologues) : y6-b5 (Leu-Leu-Val-Asp), y6-b6 (Leu-Leu-Val-Asp-Leu), etc.
- Fragments contenant la fin du peptide (aucune différence de m/z entre les homologues) : y6 (Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu), etc.

Dans le spectre de la figure 8, il s'agit de l'homologue C₁₂ de la surfactine standard. Cette figure sert d'exemple pour l'identification des fragments « clés » qui permettent la détermination de l'homologue / variant en présence.

Raisonnement-type pour l'identification de la surfactine en présence (ici, C12, donné à la figure 8) :

- AA en 1 = $b_1 - \text{Acide Gras} = 328 - 199 = \mathbf{129 \text{ (Glu)}}$
- AA en 2 = $b_2 - b_1 = 441 - 328$ (fragments avec H_2O) ou $423 - 310$ (fragments $-\text{H}_2\text{O}$) = **113 (Leu)**
- AA en 3 = $b_3 - b_2 = 554 - 441$ ou $536 - 423 = \mathbf{113 \text{ (Leu)}}$
- ...
- AA en 6 = $(y_6 - b_6) - (y_6 - b_5) = 554 - 441 = \mathbf{113 \text{ (Leu)}}$
- AA en 7 = $M - b_6 = 994 - 881$ (fragments H^+) ou $1016 - 903$ (fragments Na^+) = **113 (Leu)**

Où « M » est le m/z du pic correspondant à l'ion moléculaire.

Le même type de raisonnement est appliqué pour tous les spectres de masse analysés dans les chapitres ultérieurs et/ou reportés en annexe. En effet, si certains acides aminés de la séquence peptidique ne varient pas selon les conditions de croissance de *Bacillus* (domaine d'adénylation du module NRPS spécifique à un seul a.a.), d'autres modules sont suspectés d'être plus flexibles sur la sélection de l'a.a.. Ces modules concernent les positions 1 (Glu / Asp), 2 (Leu / Ile / Val), 4 (Val / Ile) et 7 (Leu / Ile / Val) et peuvent conduire à la synthèse de variants de surfactines dans certaines conditions de croissance (Challis *et al.*, 2000). Ce type d'analyse permettra de déterminer la séquence peptidique (exacte ou approximative) de certains variants produits dans les différentes conditions testées.

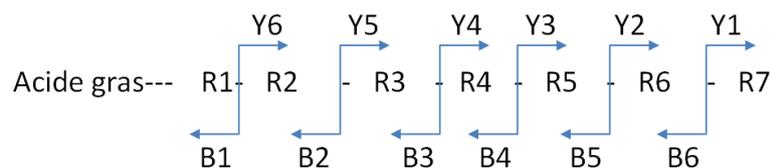


Figure 7 : Schéma de fragmentation de la surfactine en UPLC-MS. R1, R2, etc. sont les acides aminés du cycle. Les fragments « b » contiennent la chaîne carbonée et au moins un a.a., tandis que les fragments « y » ne contiennent que des a.a.

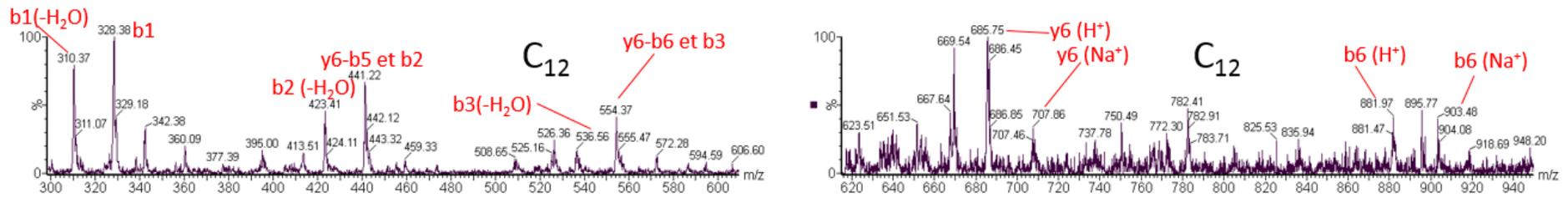


Figure 8 : Fragments « clés » permettant l'identification de l'homologue en présence ainsi que du cycle peptidique (homologue C₁₂ dans ce cas-ci). Un même fragment peut donner lieu à plusieurs pics : distants de 22 m/z selon l'ionisation (H⁺, MM = 1) ou (Na⁺, MM = 23), distants de 18 m/z selon qu'il ait perdu une molécule d'eau (-H₂O) ou non. Les pics de y6-b5 et de y6-b6 correspondent avec ceux de b2 et b3. Ce n'est pas le cas pour les spectres des autres homologues puisque les fragments « b » sont fonction de la longueur de la chaîne d'AG. Méthode UPLC-MS : fragmentation.

1.1 HOMOLOGUES DE SURFACTINES PRODUITS EN MILIEU LB

L'objectif est de s'assurer que la souche *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499 produit bien les homologues standards de surfactines précédemment décrits lorsqu'elle est cultivée en milieu LB liquide (milieu synthétique de référence). Ci-dessous, la figure 9 montre les chromatogrammes obtenus en UPLC-MS lors de l'éluion des surfactines produites en milieu LB (40h, 25°C) par S499.

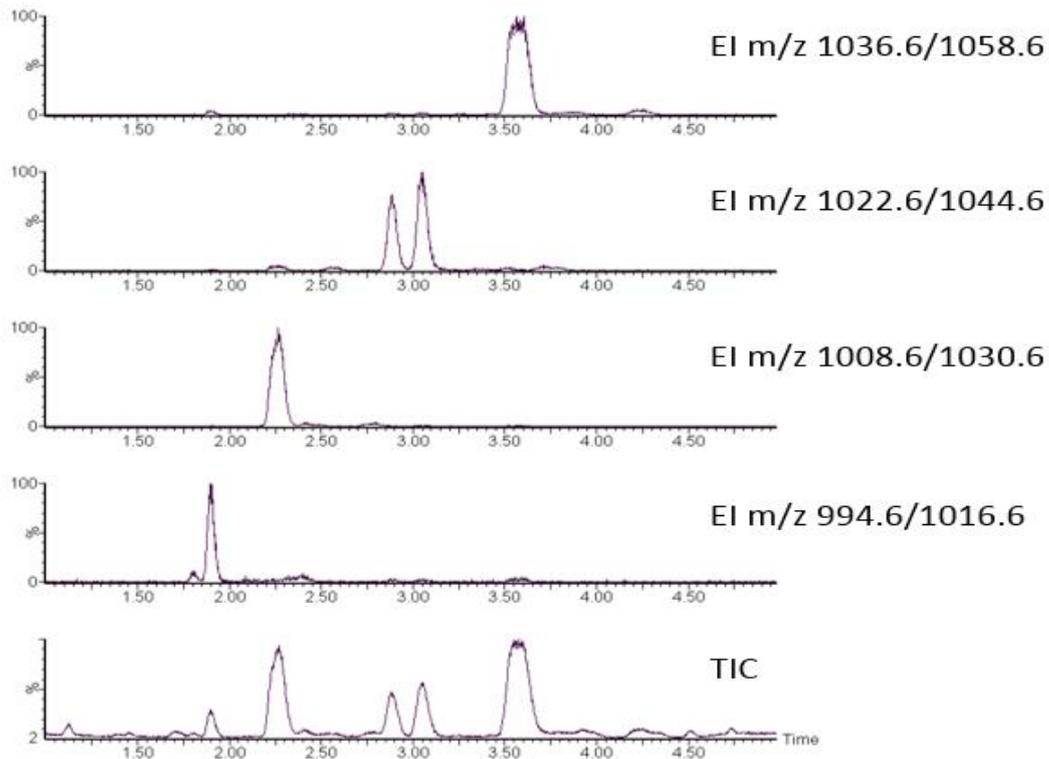


Figure 9 : Chromatogrammes des homologues de surfactine produits en milieu LB liquide. EI : Extracted Ion (traces pour un m/z donné). TIC : Total Ion Current (tous les ions représentés sur un même graphe). Méthode UPLC-MS : fragmentation.

Les ions moléculaires correspondant aux 4 homologues standards (cf. figure 6) sont bien présents. Cependant, avant de pouvoir dire qu'il s'agit bien de surfactines standard, il faut procéder à l'analyse complète du profil des spectres de masse, l'ion moléculaire seul ne suffit pas. En effet une variation d'un carbone dans la chaîne provoque une différence de 14 m/z. De la même façon, deux mêmes homologues dont la séquence peptidique ne diffère que par une leucine pour l'un (MM = 113) remplacée par une valine pour l'autre (MM = 99) donnera également lieu à une différence de 14 m/z pour l'ion moléculaire.

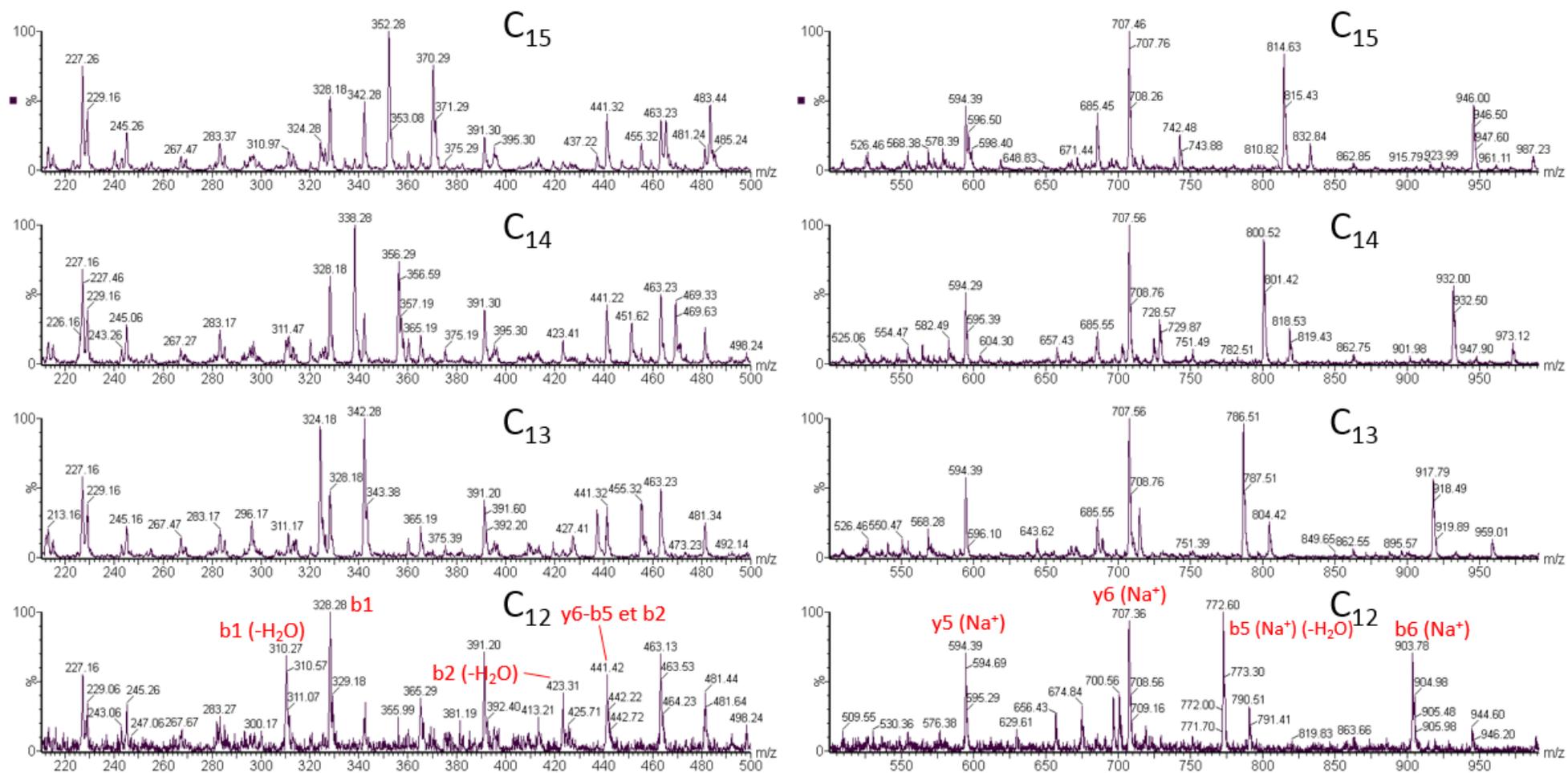


Figure 10 : Spectres de masse de chaque EI de la figure 4. Exemple d'analyse pour l'homologue C₁₂ : la plupart des fragments « clés » de la figure 3 sont clairement identifiables, les autres pics dominants correspondent bien à des fragments de la surfactine standard C₁₂. Les mêmes constatations peuvent être faites pour les profils des spectres de chaque autre homologue de la figure 6. Méthode UPLC-MS : fragmentation.

Le chromatogramme EI m/z 1022.6/1044.6 de la figure 9 présente deux pics dont les ions moléculaires ont la même masse. Ceci est dû à deux types de conformation de la chaîne d'AG : linéaire pour le premier pic et iso pour le second (aucun changement de la masse, mais temps d'élution différent). Il s'agit bien du même homologue : C14 en l'occurrence. Le changement de conformation de l'AG n'en fait pas un « variant » (spécifique à un changement dans la séquence d'a.a.).

Suite à la lecture des spectres de la figure 10, il peut en être déduit que les homologues de surfactine produits par *B. amyloliquefaciens* S499 en milieu LB sont bien les homologues standards de surfactine (AG – Glu – Leu – Leu – Val – Asp – Leu – Leu) car les masses des fragments représentatifs de la partie peptidique (de type y) sont identiques pour les quatre pics. Les cultures en milieu LB seront donc utilisées comme culture de référence pour la suite de ce travail.

1.2 HOMOLOGUES DE SURFACTINES PRODUITS *IN PLANTA*

Les résultats de cette manipulation doivent permettre de comparer les homologues / variants produits *in planta* par S499 aux homologues standards retrouvés en LB.

Les cultures sur plantules s'opèrent comme suit : sur milieu Hoagland (milieu pauvre), des plantules de tomates (cultivées préalablement sur ce même milieu) sont inoculées avec 5 µl d'une suspension (DO = 1) de S499. Après trois jours d'incubation à 19 °C, les racines sont prélevées et la surfactine en est extraite avec de l'ACN 50%. Cet extrait est ensuite analysé par UPLC-MS.

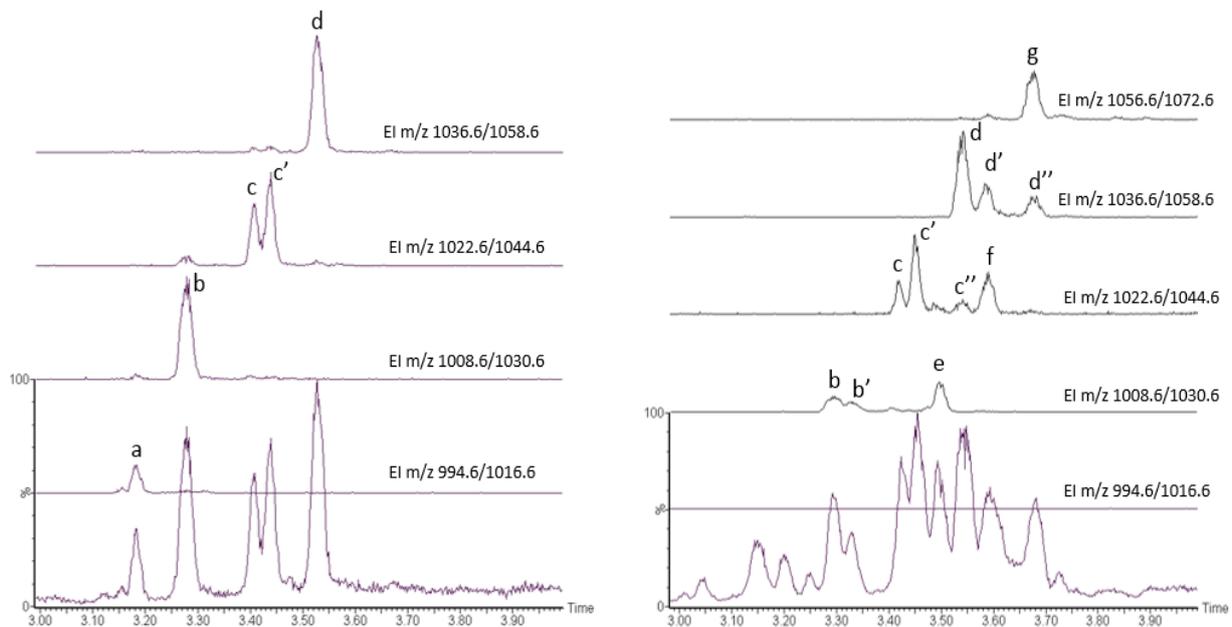


Figure 11 : Chromatogrammes UPLC des surfactines produites par *B. amyloliquefaciens* en milieu LB liquide (gauche) et sur racines de plantules de tomates (droite). a(; '), b(; '), c(; '), d(; ') correspondent respectivement aux homologues standards C12, C13, C14 et C15, linéaires, iso (') et anteiso ("). Les surfactines produites sur racines présentent des pics additionnels e, f et g. Méthode UPLC-MS : 3 familles.

Sur base de l'aire des pics (même échelle des ordonnées), une première observation laisse supposer qu'on retrouve plus d'homologues C14 et C15 ainsi que moins de C12 et C13 formés *in planta* en comparaison à une culture en LB. Deuxièmement, sur base du nombre de pics, il y a une plus grande diversité de conformation de la chaîne d'AG. Et troisièmement, la diversité de surfactines produites sur plantules se traduit aussi par l'apparition de trois pics additionnels (e, f et g). Le spectre « e » est donné à la figure 12 pour illustrer l'identification d'un variant (les autres spectres sont reportés en annexe, mais l'identification de f et g est décrite ci-après). Comme expliqué précédemment, ce n'est pas parce que la masse de l'ion moléculaire de e, f ou g égale celle d'un homologue standard qu'il s'agit de cet homologue. En effet, une longueur d'AG différente peut être compensée par un changement d'a.a. dans le cycle peptidique, donnant lieu à une masse totale équivalente à un homologue classique. Il est donc indispensable d'analyser les spectres de masse de ces « nouveaux » pics.

Pic « e » : analyse du spectre

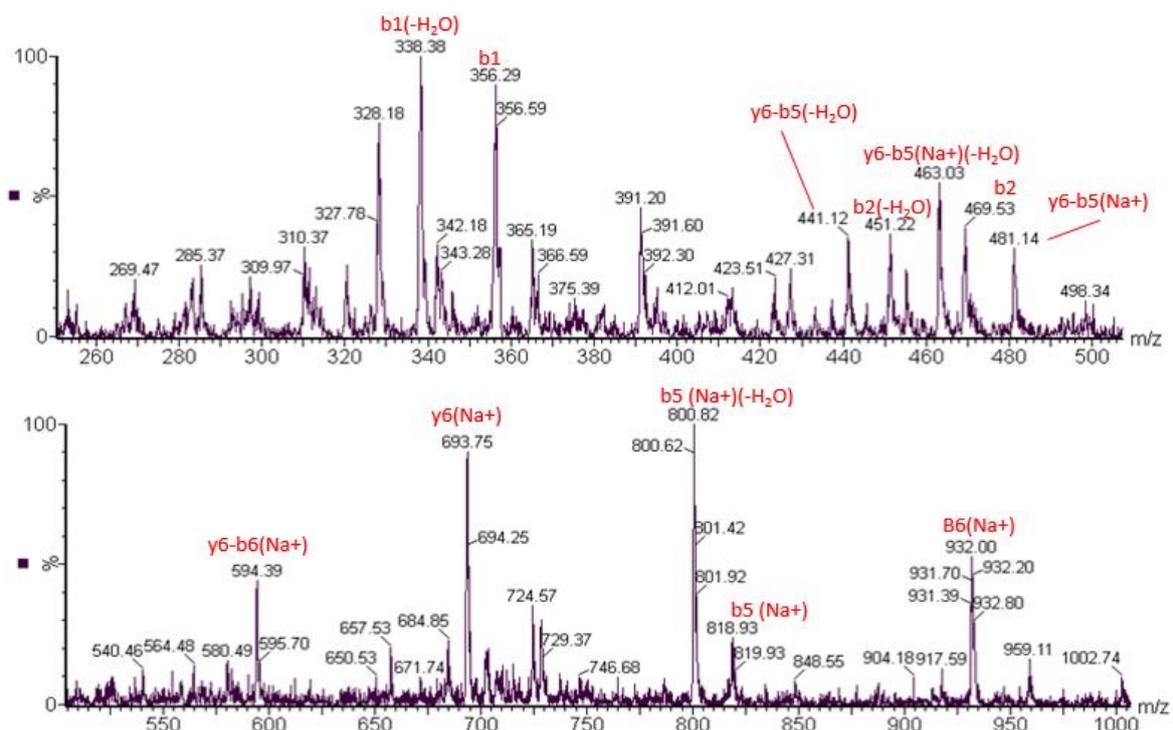


Figure 12 : Spectre de masse du pic « e » observé sur le chromatogramme des surfactines issues des cultures *in planta* sur tomates. Méthode UPLC-MS : fragmentation.

Les fragments b1 (FA-Glu) à m/z 356 (m/z 338, (-H₂O)) et b2 (FA-Glu-Leu) à m/z 469 (m/z 451, (-H₂O)) indiquent qu'il s'agit d'un homologue C14.

Les fragments b5 à m/z 818 (m/z 800, (-H₂O)) et b6 à m/z 931 qui représente perte de 99 mu (mass unit) par rapport à l'ion moléculaire m/z 1030 donnent une première indication comme quoi le dernier a.a. du peptide est une Val alors que celui en position 6 est conservé, soit une Leu.

Les fragments y6-b5 à m/z 441 (m/z 463 (Na⁺), m/z 481 (sans perte d'H₂O)) et y6-b6 à m/z 594 (Na⁺, sans perte d'H₂O), quant à eux nous permettent de dire que la partie interne du peptide (Leu-Leu-Val-Asp-Leu) est conservée.

Par conséquent, y6 à m/z 693 (Na⁺, sans perte d'H₂O), représentant une perte de 14 mu en comparaison à la forme standard (Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) nous confirme bien que l'a.a. en position 7 est une valine.

➔ **Variante e : C14-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Val**

Pic « f » : analyse du spectre

Les fragments b1 à m/z 370 (m/z 352, (-H₂O)) et b2 à m/z 483 (m/z 471, (-H₂O)) indiquent qu'il s'agit ici d'un homologue C15.

Le fragment b6 à m/z 945 représente une perte de 99 mu par rapport à l'ion moléculaire m/z 1044 indique que le dernier a.a. du peptide est une Val.

Comme pour le pic e, les fragments y6-b5, à m/z 441, m/z 463 (Na⁺) et m/z 481 (sans perte d'H₂O)) et y6-b6 à m/z 594 (Na⁺, sans perte d'H₂O) permettent de conclure que la partie interne du peptide (Leu-Leu-Val-Asp-Leu) est conservée.

Par conséquent, le fragment y6 à m/z 693 (Na⁺, sans perte d'H₂O) représentant une perte de 14 mu comparé à la forme standard (Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) nous confirme que l'a.a. en position 7 est une valine.

➔ **Variante f : C15-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Val**

Pic « g » : analyse du spectre

Les fragments b1 (FA-Glu) à m/z 370 (m/z 352, (-H₂O)) et b2 (FA-Glu-Leu) à m/z 483 (m/z 471, (-H₂O)) nous indiquent qu'il s'agit à nouveau d'un homologue C15.

Le fragment b6 (FA-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu) à m/z 937 (m/z 959 (Na⁺)) représentant une perte de 113 mu par rapport à l'ion moléculaire à 1050 / 1072 m/z permet de conclure que le dernier a.a. du peptide est une Leu/Ile. (Fragment b5 non apparent).

y6-b5 à m/z 455 indique que la partie interne du peptide est modifiée puisque y6-b5 représente un gain de 14 mu par rapport à la forme standard. Ce qui est confirmé par y6 à m/z 699 (m/z 721 (Na⁺)) lui aussi représentant un gain de 14 mu par rapport à la forme standard. Il s'agit donc ici d'une substitution de la Val4 par une leucine (ou isoleucine Ile).

➔ **Variante g : C15-Glu-Leu-Leu-Leu/Ile-Asp-Leu-Leu**

Cette analyse a donc permis de mettre en évidence la présence de trois variants formés *in planta* et qui ne sont pas produits en milieu LB. Remarquons ici que ces identifications nécessitent une confirmation par une analyse MS-MS plus poussée. Cette remarque est valable pour toutes les identifications de variants réalisées dans ce travail.

1.3 HOMOLOGUES DE SURFACTINES PRODUITS EN MILIEU « EXSUDATS NATURELS »

L'objectif poursuivi ici est d'obtenir des indications permettant de savoir si les exsudats racinaires sont majoritairement responsables de l'apparition des trois variants. Par exemple, les racines elles-mêmes peuvent jouer un rôle dans la synthèse de différents types de surfactines (émission de composés volatiles, perception par S499 des parois cellulaires végétales, (Debois et al., 2015)...). Ici on cherche à connaître l'influence des exsudats seuls (i.e. milieu nutritionnel).

Des exsudats de plantules de tomates sont récoltés, ajustés à pH 7 et enrichis en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (concentration « ajoutée » : 1 g/l). Il s'agit donc d'un milieu liquide assez pauvre ne contenant comme sources de carbone que les composés relargués par la plante. Après 24h d'incubation, la DO à 600nm est en effet assez faible, d'environ 0.6. L'analyse du surnageant de cette culture par UPLC-MS est montré dans la figure 13.

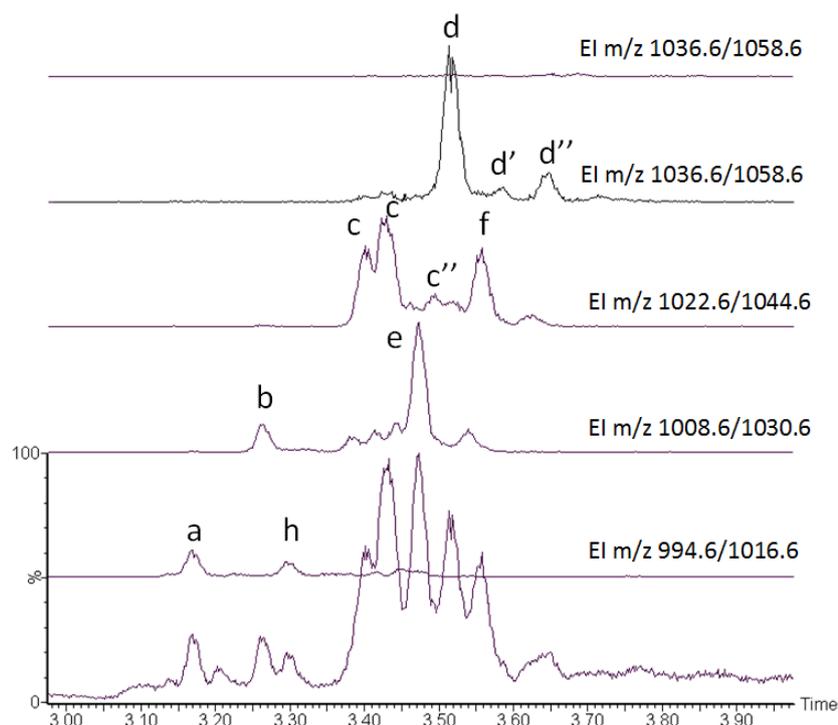


Figure 13 : Chromatogramme des surfactines issues d'une culture de S499 en milieu « exsudats naturels ». Les pics de « a » à « d » sont les homologues classiques retrouvés en culture LB. Les pics « e » et « f » sont ceux retrouvés précédemment dans les cultures *in planta*. Le pic « h » n'a pas encore été observé dans le cadre de ces expériences. Méthode UPLC-MS : 3 familles.

Les homologues classiques sont à nouveau présents ainsi que les variants e et f. Le « nouveau » pic h, quant à lui n'a pas été observé dans le mélange de surfactines produites lors de la croissance in planta, son profil de fragmentation est détaillé ci-dessous et illustré à la figure 14.

Pic « h » : analyse du spectre

Les fragments b1 (FA-Glu) à m/z 342 (m/z 324, (-H₂O)) et b5 (FA-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu) à m/z 804 (m/z 786, (-H₂O)) nous indiquent que la surfactine en présence est un homologue C13.

Le dernier a.a. du peptide est une valine car le fragment b6 : m/z 917(Na⁺) représente une perte de 99 mu par rapport à l'ion moléculaire m/z 1016.

Les fragments y6-b5 (Leu-Leu-Val-Asp) à m/z 441, m/z 463 (Na⁺) et m/z 481 (Na⁺, sans perte d'H₂O) et y6-b6 (Leu-Leu-Val-Asp-Leu) à m/z 594 (Na⁺, sans perte d'H₂O) permettent de dire que la partie interne du peptide (Leu-Leu-Val-Asp) (Leu-Leu-Val-Asp-Leu) est conservée.

En conséquence, le fragment y6 à m/z 693 (Na⁺, sans perte d'H₂O) représentant une perte de 14 mu par rapport à la forme standard (Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) nous confirme encore que le dernier a.a. est une valine.

➔ **Variante h : C13-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Val**

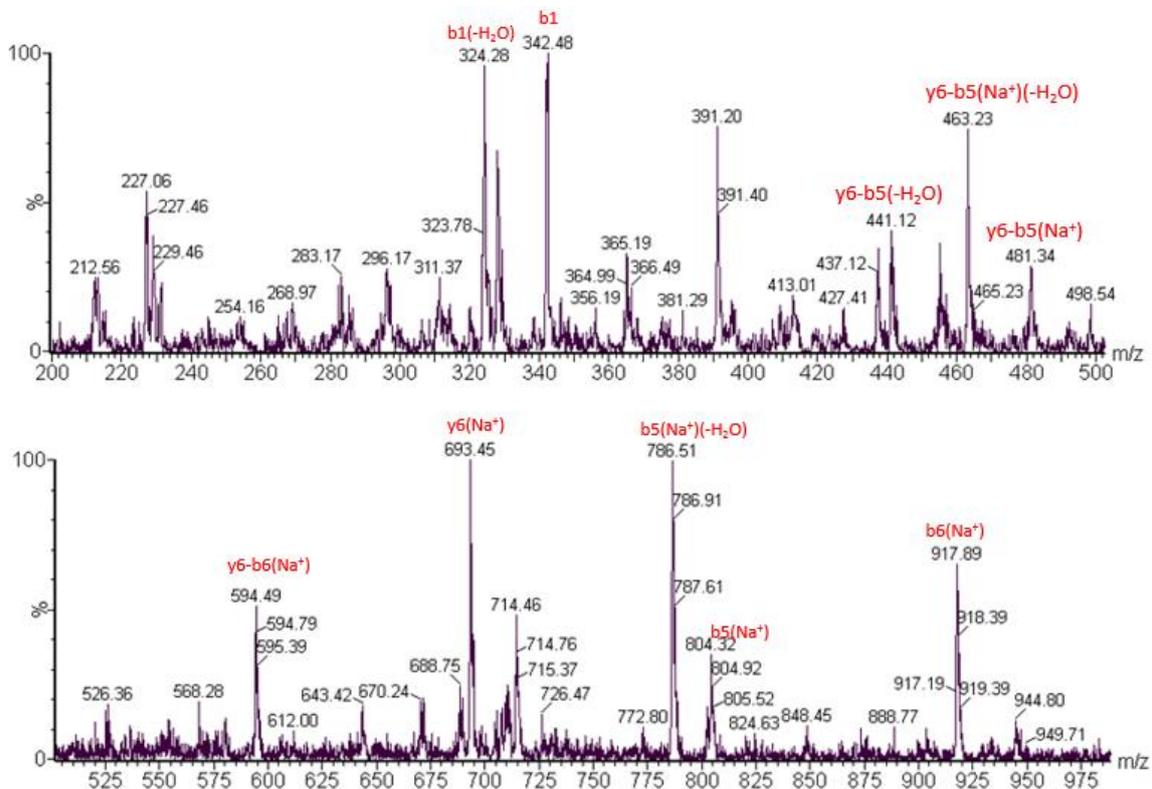


Figure 14 : Spectre de masse du pic « h » observé sur le chromatogramme des surfactines issues des cultures en milieu « exsudats naturels ». Méthode UPLC-MS : fragmentation.

Globalement, on observe quelques différences avec les surfactines retrouvées *in planta*, notamment l'absence du pic « g » et l'apparition pic « h ». Cependant, la diversité des surfactines est tout à fait comparable à celle trouvée *in planta*. Il est semble donc bien que le contexte nutritionnel constitue le facteur principal influençant la diversité des surfactines synthétisées par *Bacillus amyloliquefaciens* S499.

1.4 HOMOLOGUES DE SURFACTINES PRODUITS EN MILIEU « RECOMPOSED EXUDATES » (RE)

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons testé le milieu RE. En effet puisque c'est surtout le contexte nutritionnel qui influence la diversité des surfactines, il serait dès lors nettement plus avantageux de travailler avec un milieu synthétique imitant les exsudats, mais ne présentant pas les inconvénients du milieu précédent constitué d'exsudats naturels (long et fastidieux à préparer et composition variable).

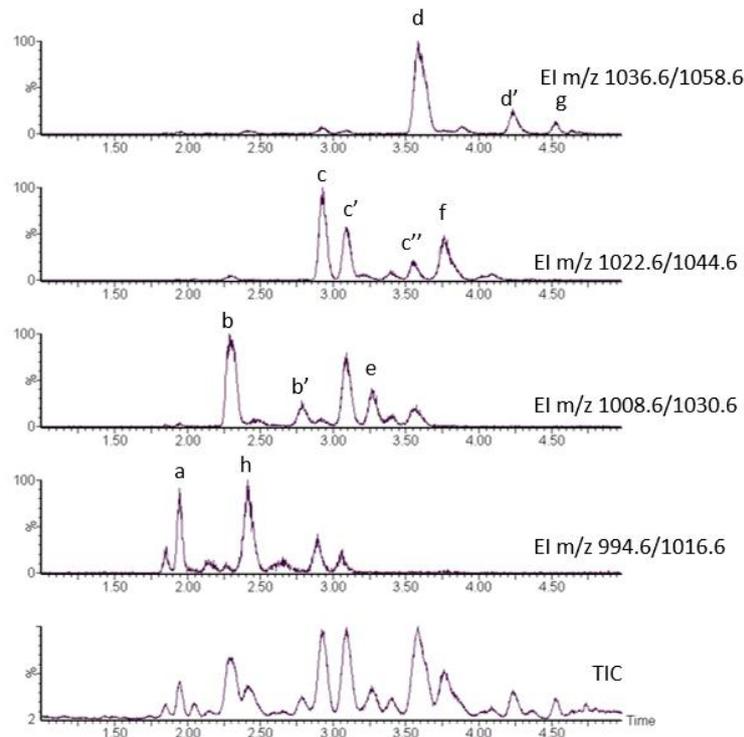


Figure 15 : Chromatogramme des surfactines produites lors d'une culture de 40 h de S499 en milieu RE (SpectraMax). Méthode UPLC-MS : Fragmentation

Ce qui ressort de ces chromatogrammes, comme pour les deux autres milieux testés, c'est la plus grande diversité en conformations isomériques des chaînes d'AG.

Par ailleurs, il peut être constaté que tous les variants identifiés plus haut sont produits, à l'exception du variant g. C'était exactement le même cas de figure pour les variants produits lors de la culture sur plantules : e, f et h.

Le milieu RE, imitant les exsudats naturels, conforte donc encore l'idée que le milieu nutritionnel est déterminant dans le profil des surfactines produites par *Bacillus amyloliquefaciens* S499. Le spectre du pic nommé « g » n'a pas pu permettre d'identification, cependant, tout indique qu'il doit s'agir de l'homologue « d' » vu qu'il est également présent en milieu *in planta*. Un nouveau passage en MS serait nécessaire afin d'obtenir un spectre lisible. D'autres pics n'ont pu être identifiés car ils correspondent à des homologues / variants co-élus avec une forme déjà identifiée.

Cette expérience a également été menée avec d'autres souches de *B. amyloliquefaciens* : GA1, 98S et FZB42, dans des conditions parfaitement similaires. Pour chacune, les mêmes observations peuvent être faites, les profils chromatographiques sont identiques. Les seuls changements constatés étant l'intensité des pics des différentes formes de surfactine.

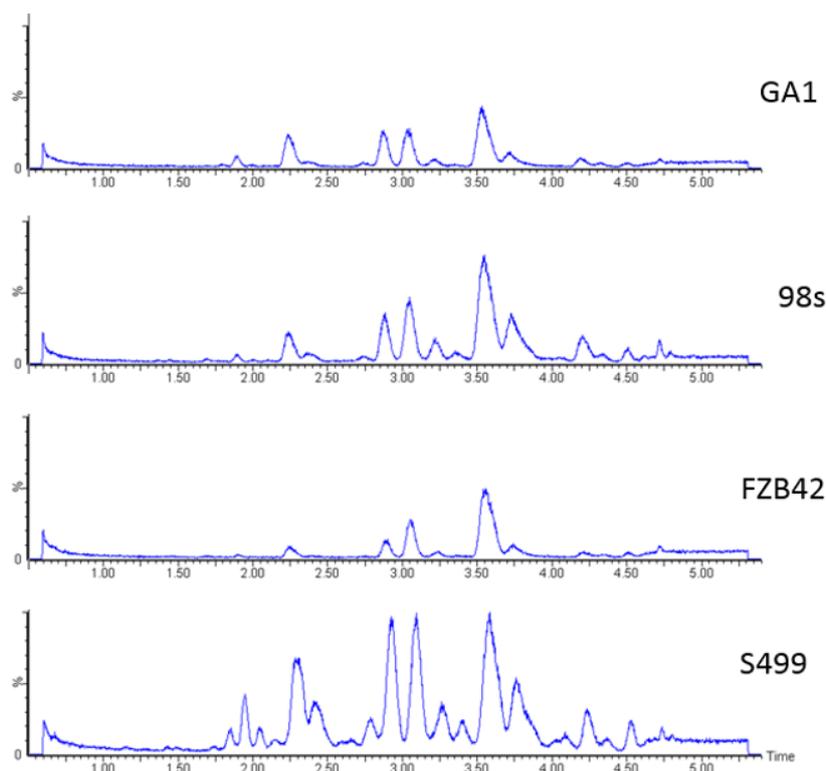


Figure 15 : Chromatogramme des surfactines produites lors de cultures de 40 h de S499, FZB42, 98S et GA1 en milieu RE (SpectraMax). Méthode UPLC-MS : Fragmentation.

Ces chromatogrammes supportent le fait que les variants de surfactines produits par *B. amyloliquefaciens* sont conservés d'une souche à l'autre.

En conclusion, ces résultats sont globalement similaires à ceux obtenus *in planta* et en exsudats naturels, à savoir, la production de variants et de plus d'isomères d'homologues comparativement au milieu riche de référence LB. Les profils de surfactines en RE et exsudats naturels sont identiques, à l'exception des pics co-élus en RE dont l'identification, par conséquent, n'est pas possible sans une analyse MS-MS plus poussée.

Puisque le milieu RE permet la production du « même » éventail d'homologues / variants que celui produit sur la plante, toutes les comparaisons dans la suite de ce travail se feront entre LB et RE. En effet, ce dernier est beaucoup plus simple à utiliser en laboratoire au vu du travail fastidieux et difficilement répétable que requiert la préparation des exsudats naturels.

Suite à ces premiers résultats, il peut être intéressant de comparer la production de variants de *Bacillus amyloliquefaciens* à une autre espèce. De cette façon, des informations pourront éventuellement être obtenues pour savoir si cet éventail de surfactines est spécifique à *B. amyloliquefaciens*, ou si au contraire, les mêmes variations sont observées sur un autre bacille.

1.5 COMPARAISON A DES HOMOLOGUES PRODUITS PAR UNE SOUCHE DE *BACILLUS* ENDOPHYTE EN MILIEUX LB ET RE

Les sections 1.2 et 1.3 ont permis de mettre en évidence des substitutions dans le cycle peptidique en position 4 et 7. Ce même genre de « remplacement » d'a.a. a été rapporté pour certaines souches de *Bacillus* appartenant à d'autres espèces que *B. subtilis* / *amyloliquefacines*, notamment pour *B. pumilus* dont le mode de vie peut être entièrement ou partiellement endosymbiotique (Challis *et al.*, 2000). Cette comparaison est pertinente puisque ces deux espèces sont proches d'un point de vue taxonomique mais différentes au niveau de leur mode de vie. De plus, *B. pumilus* ne produit pas, normalement, de surfactine proprement dite, mais un variant repris dans le tableau 2 : la pumilacidine (famille des surfactines).

Les souches S499 et *B. pumilus* « endo412 » sont cultivées en microplaque pendant 24 h dans trois types de milieux : LB, RE et RE+Val. Ce dernier milieu est testé pour observer l'impact que peut avoir un enrichissement en un acide aminé (2 g/l) sur la production de variants. L'acide aminé concerné ici est la valine puisqu'il est impliqué dans certaines variations de la séquence d'a.a., comme cela a été observé avant.

Dans un premier temps, la variation globale de la DO à 600nm permet de comparer la croissance de ces deux souches dans les trois milieux. Ces données sont reprises à la figure 16.

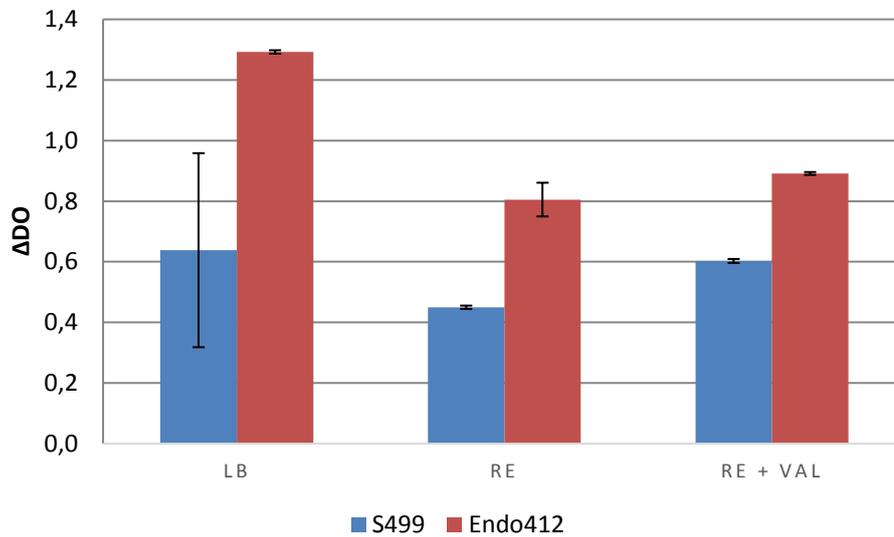


Figure 16 : Augmentation de DO ($\Delta DO = DO \text{ finale} - DO \text{ initiale}$) sur 24h de deux cultures liquides : *B. amyloliquefaciens* S499 et *Bacillus pumilus*. 412 (endophyte). 3 milieux différents sont testés : LB, RE et RE+Val.

Quel que soit le type de milieu, l'augmentation de DO est toujours plus importante pour la souche endophyte (moyennes et écarts-types calculés sur base de trois répétitions). Cela reflète une plus grande propension de endo412 à allouer les sources de carbone dans la formation de biomasse en comparaison à S499 et ce, quel que soit le milieu. De façon assez logique, le milieu riche LB donne lieu à la croissance la plus importante pour S499 comme pour endo412.

En ce qui concerne les analyses UPLC-MS des surnageants, aucune différence qualitative n'est constatée entre S499 cultivé en RE et en RE+Val mais l'aire des pics correspondants aux variants Val7 est plus importante (voir annexe). A l'inverse, pour endo412, les différences sont uniquement observées entre RE et RE+Val. Les chromatogrammes en RE et LB présentaient exactement les mêmes pics. Ci-dessous, le chromatogramme du *Bacillus* endophyte 412 en RE. Le chromatogramme en RE+Val sera également analysé par la suite.

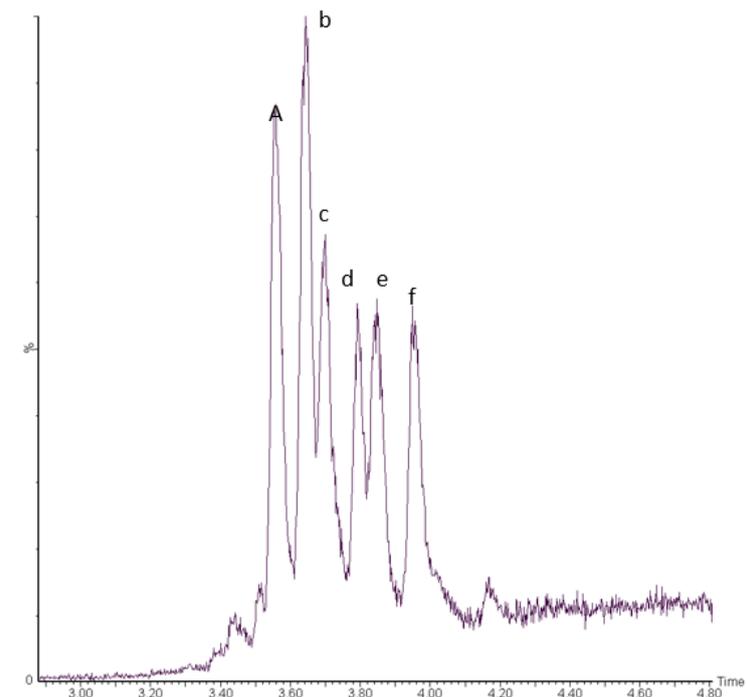


Figure 17 : Chromatogramme des surfactines issues d'une culture de endo412 en milieu RE (microplaque). Sept pics ressortent, ils sont indiqués par les lettres de « a » à « f » par ordre d'élution. Méthode UPLC-MS : 3 familles.

Le spectre du pic « b », particulièrement bien représenté sur le chromatogramme, est donné ci-après à titre d'exemple pour l'identification de l'homologue / variant « b ». Les autres pics sont identifiés ici, mais leurs spectres respectifs sont reportés en annexe.

Pic « b » : analyse du spectre

Les fragments b1 (FA-Glu) à m/z 370 (m/z 352, (-H₂O)) et b2 (FA-Glu-Leu) à m/z 483 (m/z 471, (-H₂O)) indiquent que l'homologue en présence est un C15. Les fragments b5 à m/z 828 (Na⁺ (-H₂O)) et b6 (FA-Glu-Leu- ... -Leu6) à m/z 959 (Na⁺) qui représente une perte de 113 mu par rapport à l'ion moléculaire à 1050 m/z permettent tous les deux de trouver le dernier peptide (position7) : Leu ou Ile.

Le fragment y6-b5 à m/z 455 (-H₂O) indique que la partie interne du peptide est modifiée (14 mu de plus que par rapport à la forme standard de surfactine). Information confirmée par y6-b6 à m/z 568 (-H₂O) et à m/z 608 (Na⁺) représentant un gain de 14 mu par rapport à la forme standard. Il en résulte qu'il y a eu substitution en position 4 de la valine par une Leu/Ile.

➔ **Variant du pic b = variant g (de S499): C15-Glu-Leu-Leu-**Leu/Ile**-Asp-Leu-Leu**

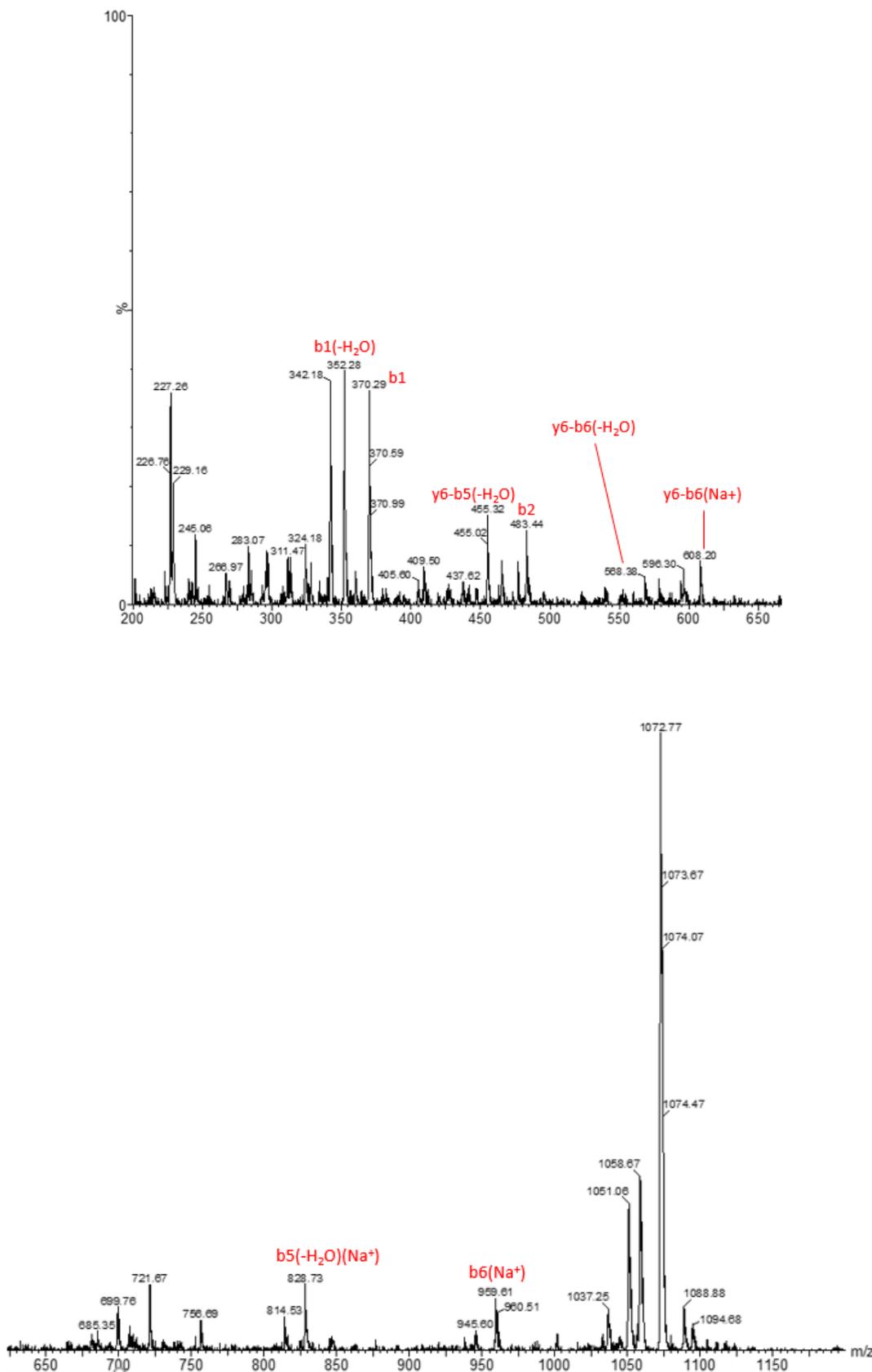


Figure 18 : Spectre de masse du pic « b » des surfactines issues d'une culture de endo412 en milieu RE (microplaque). Méthode UPLC-MS : fragmentation.

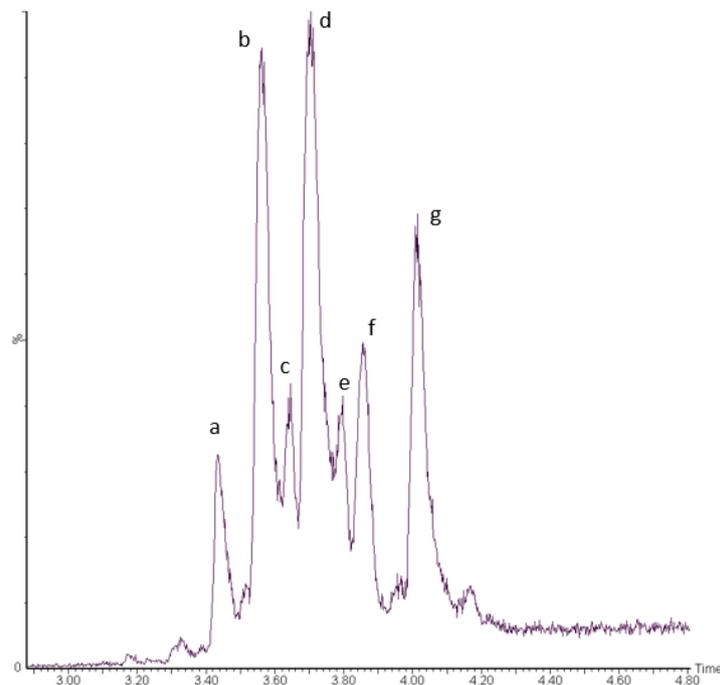


Figure 19 : Chromatogramme des surfactines issues d'une culture de endo412 en milieu RE+Val (microplaque). Sept pics ressortent, ils sont indiqués par les lettres de « a » à « g » par ordre d'élution. Méthode UPLC-MS : 3 familles.

Dans un souci de cohérence avec l'exemple développé plus haut, le spectre du pic « b », est à nouveau donné et décrit en détails ici (figure 20). Les autres pics sont identifiés de façon analogue, mais leurs spectres sont reportés en annexe.

Pic « b » : analyse du spectre

Deux ions moléculaires ($[M+H]/[M+Na]$) sont présents : 1022 / 1044 et 1037 / 1059 m/z. Ces deux paires de fragments diffèrent entre elles par un m/z de 14. Il est peu probable que deux homologues différents soient co-élus. Par conséquent, il est plus vraisemblable qu'il s'agisse de deux variants dont la séquence peptidique ne diffère que par le remplacement d'une leucine par une valine ou inversement.

Les fragments b1 à m/z 370 (m/z 352, (-H₂O)) et b2 : à m/z 483 (m/z 465, (-H₂O)) indiquent qu'il s'agit d'homologues C15-Glu-Leu. Deux paires de fragments b6 et b5 peuvent aussi être retrouvées:

- b6(1) à m/z 945,6 (Na⁺), perte de 113 mu par rapport à l'ion moléculaire à 1059 m/z, ou une perte de 99 mu par rapport à l'ion moléculaire 1044 m/z. b5(1) à m/z 814 (Na⁺, (-H₂O)), perte de (113+18) par rapport à b6(1) → Leu6
- b6(2) à m/z 960 (Na⁺), perte de 99 mu par rapport à l'ion moléculaire 1059 m/z. b5(1) à m/z 829 (Na⁺, (-H₂O)), perte de (113+18) par rapport à b6(2) → Leu6

Ces quatre fragments permettent de déduire que le dernier a.a. du peptide peut être Val ou Leu/Ile (selon l'ion moléculaire considéré) et que quel que soit l'ion moléculaire, on retrouve une leucine en position 6.

- De la même façon, les fragments y6-b5 et y6-b6 peuvent être attribués à quatre pics :
- y6-b5(1) à m/z 455 (-H₂O) et un gain de (113+18+22) mu donne y6-b6(1) à m/z 608 (Na⁺). Ceci signifie que la partie interne du peptide est Leu-Leu-Leu-Asp-Leu
- y6-b5(2) à m/z 441 (-H₂O) et un gain de 113 mu donne y6-b6(2) à m/z 554 (-H₂O). Ceci signifie que la partie interne du peptide est Leu-Leu-Val-Asp-Leu

Il peut en être conclu que la partie interne du peptide est modifiée ou non (Val4 ou Leu4).

Variant du pic b : C15 - Glu Leu Leu Val* Asp Leu Leu*

* = Peut être aussi Val ou Leu. Sachant que la combinaison Leu4 – Leu7 n'est pas probable au vu des m/z des deux ions moléculaires.

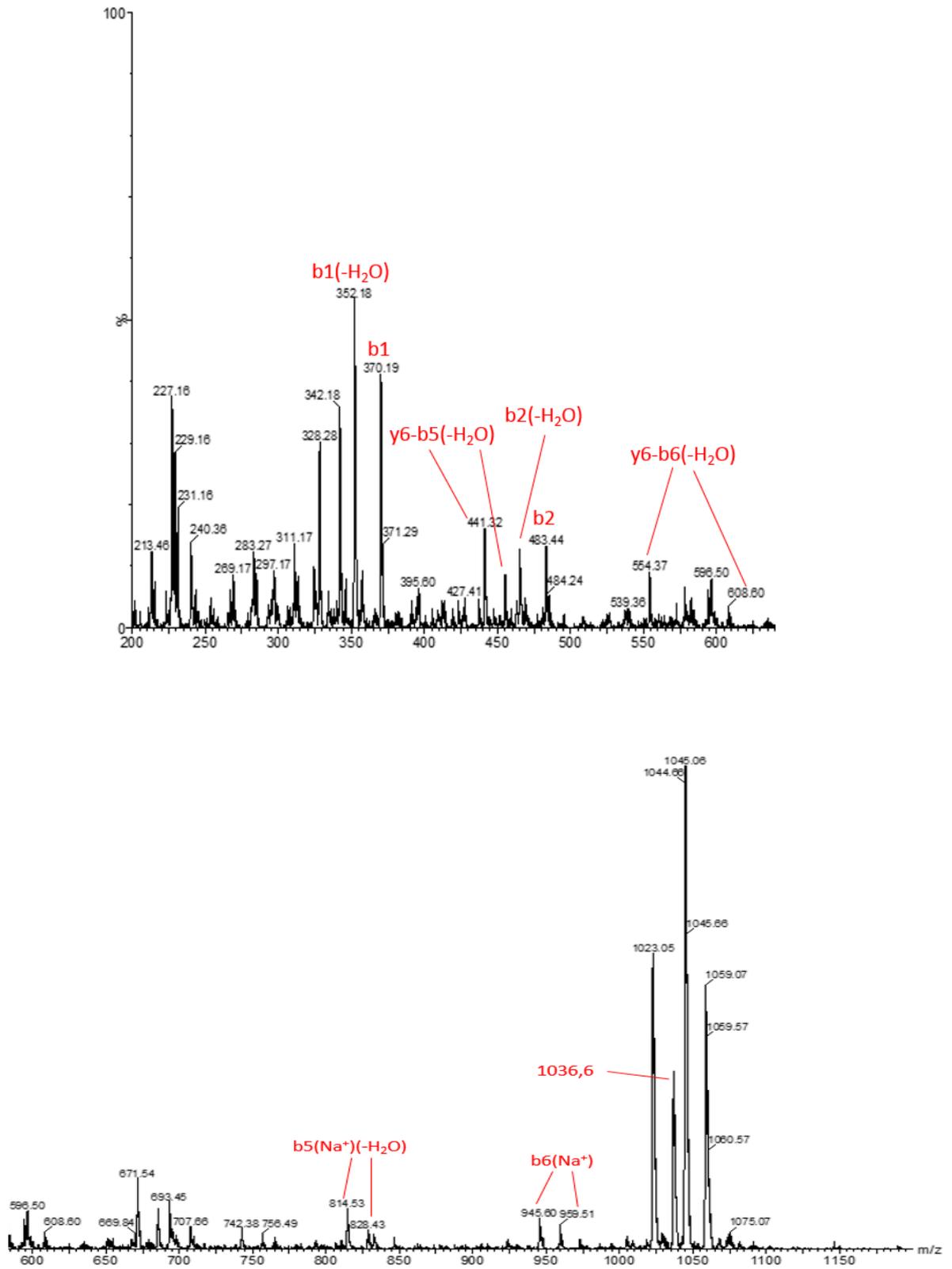


Figure 20 : Spectre de masse du pic « b » des surfactines d'une culture de endo412 en milieu RE+Val (microplaque). Méthode UPLC-MS : fragmentation.

En ce qui concerne les pics du chromatogramme de 412 en RE+Val, ils présentent tous ce problème de co-élution. Malgré cela, l'analyse des spectres peut concorder avec l'hypothèse que les variants Val4 soient élués en même temps que les formes « normales » de pumilacidine (Leu4).

Les raisonnements effectués sont analogues pour tous les pics. Voici les conclusions qui peuvent en être tirées :

Pics relatifs à endo412 en milieu RE :

- A : C15-Glu Leu Leu Leu Asp Leu Val
- B : C15 Glu Leu Leu Leu Asp Leu Leu
- C : C16 Glu Leu Leu Leu Asp Leu Val
- D: C16 Glu Leu Leu Leu Asp Leu Leu
- E: C17 Glu Leu Leu Leu Asp Leu Val
- F : C17 Glu Leu Leu Leu Asp Leu Leu

Pics relatifs à endo412 en milieu RE+Val :

- A : C14 - Glu Leu Leu Val* Asp Leu Val
- B : C15 - Glu Leu Leu Val* Asp Leu Leu*
- C : C15 - Glu Leu Leu Val* Asp Leu Leu*
- D: C16 - Glu Leu Leu Val* Asp Leu Val
- E: Isomère de D
- F : C17 - Glu Leu Leu Val* Asp Leu Val
- G : inidentifiable, le spectre de masse ne montre aucun ion moléculaire. Par conséquent, l'expérience devrait être recommencée pour obtenir un spectre de masse lisible.

* = Peut être aussi Val ou Leu (mais dans certains cas les fragments correspondants sont moins intenses ou trop hasardeux à interpréter).

Suite à ces interprétations, le comportement de endo412 en RE paraît « normal » dans le sens où il produit de la pumilacidine classique (Leu4), mais en synthétisant toutefois des variants Val7 pour chaque homologue. Les variants produits par endo412 en RE+Val sont plus nombreux : outre les remplacements Val7, on constate également des variants Val4, ce qui en fait de la surfactine, techniquement parlant (cfr. tableau 2).

En conclusion, il a pu être observé que le changement de comportement de la souche endophyte « endo412 » n'est pas le même que celui de S499 (du point de vue de la gamme de surfactines produites). En effet, l'apparition des variants ne se fait pas dans les mêmes milieux. Par ailleurs, dans

le cas d'endo412 en milieu RE+Val, tous les homologues produits sont présents sous forme de variants Val4 (et sans doute aussi sous forme standard). S499, lui, ne produit que quatre types de variants qui viennent s'ajouter aux homologues standards.

Ceci ajoute un nouvel aspect à la problématique des variants de surfactines, mais d'un autre côté, renforce encore l'hypothèse que le milieu nutritionnel impacte grandement la synthèse de ce métabolite. Cependant, dû aux phénomènes de co-élution supposés, il y a besoin d'analyses MS-MS complémentaires pour confirmer les indications fournies par ces expérimentations.

Jusqu'ici, les résultats obtenus étaient relatifs à la diversité des homologues/variants produits selon le contexte nutritionnel. Le chapitre 2, quant à lui, concerne les quantités produites au cours du temps (toujours selon le milieu de culture).

2 ANALYSE COMPARÉE DE LA DYNAMIQUE DE PRODUCTION DE SURFACTINES EN FONCTION DU MILIEU DE CULTURE

2.1 ETUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA QUANTITÉ DE SURFACTINES PRODUITE EN MILIEUX LB ET RE PAR UPLC-MS

L'objectif de cette expérimentation est double : 1) Analyser la dynamique de production des différents homologues / variants par S499 au cours du temps en milieu RE (toutes les 2 h pendant 12 h), et 2) Comparer la quantité de surfactines secrétées par S499, tous homologues / variants confondus, après 12h de culture en milieu LB ou en milieu RE.

2.1.1 DYNAMIQUE DE PRODUCTION DE SURFACTINES EN MILIEU RE

La figure 21 donne les chromatogrammes UPLC-MS d'une culture de S499 en milieu RE en fioles pendant 12 h avec prélèvement toutes les 2 h.

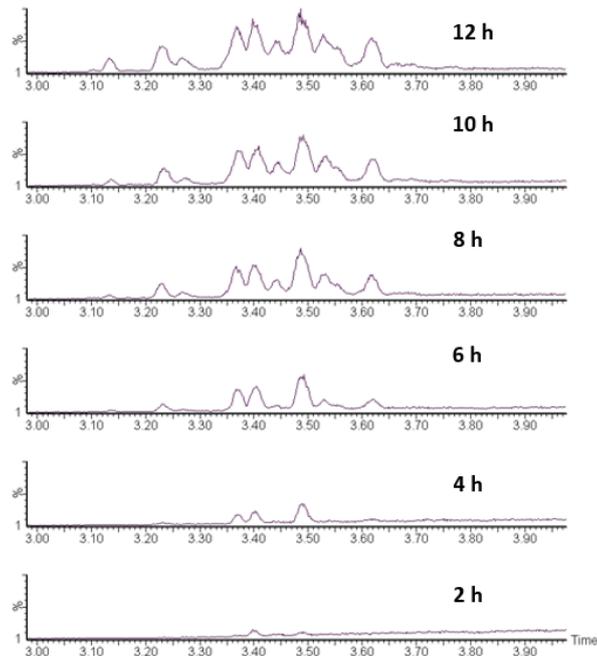


Figure 21 : Chromatogrammes des surfactines produites au cours du temps lors d'une culture en fiole de S499 en milieu RE. Méthode UPLC-MS : 3 familles.

Tous les homologues et variants ont l'air d'être produits en même temps : les pics relatifs aux formes les plus abondantes apparaissent en premier et inversement pour les formes minoritaires qui ne sortent du bruit de fond que plus tard.

2.1.2 COMPARAISON DES QUANTITÉS DE SURFACTINES PRODUITES EN MILIEU LB ET RE

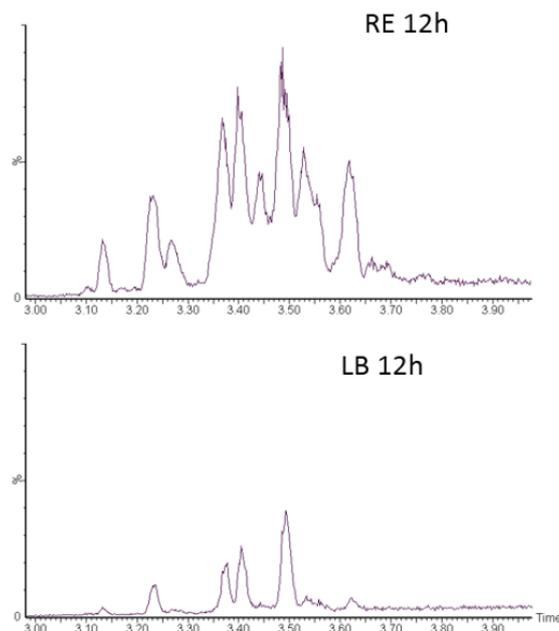


Figure 22 : Comparaison des chromatogrammes des surfactines produites après 12 h de culture en fioles de S499 dans un milieu LB ou RE. Méthode UPLC-MS : 3 familles.

Sur base de l'intégration de l'aire des pics reportée à une droite de calibration préalablement établi, la concentration en surfactines obtenue après 12 h de culture est près de 8 fois supérieure en milieu RE

qu'en LB suggérant que la biosynthèse de ce lipopeptide est nettement favorisée dans un contexte nutritionnel plus proche du milieu naturel.

2.2 ETUDE DE L'ÉVOLUTION DE L'EXPRESSION DU GÈNE *SRFA* EN FONCTION DE LA BIOMASSE ET DU MILIEU DU CULTURE PAR RT-QPCR

Au vu de la différence de concentration de surfactines entre les deux milieux, il peut être intéressant d'observer comment l'expression des gènes NRPS associés à la synthèse de surfactine varie au cours du temps en fonction du milieu.

A cette fin, des cultures en fioles de S499 ont été réalisées dans différents milieux : LB, RE et RE+Val. Des prélèvements à 3, 6, 9, 12 et 24 h sont effectués pour chaque type de culture. Après mesure de la DO à 600 nm et centrifugation, les culots cellulaires sont traités pour subir la RT-qPCR. Cette dernière consiste en l'amplification de deux gènes :

- *srfa* : gène d'intérêt codant pour une des NRPS qui synthétise la surfactine
- *gyr* : Gène de référence dont l'expression est invariable au cours du temps et selon les conditions de cultures (gène de « ménage »).

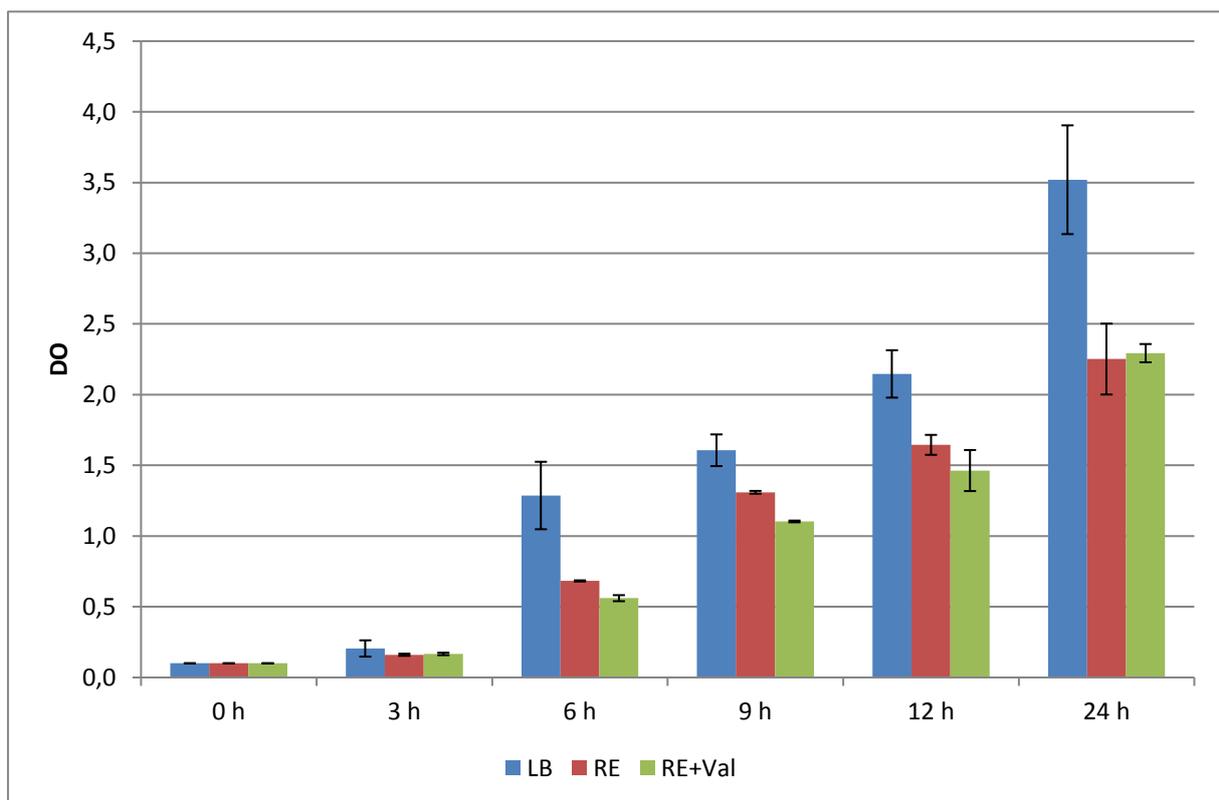


Figure 23 : Evolution de la densité optique de cultures liquides en fioles de *B. amyloliquefaciens* S499 au cours du temps et en fonction du milieu culture : LB, RE et RE+Val.

La figure 23 montre que la DO en milieu LB est systématiquement supérieure à celle des deux autres à partir de 6 h (valeurs moyennes de trois répétitions), ce qui est cohérent avec les observations

précédentes. En ce qui concerne RE et RE + val, l'évolution de la biomasse est très similaire, en tous cas à partir de 12 h. Avant cela, on peut remarquer une légère avance du milieu sans valine ajoutée.

En comparaison à la figure 22, on peut déduire que la quantité de surfactines retrouvée dans le surnageant n'est pas liée à l'importance de la biomasse. Tout indique, au contraire, qu'en milieu RE (ou RE+Val), S499 utilise les ressources pour d'autres activités métaboliques (dont synthèse de surfactines) plutôt que dans l'augmentation de sa biomasse.

L'évolution de la biomasse peut être mise en parallèle avec celle de l'expression des gènes codant pour les NRPS (*srfA*) au cours du temps et selon le milieu (figure 24, ci-après).

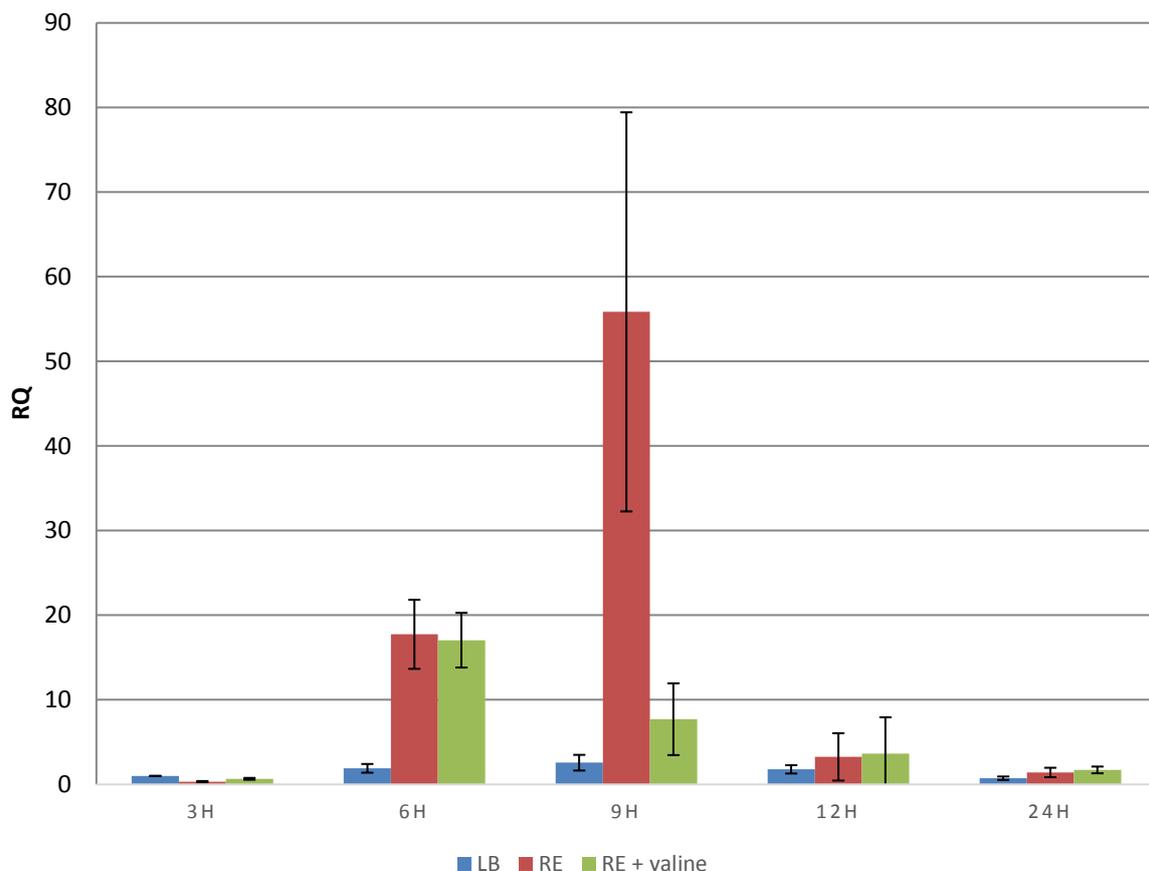


Figure 24 : Evolution de l'expression du gène *srfA* de *B. amyloliquefaciens* S499 en culture liquide au cours du temps et en fonction du milieu de la culture. Cette expression est traduite par le terme « RQ » pour « relative quantification ». Ce terme mathématique est établi grâce à une double référence. La première est l'expression du gène de la gyrase qui, lui aussi, a été amplifié lors de cette qPCR. Son RQ, censé être constant au cours du temps et identique d'un milieu à l'autre, sert donc de base pour caractériser les variations de l'expression de *srfA* selon le temps et les milieux. La seconde référence est définie arbitrairement parmi les échantillons amplifiés. Ici, il s'agit de LB à 3 h. Tous les autres RQ sur ce graphique représentent la quantité d'ADN de *srfA* présente dans l'échantillon en considérant que la quantité en milieu LB à 3 h = 1. On peut traduire cela par « Combien de fois l'expression de *srfA* d'un échantillon est plus (ou moins, dans le cas d'un RQ<1) élevée que l'expression de *srfA* de l'échantillon LB à 3 h ».

La différence d'expression de *srfA* entre les milieux RE et LB est très nette avec un niveau d'expression beaucoup plus élevé dans le milieu RE. L'optimum d'expression de *srfA* en RE a lieu à 9 h et il est plus de 20 fois plus important que celui observé en LB (rapport des RQ : 55.054 / 2.570).

Par rapport à la figure 23, il peut être suggéré que l'évolution de la DO n'est pas proportionnelle à l'expression de *surfA*, quel que soit le milieu de culture (Tableau 7). Cette observation rejoint donc celle faite suite à la comparaison des figures 22 et 23. Ces trois derniers graphes nous indiquent donc que la DO n'est pas proportionnelle à la concentration en surfactines présentes dans le milieu, ni à l'expression du gène NRPS *surfA*. Néanmoins, le tableau 7 conforte le fait que les gènes des NRPS de la surfactine sont surtout exprimés pendant et/ou après la phase exponentielle de croissance (cfr. « Revue bibliographique, section 2.2.1).

	LB		RE		RE+Val	
	ΔDO	RQ	ΔDO	RQ	ΔDO	RQ
3 h	0,105	1,000	0,061	0,326	0,066	0,663
6 h	1,082	1,902	0,522	17,741	0,394	17,046
9 h	0,320	2,570	0,627	55,854	0,543	7,709
12 h	0,540	1,783	0,336	3,257	0,360	3,646
24 h	0,343	0,734	0,152	1,412	0,208	1,715

Tableau 7 : Tableau comparatif des RQ et des ΔDO associés à chaque prélèvement et à chaque milieu des cultures de S499 en fioles. Les ΔDO sont calculé par rapport à la DO du prélèvement précédent. Le ΔDO à 24h est divisé par 4 pour permettre la comparaison avec les autres prélèvements. Les cases grisées correspondent au maximum d'augmentation de DO (sur 3 h) et au maximum de RQ

Globalement, l'expression des gènes NRPS pourrait donc être reliée à la production de surfactines en fonction du milieu de croissance (figure 22). Cependant, après 12 h, la quantité de surfactines retrouvée en RE n'est « que » huit fois supérieure à celle en LB, contre une expression du gène 20 fois plus forte en RE par rapport à LB. Un lien stricte entre le taux de production de surfactines (figure 21) et l'expression de *surfA* en RE est difficile à établir laissant sous-entendre qu'une possible régulation post-traductionnelle des NRPS joue un rôle non négligeable.

Il peut être judicieux de s'intéresser maintenant aux relations structure-fonction des différents types de surfactine. En effet, le fait de multiplier les variants rendrait-il *Bacillus* plus apte à se défendre des pathogènes (antagonisme) ? Provoquerait-il, chez la plante, des effets éliciteurs différents ? La réponse à ces questions ne résoudrait pas le comment, mais justifierait le pourquoi des résultats précédents (i.e. quantité et diversité augmentent dans les contextes nutritionnels proches du contexte naturel).

3 ÉTUDE DES RELATIONS STRUCTURE – FONCTION

La dernière partie du travail est consacrée à l'étude des activités antimicrobienne et élicitrice (deux fonctions capitales dans le cadre du biocontrôle) des homologues / variants produits dans les différents contextes nutritionnels testés.

3.1 ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE : TESTS D'ANTAGONISME

Comme il l'a été expliqué dans la section « Revue bibliographique », la surfactine possède une activité antibiotique modérée. Dans le cadre de ce travail, cette activité a naturellement été testée à l'encontre de rhizobactéries pathogènes : *Clavibacter michiganensis* et *Xanthomonas campestris* cultivées en cultures liquides en microplaques.

Les souches S499 et 41ph ont été cultivées 24 h dans trois milieux liquides différents. Les surnageants de ces cultures ont ensuite été dilués de sorte que, une fois ajoutés dans un des puits de la microplaque, leur concentration en surfactines (tous homologues / variants confondus) soit de 1, 2 ou 5 μM (déterminée par UPLC). L'évolution de la DO à 600nm reflétant la croissance des bactéries pathogènes est mesurée toutes les 30 min pendant 24 h. A titre d'exemple, la courbe de croissance de *Clavibacter* en présence du surnageant de S499 est donnée à la figure 25.

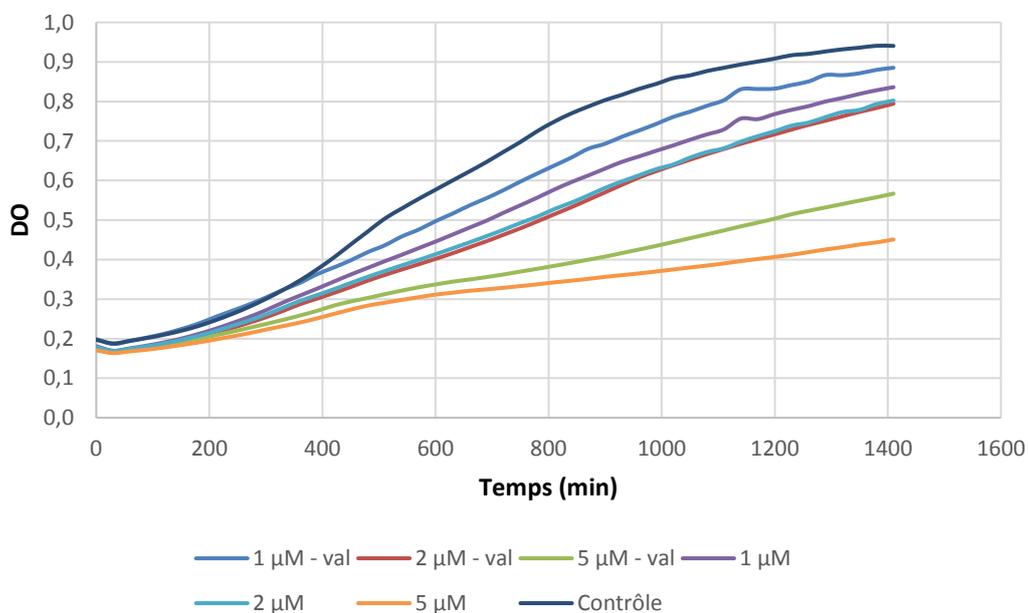


Figure 25: Courbes de croissance de *Clavibacter* cultivé en milieu LB en microplaque pendant 24 h en présence de surfactines 1, 2 ou 5 μM issues d'une culture de S499 en milieu RE ou RE+Val. La mesure des DO (600 nm) est effectuée toutes les 30 min.

Dans un premier temps, on peut remarquer que les courbes de croissance sont d'autant plus ralenties que la concentration en surfactines est élevée. Ensuite, pour une même concentration, il semblerait que le surnageant RE+Val soit moins efficace que le RE. Le graphique présenté à la figure 26 donne un aperçu de l'expérimentation dans son ensemble. Aussi, la suite des interprétations se basera principalement sur cette figure.

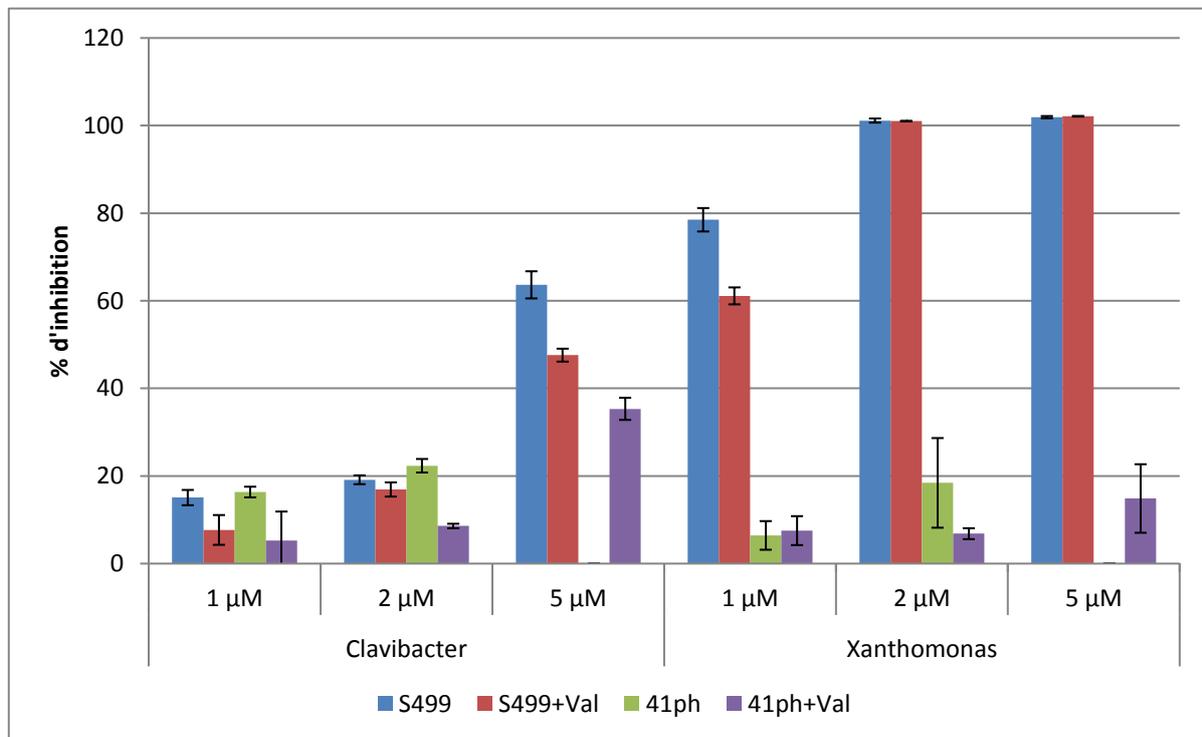


Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de croissance des phytopathogènes *Clavibacter* et *Xanthomonas campestris* (en culture microplaque LB liquide). Cette inhibition est provoquée par des surnageants de cultures de 2 *Bacillus* (S499 ou 41ph, un endophyte) préalablement cultivés dans deux milieux différents (RE ou RE+Val). Les surnageants présentent tous une concentration en surfactines de 1, 2 ou 5 μM (quantification de la [surfactines] dans les surnageants bruts par UPLC-MS, les dilutions de ceux-ci ont été faites de façon à obtenir une concentration de 1, 2 ou 5 μM dans les puits). Le surnageant 41ph ne possédait pas une [surfactines] suffisante pour obtenir du 5 μM dans les puits. Les surnageants n'ont fait l'objet d'aucune concentration ni purification.

Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé comme suit :

$$\%inhibition = 100 - 100 \cdot \left(\frac{\Delta DO}{\Delta DO_{contrôle}} \right)$$

Où $\Delta DO_{contrôle}$ est la variation de la DO d'un puits ne contenant que le phytopathogène dans du milieu LB.

Globalement il apparaît que le pathogène *Xanthomonas* est plus sensible aux surnageants de S499 que *Clavibacter*. Le *Bacillus* 41ph est clairement moins efficace que S499, tous types de cultures et de concentrations confondus. Une autre observation, moins tranchée que les précédentes, est que les surnageants RE+Val ont l'air d'être moins efficaces que les surnageants RE. Ceci ne correspond pas à ce qui a été dit précédemment : pour S499, qu'il soit cultivé avec ou sans valine ajoutée, les variants

produits sont les mêmes. Par ailleurs, aucune différence de concentration ne peut être invoquée puisque les surnageants sont dilués en fonctions.

Cette dernière remarque met en évidence un problème majeur de cette expérience, ces résultats sont donc à interpréter avec une grande prudence. En effet, ils ont été obtenus avec des surnageants bruts (surfactines non purifiées). Ces résultats sont donc partiellement dus à l'influence d'autres métabolites sécrétés et donc présents dans les surnageants. Si ces métabolites ont subi les mêmes dilutions que la surfactine, leurs concentrations initiales dans le surnageant peuvent être très différentes de la concentration initiale en surfactines d'une part, mais aussi très différentes d'une culture à l'autre. *In fine*, ils se retrouvent en concentrations variables dans les puits. Par conséquent, les résultats ci-dessus ne peuvent en aucun cas être uniquement imputés à la surfactine. Cependant, rien n'empêche de constater que l'antibiome produit par *Bacillus amyloliquefaciens* S499 permet une inhibition complète de *Xanthomonas campestris*, même après dilution, confirmant ainsi le caractère d'agent de bio-contrôle de cette souche et tout l'intérêt qui peut lui être porté dans ce domaine.

Pour tenter de pallier au problème de la présence d'autres métabolites, un fractionnement HPLC a été fait sur les surnageants préalablement concentrés sur cartouche C18. Ce procédé présente l'avantage supplémentaire de séparer les homologues / variants de surfactines en différentes fractions qui pourront ainsi être comparées.

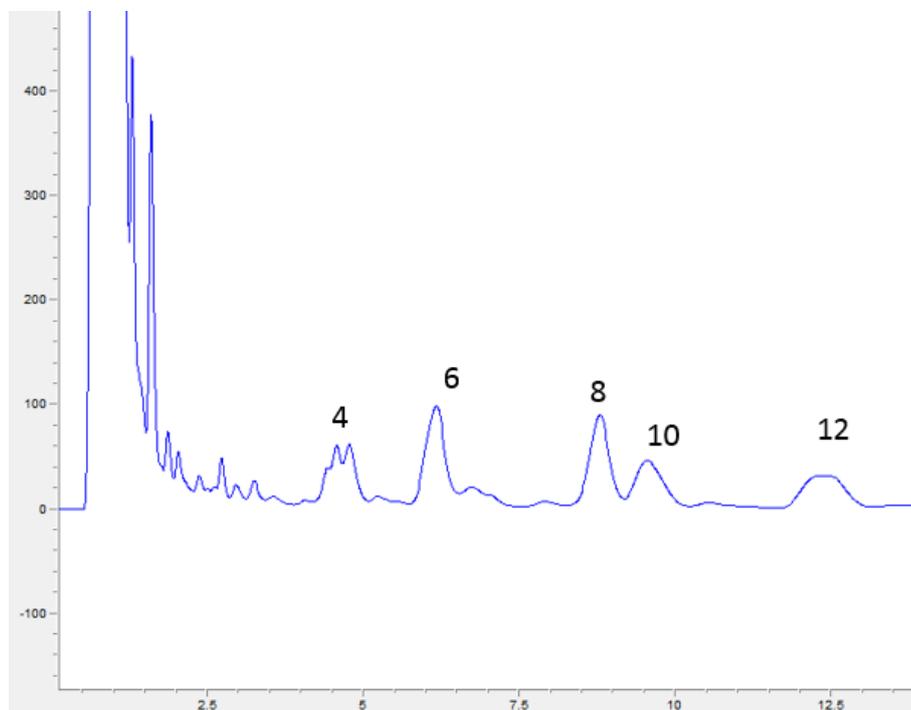


Figure 27 : Chromatogramme HPLC d'un pool de surnageants de cultures en fioles RE+Val de S499, de 98S et de 14A). Le pool de surnageant a préalablement été concentré sur cartouche C18 (300 mg) et élué dans de l'ACN 100%. Une fraction HPLC est récoltée chaque minute. Les numéros sur les pics correspondent à la minute à laquelle ils ont été récoltés.

Les analyses UPLC-MS des fractions issues du passage en HPLC permettent d'identifier les variants retrouvés en RE et RE+Val (Spectres des fractions en annexe). On y retrouve les mêmes formes de surfactines que celles identifiées au chapitre 1.

Malheureusement, les fractions sont récupérées dans de l'ACN 75%, rendant les tests d'antagonisme impossible à mettre en place vu la toxicité de ce solvant pour les bactéries. Plusieurs méthodes d'évaporation ont été testées (SpeedVac, évaporation sous flux laminaire) mais aucune ne s'est révélée efficace. En effet, la surfactine aurait précipité à la suite de ces manipulations, ne permettant alors ni la quantification UPLC ni la réalisation des tests d'antagonisme. Ces problèmes sont discutés à la section « Discussion générales & perspectives ».

3.2 ACTIVITÉ ÉLICITRICE : TESTS ROS

La surfactine présente une activité élicitrice sur les plantes, induisant un état d'ISR. Ce type d'état peut être mesuré via les ROS (« reactive oxygen species ») produits par la plante au sein de ses cellules. En effet, l'action d'un fluorochrome, le DCFH-DA, qui, après pénétration dans les cellules racinaires, réagit avec ces mêmes ROS pour former un composé fluorescent. La fluorescence mesurée est donc proportionnelle à la quantité de ROS présents dans les cellules et donc à l'intensité de la réaction immunitaire de la plante. L'objectif est de comparer les effets éliciteurs de surfactines standards à ceux d'une solution de surfactines contenant également des variants.

Deux échantillons sont testés, le premier consiste en une solution de surfactines standards à 20 μ M. Le second est une solution de surfactines d'un surnageant de culture en fiole de S499 en milieu RE. Ce surnageant est concentré sur C18 (élution à l'ACN 100%) et ensuite dilué pour obtenir une concentration de 20 μ M en surfactines. Les variations de fluorescence sont comparées à un témoin positif, la flagelline, dont l'activité élicitrice est reconnue et un contrôle avec de l'ACN seul.

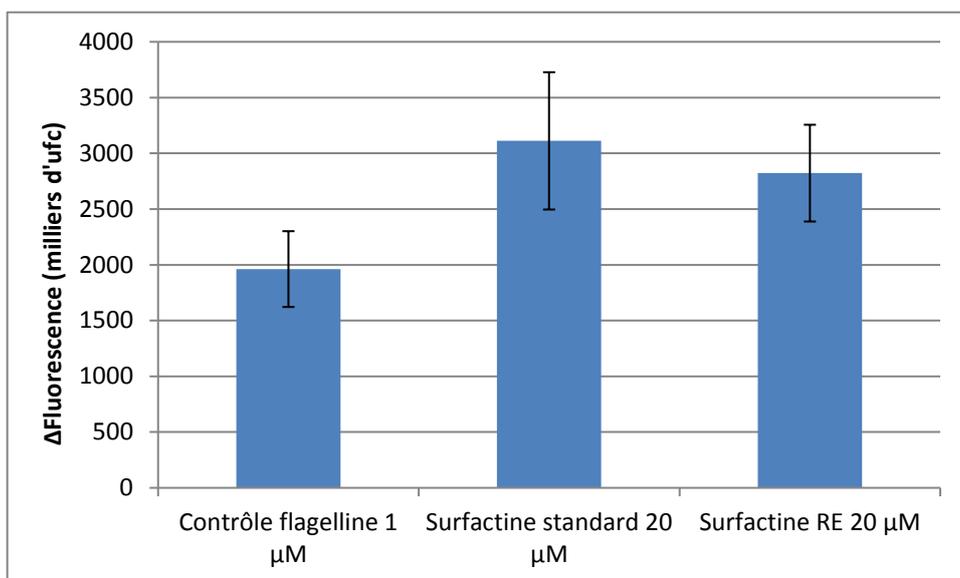


Figure 28 : Δ fluorescence émise par des morceaux de racines de plantules de tomates en présence de composés éliciteurs. La flagelline, connue pour provoquer l'ISR, sert de référence positive. Une solution 20 μM de surfactine commerciale (standard) est également testée. Enfin le surnageant d'une culture en fiole de S499 en milieu RE, concentré sur C18 (élution à l'ACN) et dilué de façon à obtenir une [surfactines] de 20 μM représente l'échantillon d'intérêt.

La flagelline (1 μM) induit une forte réponse de fluorescence, ce qui corrobore bien l'effet éliciteur de cette molécule utilisée comme référence positive. En comparaison, l'effet de la surfactine standard est encore supérieur validant également l'effet éliciteur du lipopeptide dans sa forme standard. La moyenne de la fluorescence provoquée par la solution de « surfactine RE » est légèrement plus faible que celle provoquée par la solution standard. Cela suggèrerait que la présence de variants Val7 atténuerait l'activité élicitrice mais cela reste à confirmer étant donné les écarts-types (basés sur 9 répétitions mais avec une grande variabilité) qui ne permettent pas de déduire une quelconque différence d'activité élicitrice significative..

DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Avant d'entamer la discussion des résultats proprement dite, il est important de rappeler que certaines analyses statistiques (comparaisons de moyennes, ...) n'ont pu être faites car les conditions d'expérimentation (répétitions etc.) ne permettaient pas que les hypothèses statistiques de départ soient vérifiées. Néanmoins, les résultats fournis dans le cadre de ce travail donnent un certain nombre d'indications intéressantes.

En premier lieu, les expérimentations ont permis de valider le milieu RE comme milieu reproduisant de façon satisfaisante le contexte nutritionnel naturel, principal facteur de l'apparition de variants de surfactines chez *Bacillus amyloliquefaciens* S499.

Ensuite, la diversité des types de surfactines est plus importante en milieux « naturels » (*in planta*, exsudats) ou s'en rapprochant (RE). Chez S499, quatre variants ont été identifiés qui sont en accord avec la spécificité des domaines d'adénylation de chaque a.a. : les résultats supportent le fait qu'on retrouve les substitutions essentiellement en position 4 et 7 (Challis *et al.*, 2000). De plus les tests comparatifs en milieu RE avec FZB42, 98S et GA1 confortent aussi le fait que l'apparition de ces variants est conservée chez les différentes souches de *Bacillus amyloliquefaciens* déjà étudiées. En effet, ces dernières ont toutes la même séquence de résidus dans la « binding pocket » des modules NRPS concernés (Challis *et al.*, 2000).

Notons que les substitutions des a.a. en position 4 et 7 ont aussi été observées chez *B. pumilus*, ce qui rend possible l'extrapolation des constatations faites au paragraphe précédent au-delà de l'espèce *amyloliquefacines*. Cependant, si les variants impliquent les mêmes types de modification du cycle peptidique, les résultats des expériences avec *B. pumilus* indiquent que leurs apparitions ne surviennent pas suite aux mêmes genres de modifications du contexte nutritionnel. Rappelons que des analyses MS plus poussées sont requises pour confirmer l'ensemble des résultats obtenus avec l'UPLC-MS et des interprétations qui leur sont associées.

La quantité de surfactines produite est également plus importante en milieu RE. De plus, cette quantité peut être mise en relation avec une expression accrue de *srfA* en milieu RE. Si une corrélation a pu être établie entre quantité de surfactines et expression du gène NRPS, aucune n'a pu être identifiée en ce qui concerne la biomasse et la quantité / l'expression de *srfA*. En revanche, l'augmentation de la quantité de surfactines et de l'expression de *srfA* correspondent approximativement à la phase de croissance exponentielle de *Bacillus*. Mais selon les milieux, une DO plus importante ne va pas de paire avec l'augmentation de la concentration en surfactines retrouvées dans le milieu concerné, au contraire. La même constatation est faite avec les résultats de la RT-qPCR de *srfA* mis en parallèle avec les DO observées dans les différents milieux.

Par rapport à ces dernières interprétations, on pourrait être tenté de trouver ces résultats logiques. En effet, en milieu LB, *Bacillus* n'a pas vraiment besoin d'investir énormément dans la synthèse de ce cLP, tant le milieu lui est favorable. Il est donc plus avantageux pour lui d'augmenter sa biomasse, comme le confirme le graphique de l'évolution de la DO de S499 lors de l'expérience de la section 2.2 des résultats. Par contre, en milieux « naturels » ou mimant le contexte naturel, *Bacillus* a tout intérêt à produire ce métabolite en quantité. Le but pour lui serait alors d'améliorer ses performances de colonisation pour être plus compétitif et de mieux se protéger des prédateurs.

Une autre analyse des résultats relatifs à la RT-qPCR indiquaient que l'expression maximale de *srfA* en milieu RE était plus de 20 fois supérieure à l'expression maximale en milieu LB. Pourtant on ne retrouve qu'environ huit fois plus de surfactines en milieu RE qu'en LB. Ces observations nous poussent naturellement à s'intéresser aux mécanismes de régulation de l'activité des NRPS. Il serait dès lors intéressant de réaliser une RT-qPCR dans les mêmes conditions que précédemment, mais, en plus, sur certains gènes régulateurs. Il serait également instructif d'observer la production de surfactines dans des milieux contenant des concentrations variables de ce composé afin d'évaluer l'impact d'une certaine concentration initiale en surfactines sur la synthèse subséquente de celles-ci par *Bacillus*.

Concernant les tests relatifs aux activités biologiques des surfactines produites en milieu RE, il est difficile de statuer sur quoi que ce soit qui n'ait déjà été démontré. Quasiment aucune conclusion n'est possible sur les tests d'activité antimicrobienne : une purification des surnageants est absolument nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions sur l'activité des surfactines. A cette fin, il serait intéressant d'établir un protocole se basant sur les méthodes de purification industrielle de surfactines par exemple. Il en va de même pour les fractions HPLC qui sont importantes si on désire caractériser les activités de certains variants.

Par rapport aux tests ROS, il y a une grande variabilité avec le DCFH-DA et pas de nette différence d'activité élicitrice entre les surfactines standards et les surfactines issues de cultures en RE. Cependant, les tests ont été effectués sur 9 répétitions et la moyenne de fluorescence RE est plus basse que celle provoquée par les surfactines standards. Les trois variants seraient-ils moins efficaces que les surfactines « classiques » ? Les expériences doivent être répétées et réalisées avec les variants purifiés pour pouvoir obtenir de plus amples indications. Il est également possible d'utiliser d'autres moyens pour mettre en évidence la production de ROS : Amplex red (un autre type de fluorochrome) ou encore la biotechnologie « HyPer », un biosenseur redox (Kalyanaraman *et al.*, 2011).

Pour compléter ces deux types de, une étude structure-fonction pourrait être menée sur des membranes artificielles. En effet, les activités antimicrobiennes et élictrices sont très certainement dues à l'interaction de la surfactine avec les membranes plasmiques. Purifier des variants et les tester sur des

membranes recomposées serait un test intéressant pour mettre en parallèle les activités antimicrobiennes et/ou élicitrices avec le pouvoir d'insertion de variants dans les membranes plasmiques.

Ces deux derniers tests (antagonisme et ROS) ne nous fournissent donc pas d'indications permettant d'émettre des hypothèses sur d'éventuelles différences d'activité des variants observés dans les différentes conditions testées. Cependant, la production de variants n'est pas forcément imputable à une « volonté » de *Bacillus* de modifier les activités biologiques des lipopeptides qu'il produit.

En effet, il faut rappeler que la surfactine est un métabolite secondaire (et donc par définition, qui n'est pas impliqué dans les fonctions vitales). A ce titre, en milieu plus pauvre, il serait peut-être possible que *Bacillus* privilégie certains a.a. pour d'autres fonctions plus importantes que la synthèse de lipopeptides. Dans ce cas, on pourrait considérer que le microorganisme « fabrique » la surfactine avec ce qu'il reste de disponible dans son environnement. D'ailleurs ce point de vue pourrait expliquer le manque de spécificité des domaines A comme avantage évolutif : quand il n'y a pas beaucoup de ressources, le *Bacillus* peut assurer la production de ses métabolites primaires sans trop compromettre celle des secondaires puisque certaines binding pockets des NRPS ne sont pas trop spécifiques. Cela prend encore plus de sens quand on sait que la surfactine est un métabolite secondaire d'un grand intérêt en conditions défavorables puisqu'elle améliore la compétitivité de *Bacillus* dans la niche écologique.

En poursuivant ce raisonnement, on peut être amené à proposer que les a.a. qui ne varient pas ou peu devraient alors être les plus importants au niveau de l'activité biologique puisque le domaine A qui leur est associé est spécifique. Autrement dit, il n'est pas question pour *Bacillus* de modifier tel ou tel a.a., peu importe la limitation des ressources, sinon la surfactine qui en résulterait ne serait plus active. Ce qui constituerait alors non seulement une perte d'énergie mais aussi un gaspillage des ressources. Les idées émises dans ces deux paragraphes ne contredisent en rien les résultats (que ce soit du point de vue quantité ou diversité des surfactines produites) des différentes comparaisons effectuées entre milieu riche LB, « pauvre » RE (qui se rapproche des conditions nutritionnelles limitantes de la rhizosphère) et même RE+Val, ce dernier provoquant une quantité plus importante de variants Val7 notamment.

Un dernier point intrigant des résultats réside dans le comportement des souches endo412 (*Bacillus pumilus*) et S499 (*Bacillus amyloliquefaciens*) : la production de variants ne s'opère pas suite aux mêmes modifications du milieu nutritif. Ceci pourrait sous-entendre qu'un même contexte nutritionnel, n'est pas perçu de la même façon par tous les *Bacillus*. Il en découlerait alors que la modification de production de surfactines n'apparaît pas suite aux mêmes types de changements du milieu nutritif. On peut facilement l'admettre étant donné les différences de modes de vie de ces deux

espèces. Ceci dit, il est clairement nécessaire d'analyser ces différences comportementales avec un plus grand nombre de *Bacillus* endophytes et épiphytes pour pouvoir déduire des « règles » concernant ces différences de perception du milieu.

Pour terminer, par rapport aux trois principaux objectifs fixés, la caractérisation des fonctions antagonistes et élicitrices est la moins concluante (entre autres dû aux problèmes de purification des fractions HPLC pour le test d'antagonisme). Aussi, persévérer dans la mise en place des tests proposés à la section 3 de la partie « Résultats » devrait fournir des informations très intéressantes. Par ailleurs les différents aspects de l'activité biologique des surfactines méritent d'être investigués davantage, notamment en termes d'accès à la niche écologique. Les résultats de telles études pourraient expliquer l'intérêt de l'existence de certains variants.

En ce qui concerne les deux autres objectifs, qui visaient à déterminer les modifications de diversité et de production des surfactines en fonction du contexte nutritionnel, les résultats, sans présenter de preuves tangibles, donnent des indications relativement nettes et soulèvent des pistes de réflexions et d'investigations intéressantes.

De plus, s'il s'avère que les indications fournies par ce mémoire soient confirmées ultérieurement de façon plus solide (analyses statistiques), notre vision de l'éventail des variants et homologues de surfactines qui peuvent être formés par ces *Bacillus* peut alors se restreindre à ce qui est produit en milieu synthétique RE. D'un point de vue « études en laboratoire », cela renforce encore l'intérêt de ce métabolite, surtout si les variants supplémentaires mis en évidence lors de ce travail ont des activités biologiques différentes des surfactines « classiques ».

Enfin, à titre personnel, les travaux réalisés sur le domaine du bio-contrôle (et plus particulièrement sur les lipopeptides) donnent des résultats encourageants pour l'avenir de l'agriculture. Ceci dit, le but n'est pas de remplacer les pesticides avec une « bio-solution » unique. Il est important, voire nécessaire, que ce genre de bio-contrôle soit envisagé comme un élément d'un ensemble de « micro-solutions », chacune s'intégrant au mieux dans les équilibres qui caractérisent les biosystèmes. En effet, un usage intensif de métabolites bactériens sur les sols ne conduirait pas à des résultats différents de ceux qu'on connaît actuellement avec les pesticides de synthèse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. Ben, & Antonio, G. (2010). Diversity and applications of. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Ansari, M. Z., Yadav, G., Gokhale, R. S., & Mohanty, D. (2004). NRPS-PKS : a knowledge-based resource for analysis of NRPS / PKS megasynthases, 32, 405–413. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh359>
- Arguelles-arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., ... Donk, W. A. Van Der. (2012). recommendations for a universal nomenclature. <https://doi.org/10.1039/c2np20085f>
- Avis, T. J. (2007). Antifungal compounds that target fungal membranes : applications in plant disease control, 329, 323–329.
- Award, E. L. (2008). Biopesticides – Legitimate Products for Integration into IPM and Certified Organic Production.
- Baltz, R. H. (2012). Model for Synthetic Biology To Accelerate the Evolution of.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors : Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Borriss, R., Chen, X., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., ... Vater, J. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7 T and FZB42 T : a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp . *amyloliquefaciens* subsp . nov . and *Bacillus* based on complete genome sequence comparisons, 1786–1801. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023267-0>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppli, K., Ver, E., Themaat, L. Van, Ahmadinejad, N., ... Schulze-lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91–95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., Pauw, E. De, Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis* / *amyloliquefaciens*, 12. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., ... Ongena, M. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin

production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI, 27(2), 87–100.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>

Challis, G. L., Ravel, J., & Townsend, C. A. (n.d.). Predictive , structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains, 211–224.

Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Hess, W. R., ... Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth – promoting bacterium *Bacillus*, 25(9), 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>

Chooi, Y., & Tang, Y. (2010). Previews Adding the Lipo to Lipopeptides : Do More with Less. *Chemistry & Biology*, 17(8), 791–793. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.08.001>

Cochrane, S. A., & Vederas, J. C. (2014). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp .: A Gold Mine of Antibiotic Candidates, (1), 4–31. <https://doi.org/10.1002/med>

Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., Brogniez, A. De, Willems, L., ... Ongena, M. (n.d.). Plant polysaccharides initiate underground cross talk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin 1, 1–25. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12286>

Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2008). Effect of Fengycin , a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis* , on Model Biomembranes. *Biophysical Journal*, 94(7), 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>

Dessaux, Y., Grandclément, C., & Faure, D. (2016). Engineering the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3), 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.002>

Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). BIOSYNTHESIS OF NONRIBOSOMAL PEPTIDES1. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123615>

Gardener, B. B. M. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp . in Agricultural Systems, (46).

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Marrone, P., ... Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age ?, 30(5). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>

Hu, L. B., Zhang, T., Yang, Z. M., Zhou, W., & Shi, Z. Q. (2009). Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B 1 from *Fusarium verticillioides*, 48, 84–89. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02493.x>

Jajor, P., Pi, D., Krasowska, A., & Marcin, Ł. (2016). Surfactin analogues produced by *Bacillus subtilis* strains grown on rapeseed cake, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.02.014>

Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system, 444(November), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. (2009). Insights into the Defense-Related Events Occurring in Plant Cells Following Perception of Surfactin-Type Lipopeptide from *Bacillus subtilis*, 22(4), 456–468.

Jousset, A., Lara, E., Wall, L. G., Jousset, A., Lara, E., Wall, L. G., & Valverde, C. (2006). Secondary Metabolites Help Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 To Escape Protozoan Grazing. <https://doi.org/10.1128/AEM.00557-06>

Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic Acids, Sugars, and L-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria, 19(3), 250–256.

Kraas, F. I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M., & Marahiel, M. A. (2010). Article Functional Dissection of Surfactin Synthetase Initiation Module Reveals Insights into the Mechanism of Lipoinitiation. *Chemistry & Biology*, 17(8), 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.015>

Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Danchin, A., ... Me, C. (2015). From a consortium sequence to a unified sequence : the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later, (2009), 1758–1775. <https://doi.org/10.1099/mic.0.027839-0>

Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., & Jacques, P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties, 475–483. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0163-z>

Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production, 5(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>

Liu, J., Hagberg, I., Novitsky, L., Hadj-moussa, H., & Avis, T. J. (2014). Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.07.004>

López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*, 74(October), 609–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>

Manuscript, A. (2014). *NIH Public Access*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030> Measuring

Martin, G. B., Bogdanove, A. J., & Sessa, G. (2003). UNDERSTANDING THE FUNCTIONS OF PLANT DISEASE RESISTANCE PROTEINS, 23–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135035>

Molinatto, G., Puopolo, G., Sonogo, P., Moretto, M., Engelen, K., Viti, C., ... Pertot, I. (2016). Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499, a rhizobacterium that triggers plant defences and inhibits fungal phytopathogens. *Journal of Biotechnology*, 238, 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.013>

Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009). Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria : Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm 1, 150(August), 1638–1647. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139709>

Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., & Dommès, J. (2005). *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression, 692–698. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1741-0>

Ongena, M., & Jacques, P. (2007). *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007). Brief report Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants, 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>

Pe, A. (n.d.). Plant protection and growth stimulation by microorganisms : biotechnological applications of Bacilli in agriculture , Diego Romero and Antonio de Vicente. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>

Pieterse, C. M. J., Wees, S. C. M. Van, Ton, J., Pelt, J. A. Van, & Loon, L. C. Van. (2007). Signalling in Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana*, 4(2002), 535–544.

Pieterse, M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Wees, S. C. M. Van, & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes, (May), 1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

Pimentel, D. (2005). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the united states ?, 229–252. <https://doi.org/10.1007/s10668-005-7314-2>

Priest, G., & Shute, L. A. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, 69–71.

Prigent-combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, 4(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>

Raaijmakers, J. M., Bruijn, I. De, Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas* : more than surfactants and antibiotics, 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>

Razafindralambo, H., Dufour, S., Paquot, M., & Deleu, M. (2009). THERMODYNAMIC STUDIES OF THE BINDING INTERACTIONS OF SURFACTIN ANALOGUES TO LIPID VESICLES Application of isothermal titration calorimetry, 95, 817–821.

Reader, A., Help, A., & Franzil, L. (n.d.). Author ' s Proof.

Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security, 519–537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>

Sieber, S. A., & Marahiel, M. A. (2003). MINIREVIEW Learning from Nature ' s Drug Factories : Nonribosomal Synthesis of Macrocyclic Peptides, 185(24), 7036–7043. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7036>

Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity ? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>

Stein, T., Mikrobiologie, I., & Goethe-, J. W. (2005). MicroReview *Bacillus subtilis* antibiotics : structures , syntheses and, 56, 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>

Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms, 6(march), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>

Tracanna, V., Jong, A. De, Medema, M. H., & Kuipers, O. P. (2017). Mining prokaryotes for antimicrobial compounds : from diversity to function, (March), 417–429. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux014>

Venturi, V., & Keel, C. (2016). Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>

Villaverde, J. J., Sandín-españa, P., Sevilla-morán, B., López-goti, C., & Alonso-prados, J. L. (2016). Biopesticides from Natural Products : Current Development , Legislative Framework , and Future Trends, 11(USEPA 2015), 5618–5640.

Vlot, A. C., Klessig, D. F., & Park, S. (n.d.). Systemic acquired resistance : the elusive signal (s), 18. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.003>

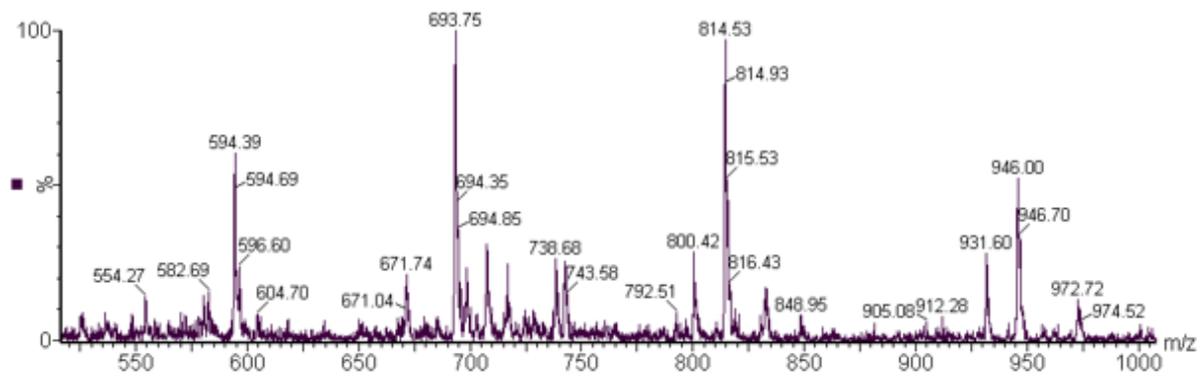
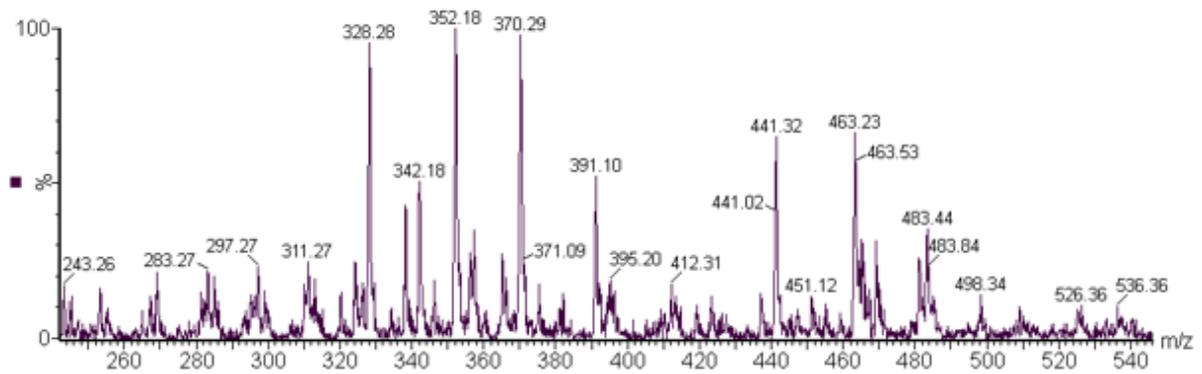
Wang, J., Liu, J., Chen, H., & Yao, J. (2007). Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB, 889–894. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1054-1>

Zarei, I. (2012). Biosynthesis of Bacitracin in Stirred Fermenter by *Bacillus Licheniformis* Using Defatted Oil Seed Cakes as Substrate, 6(2), 30–36. <https://doi.org/10.5539/mas.v6n2p30>

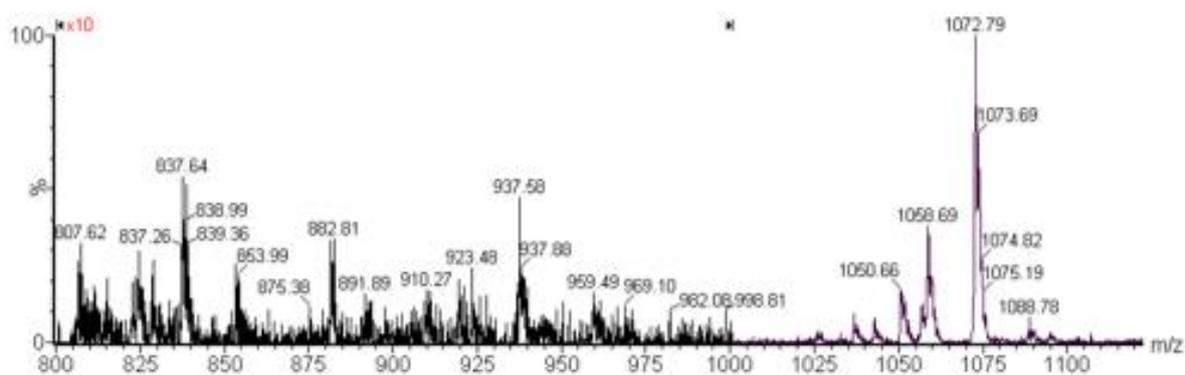
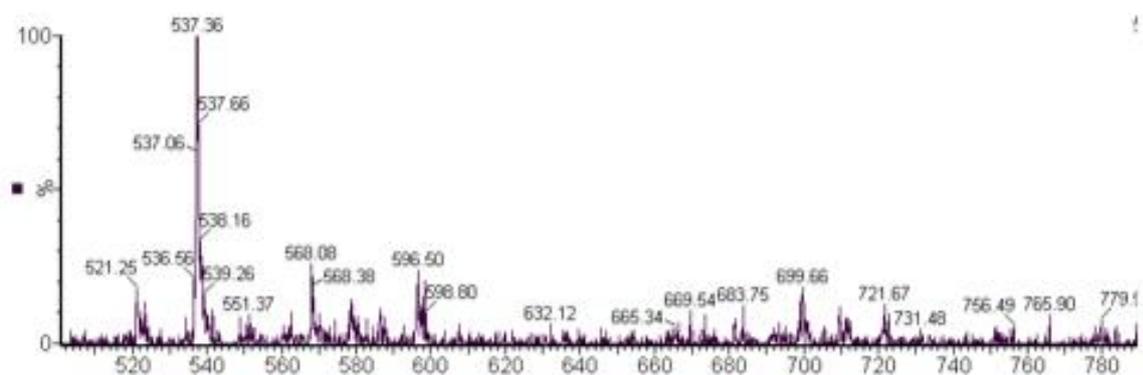
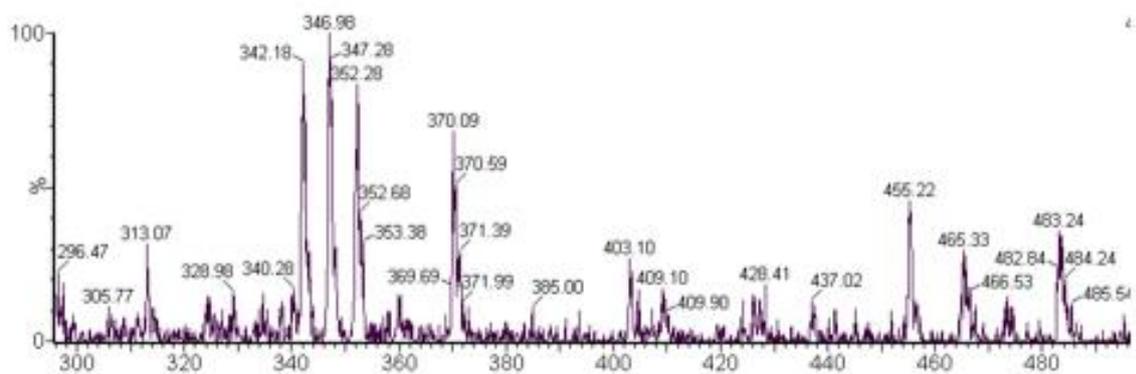
Zhao, X., & Kuipers, O. P. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3224-y>

ANNEXES

Spectre de masse du variant « f » produit *in planta*

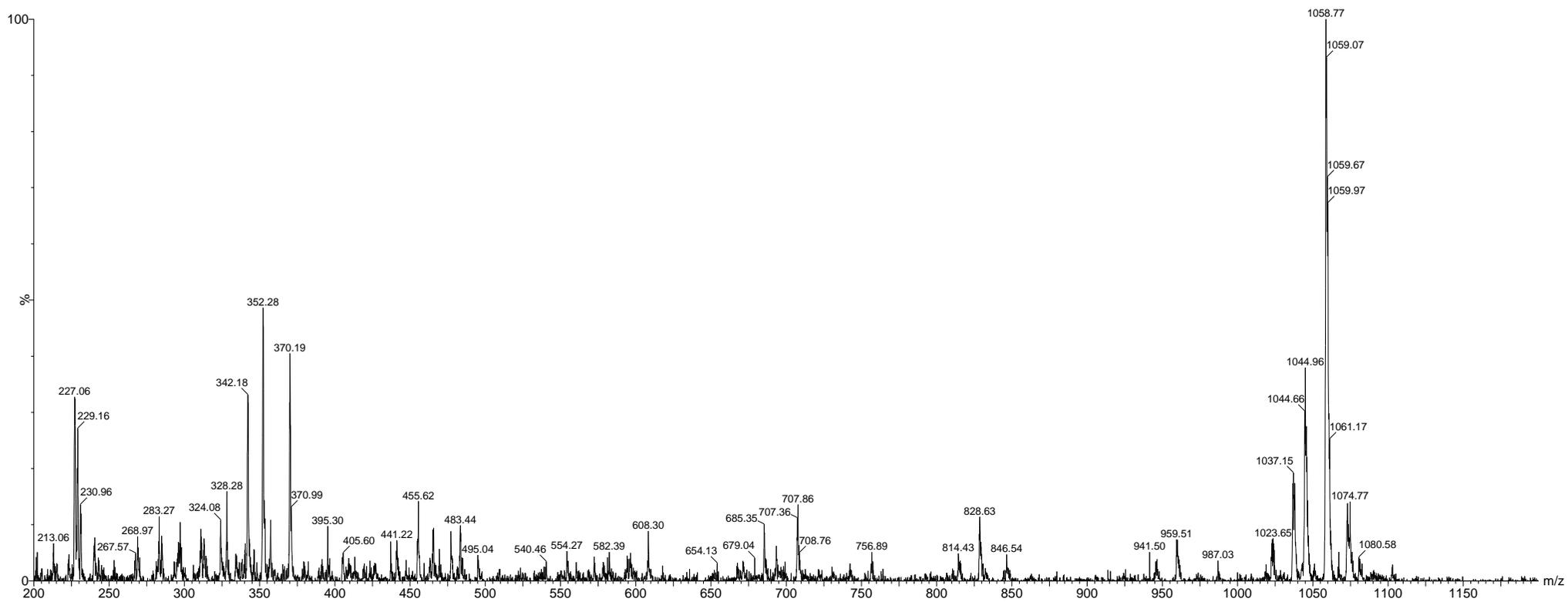


Spectre de masse du variant « g » produit *in planta*



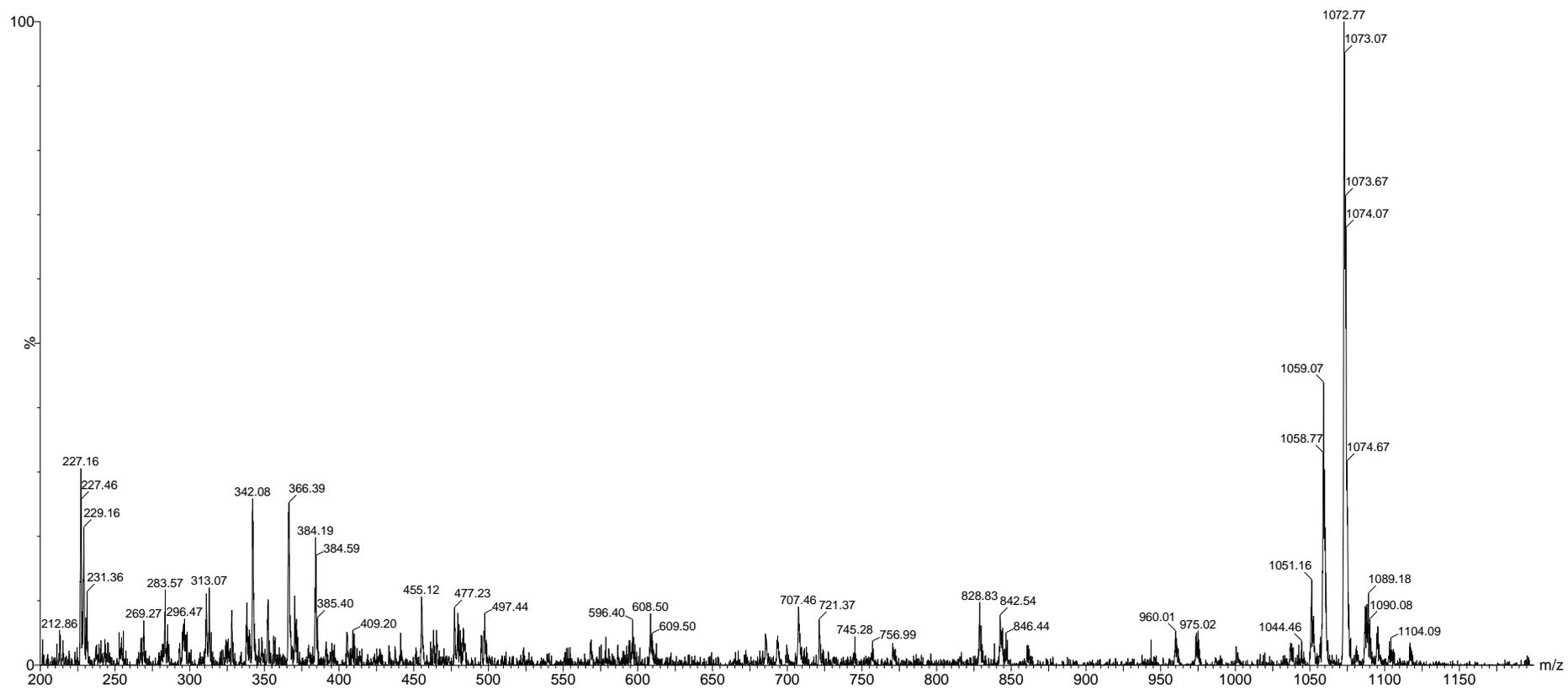
Spectre de masse du pic A d'endo412 en RE

412 RE 1:10



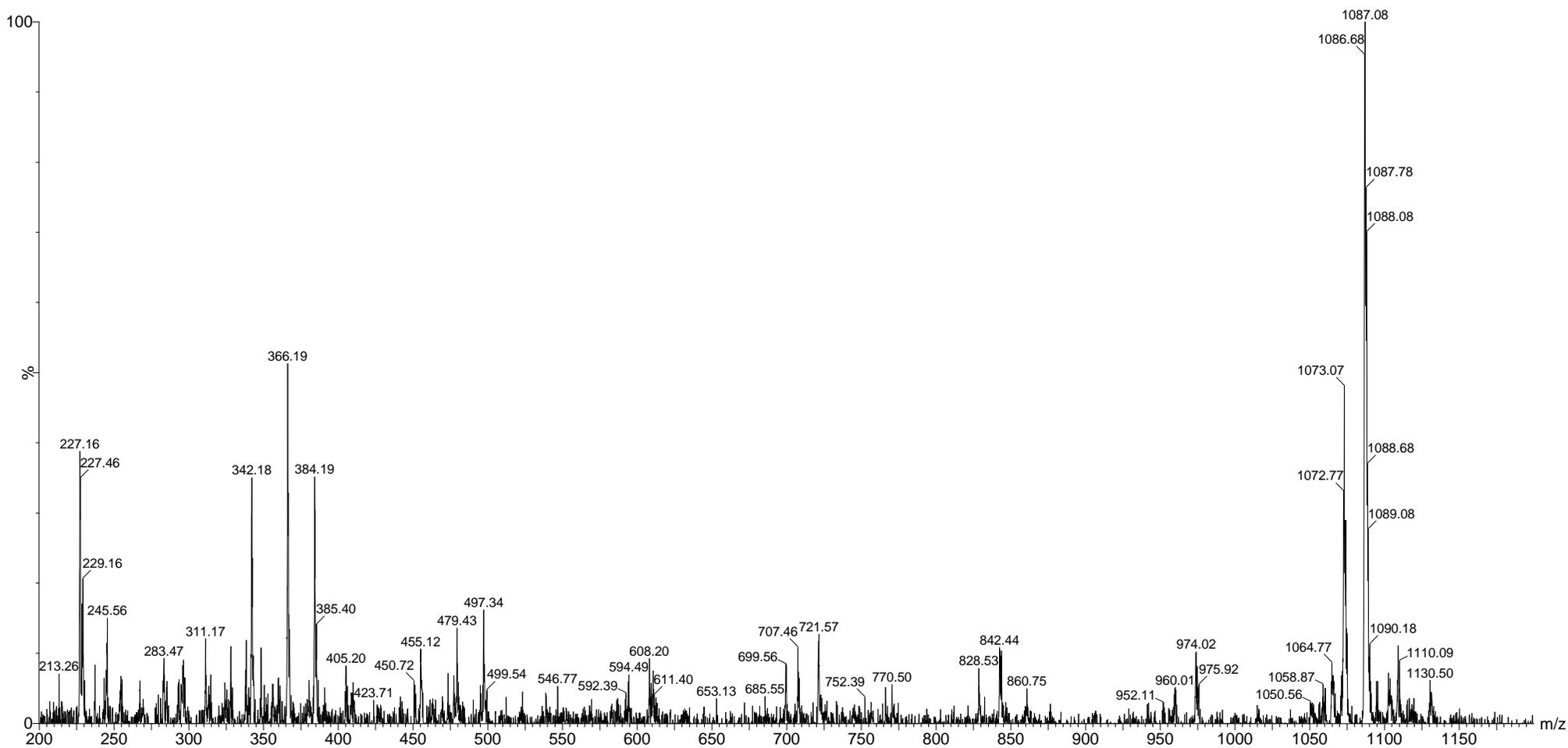
Spectre de masse du pic C d'endo412 en RE

412 RE 1:10



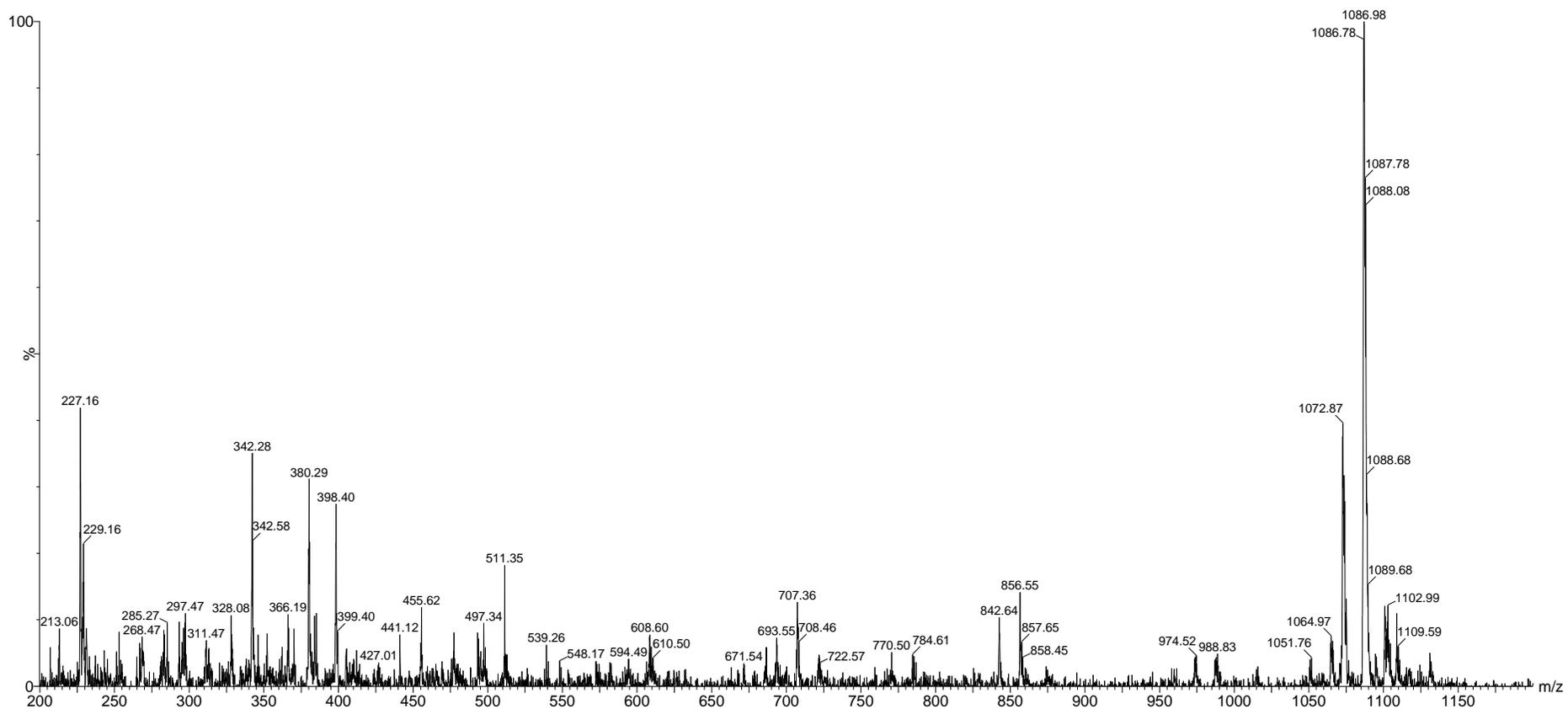
Spectre de masse du pic D d'endo412 en RE

412 RE 1:10



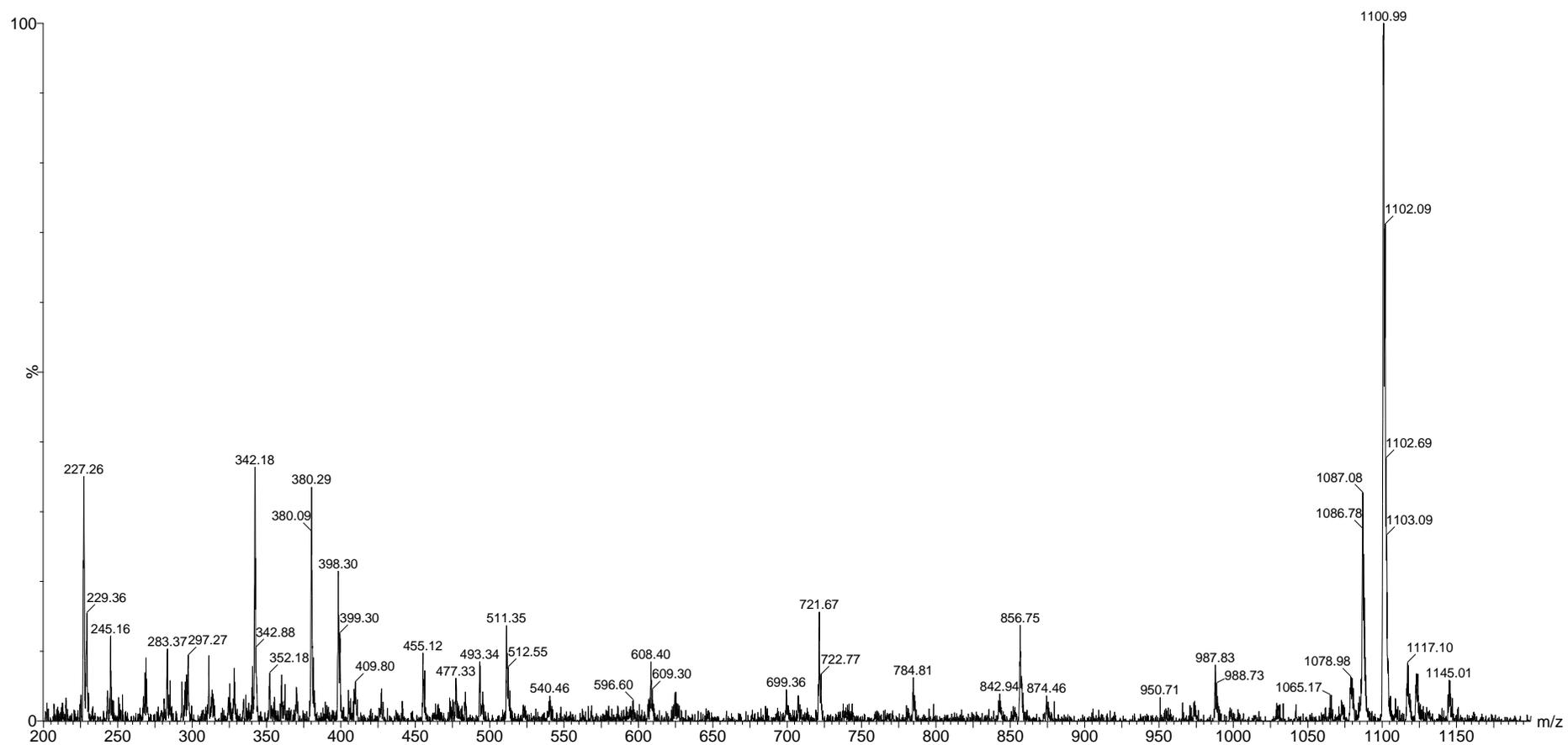
Spectre de masse du pic E d'endo412 en RE

412 RE 1:10



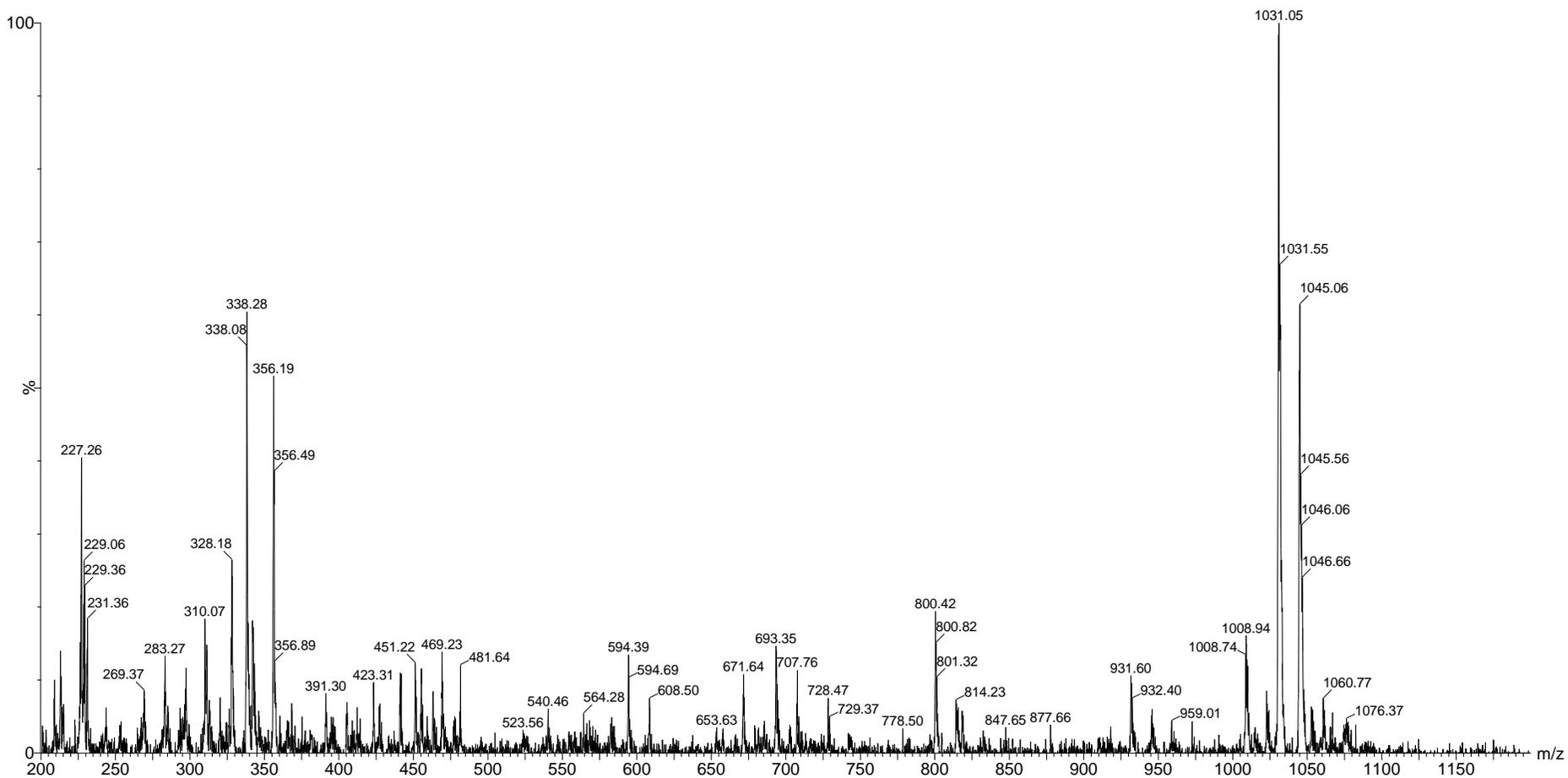
Spectre de masse du pic F d'endo412 en RE

412 RE 1:10



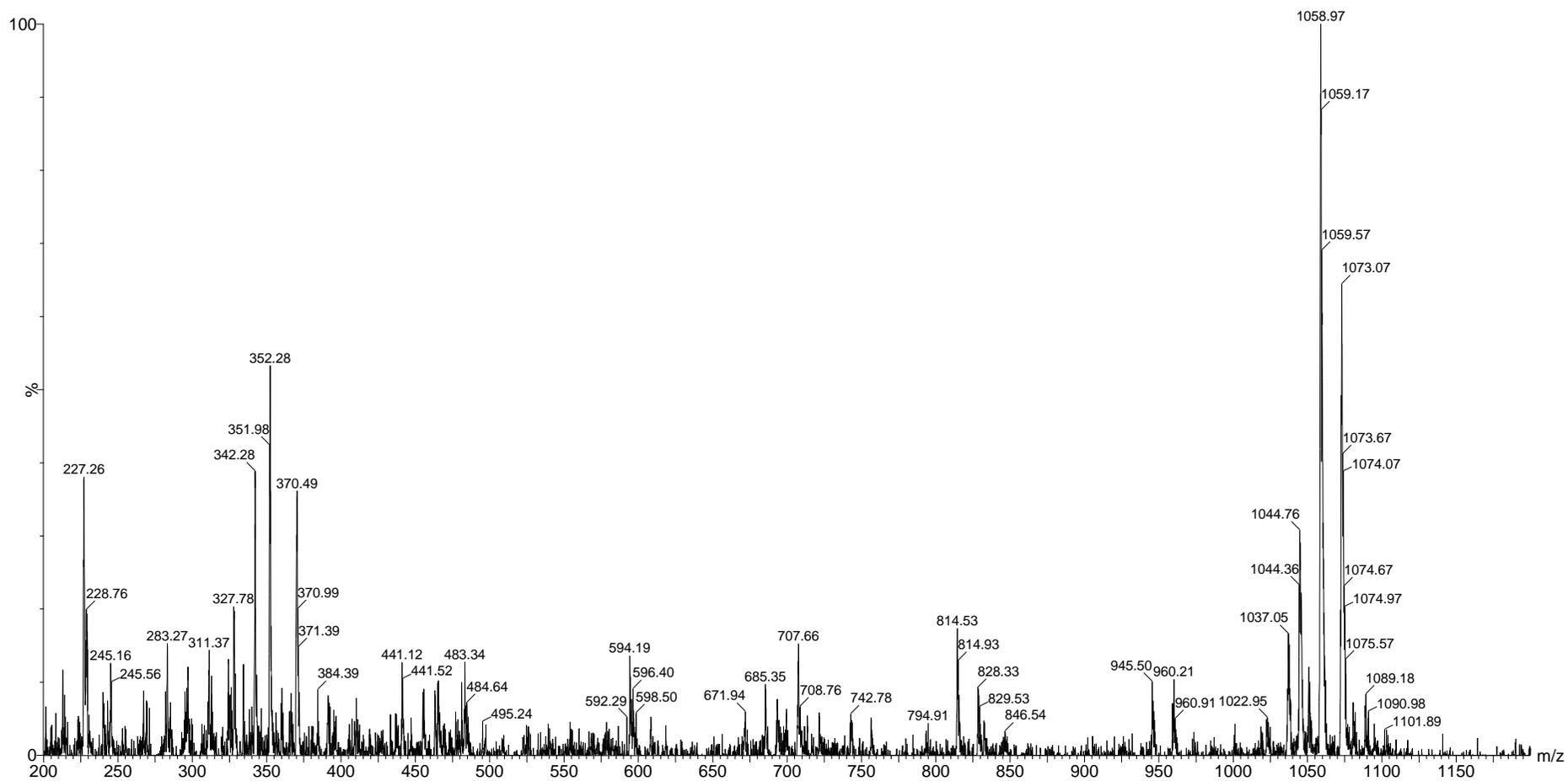
Spectre de masse du pic A d'endo412 en RE+Val

412 RE + val 1:10



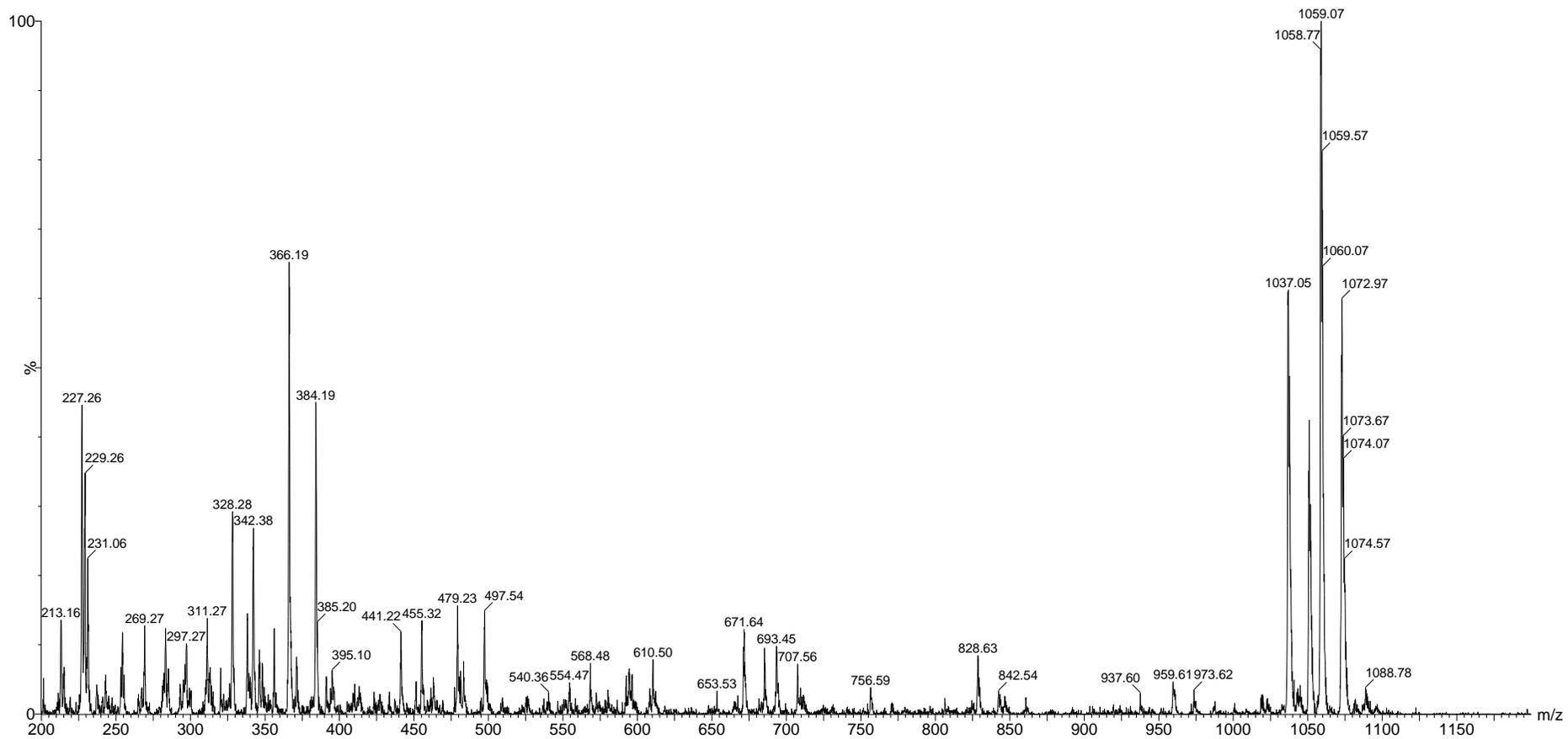
Spectre de masse du pic C d'endo412 en RE+Val

412 RE + val 1:10



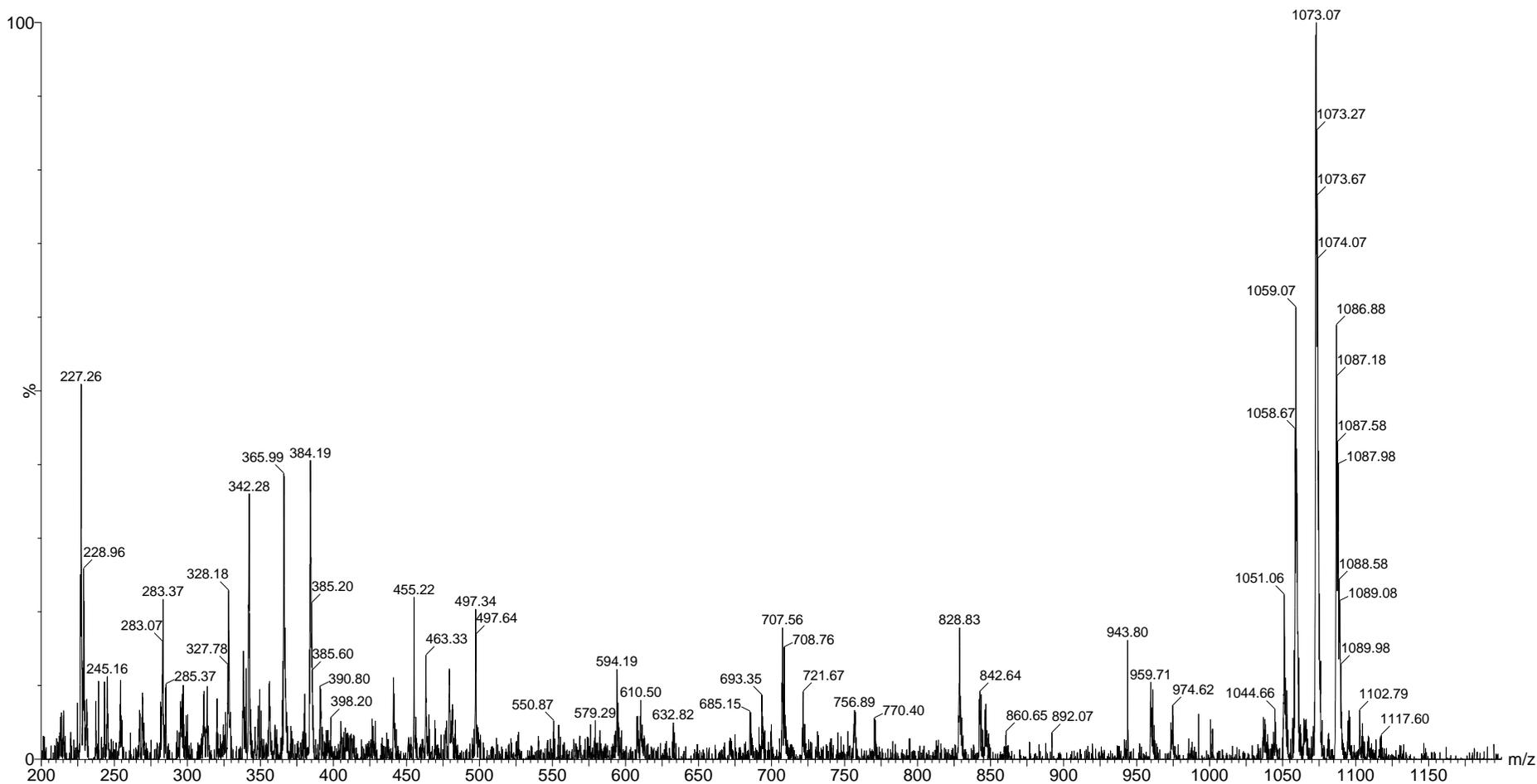
Spectre de masse du pic D d'endo412 en RE+Val

412 RE + val 1:10



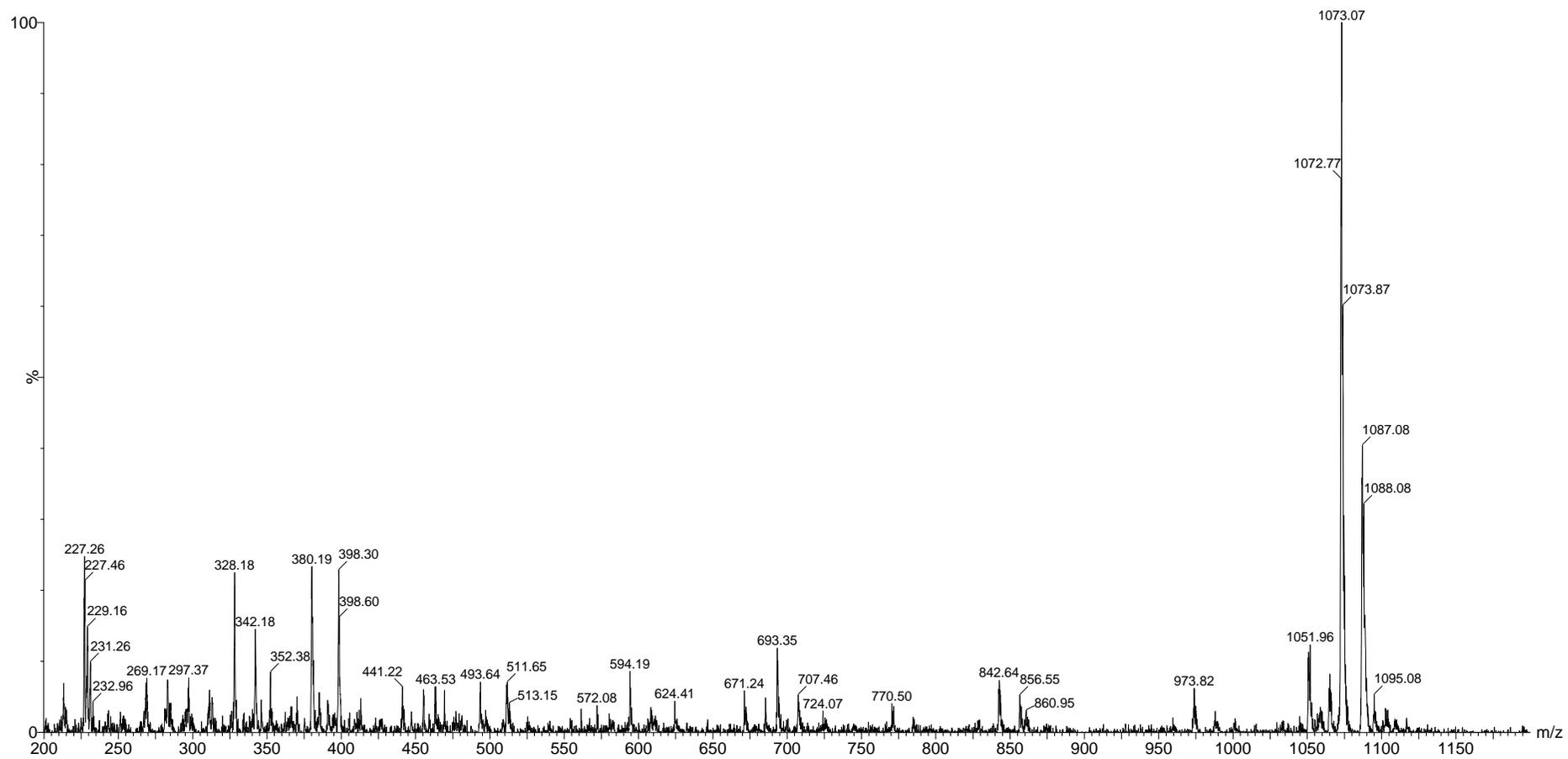
Spectre de masse du pic E d'endo412 en RE+Val

412 RE + val 1:10



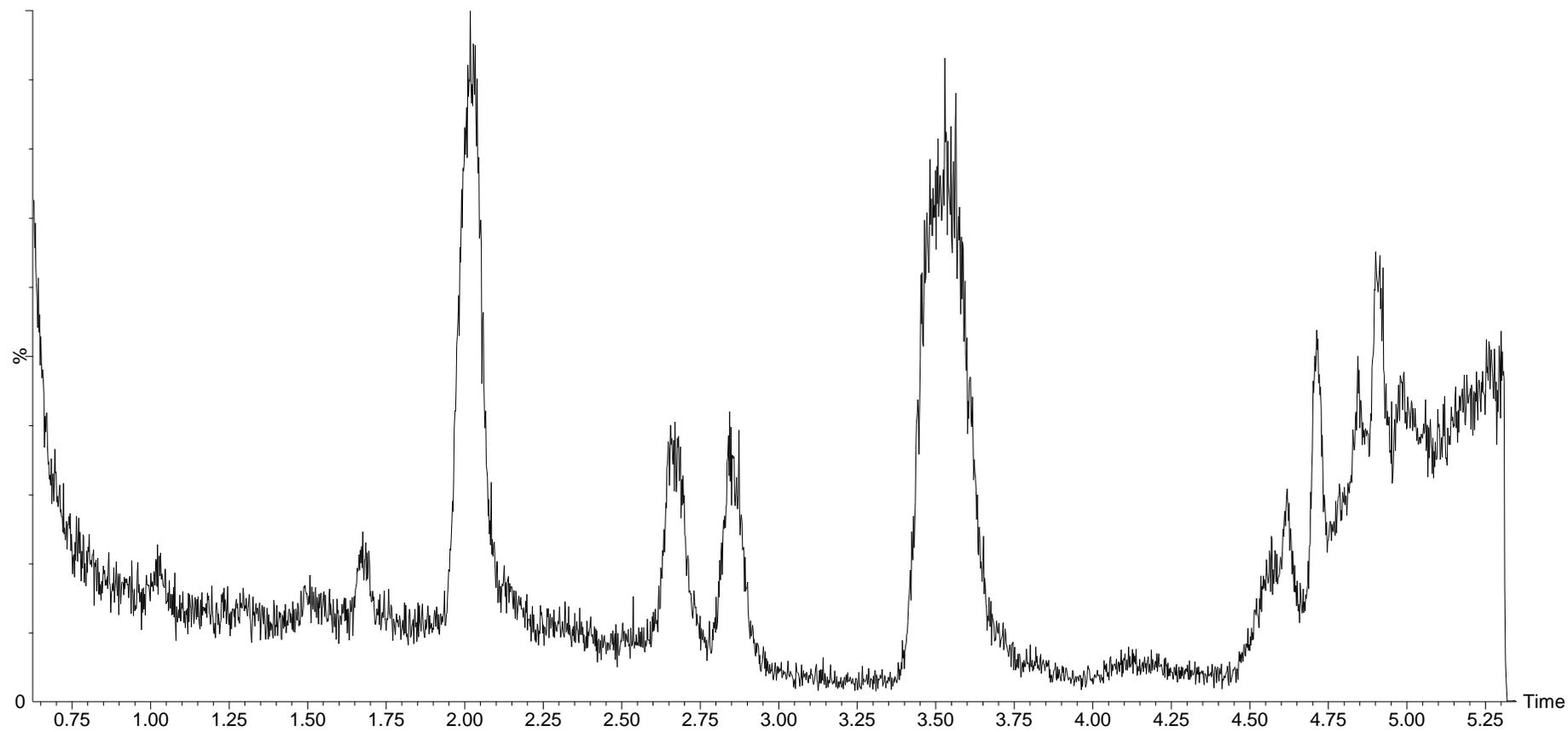
Spectre de masse du pic F d'endo412 en RE+Val

412 RE + val 1:10



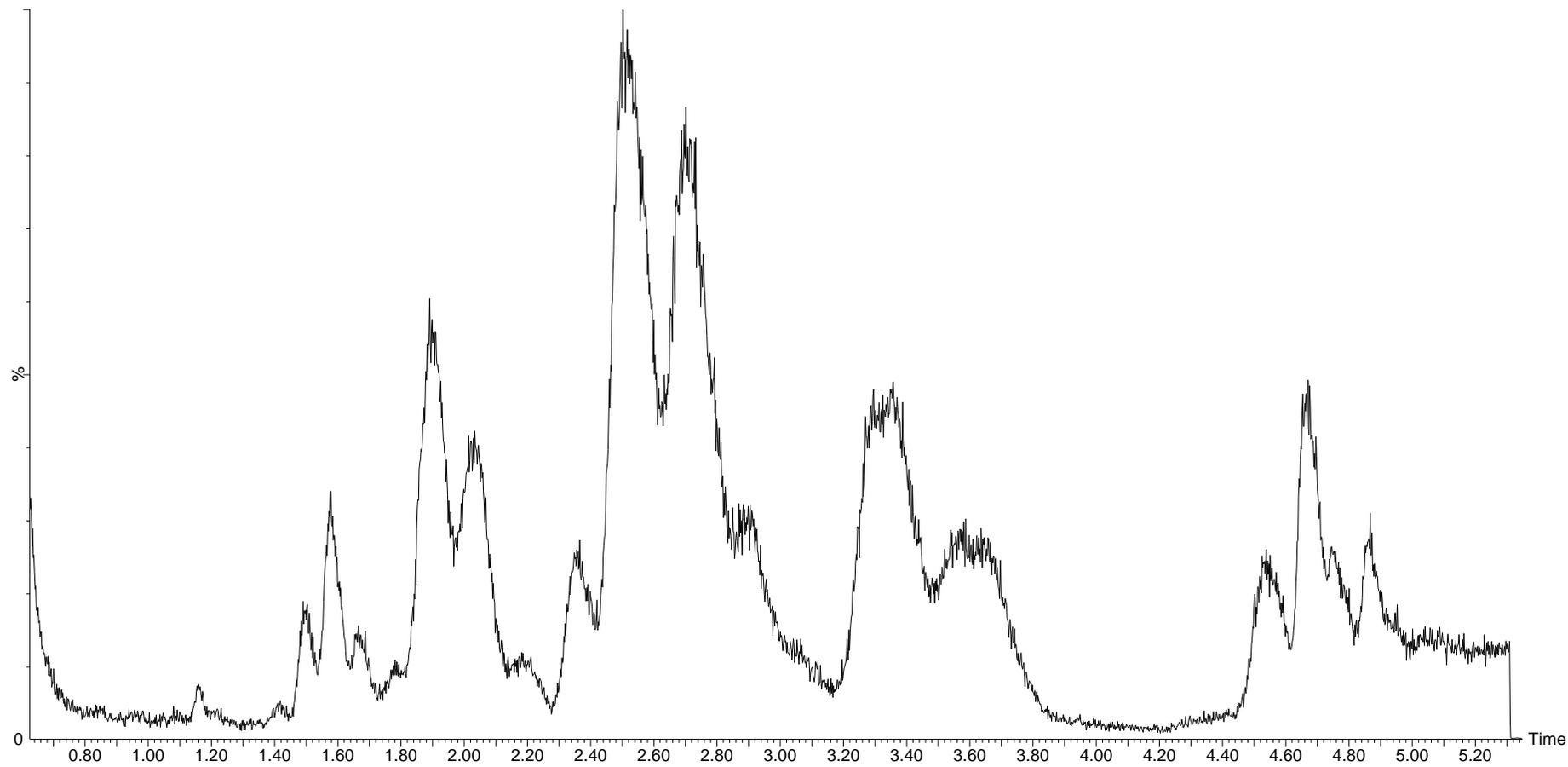
Comparaison variants S99 VS endo412 : chromatogramme de S499 en milieu LB

S499 LB

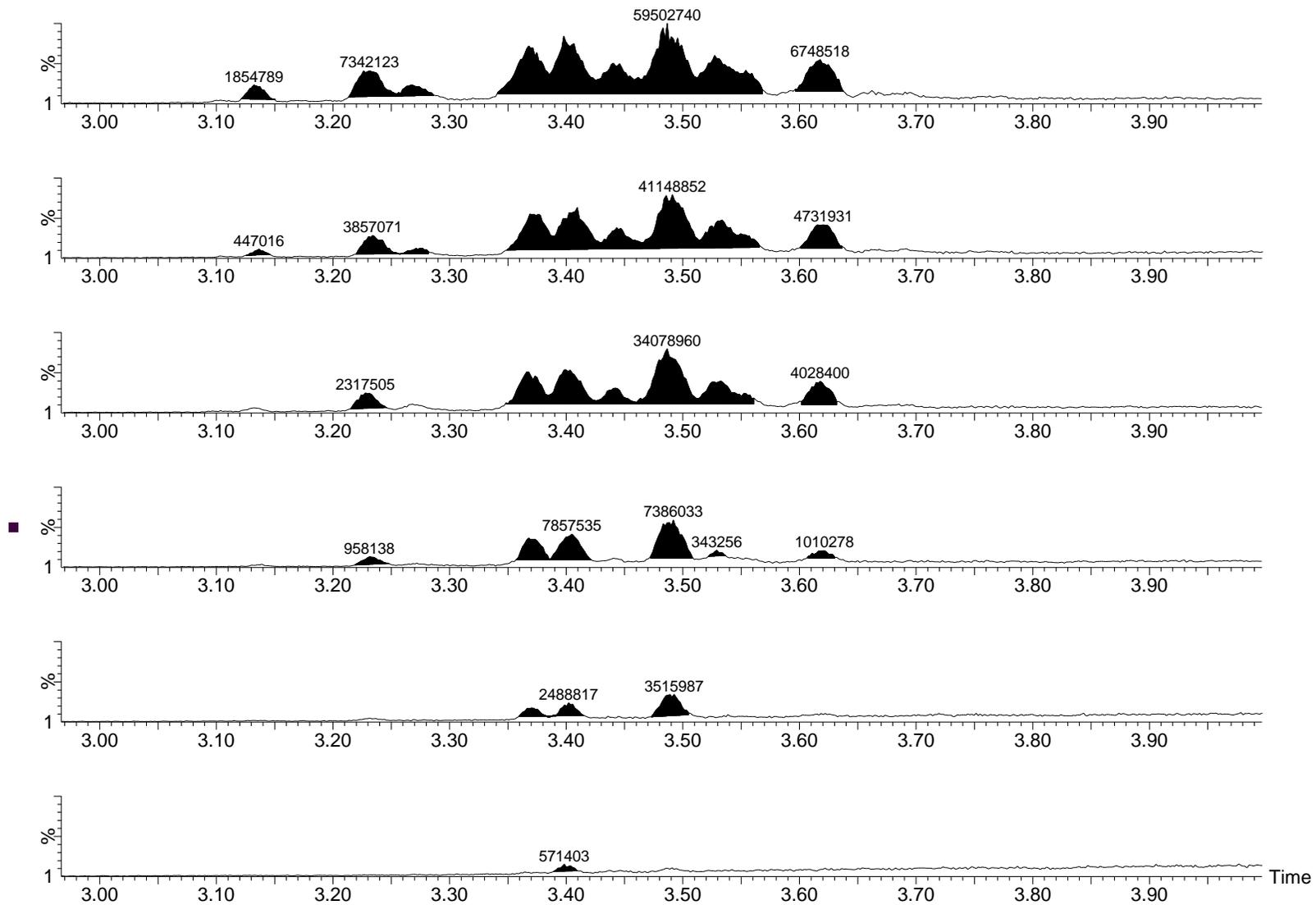


Comparaison variants S99 VS endo412 : chromatogramme de S499 en milieu RE+Val

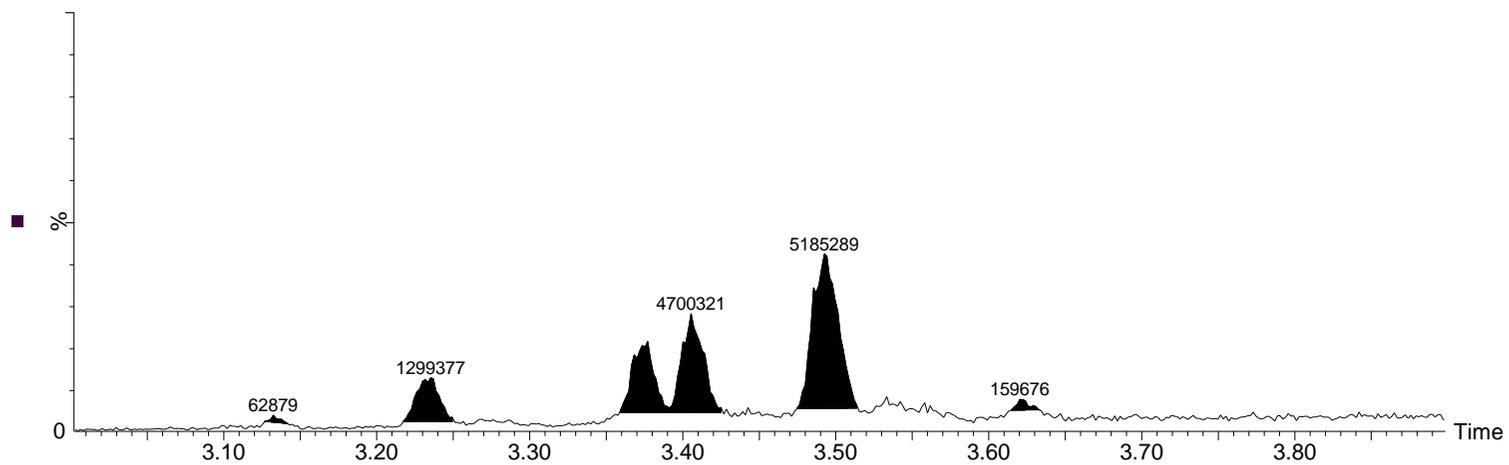
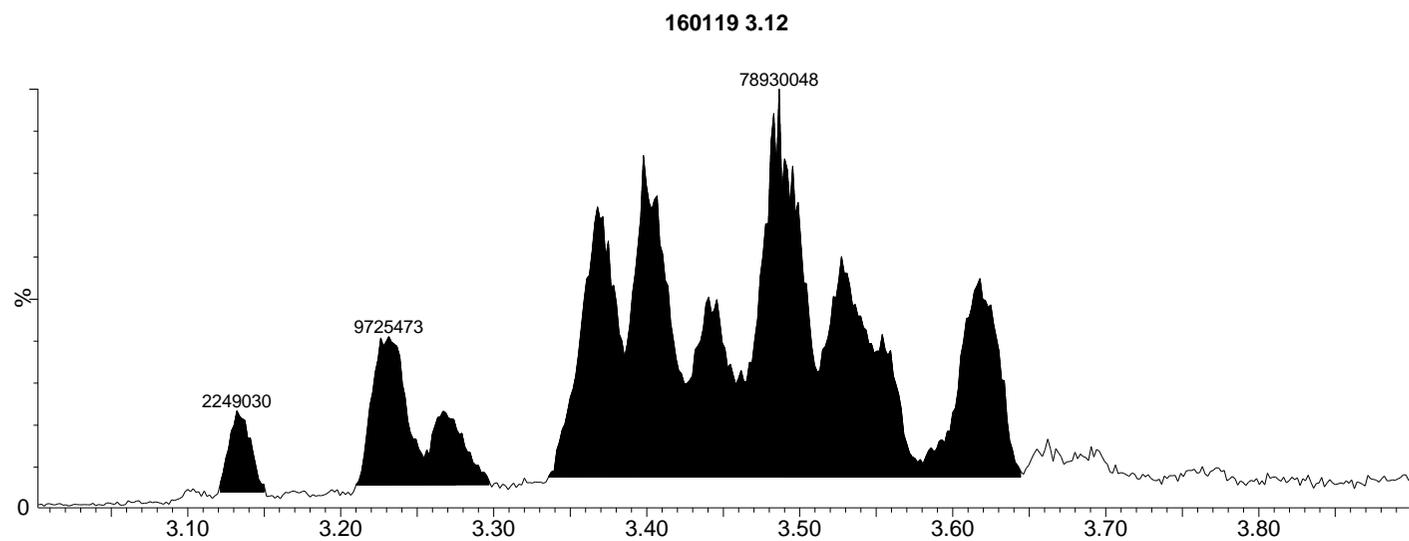
S499 RE + val



160119 1.9

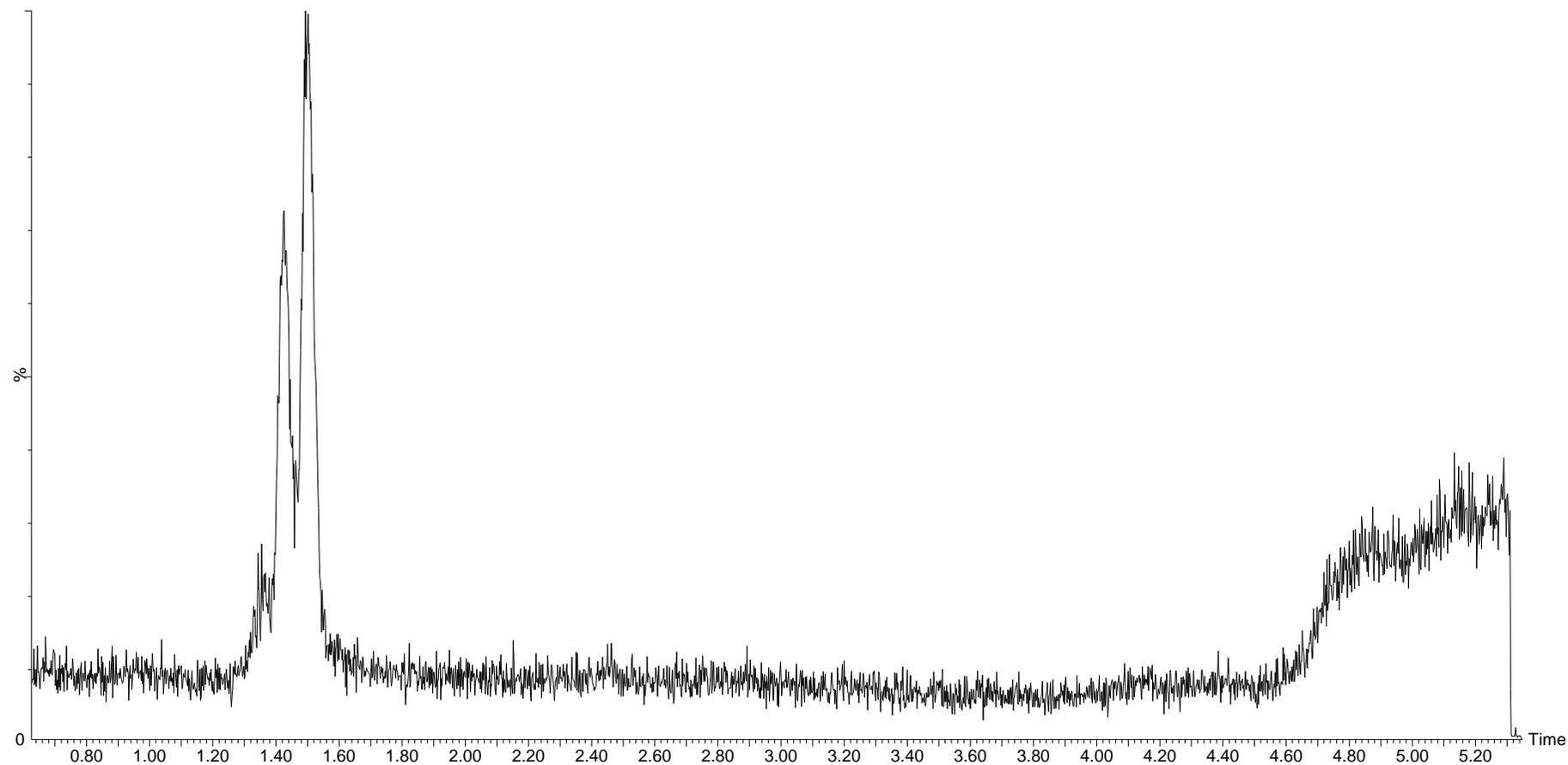


Dynamique de production des surfactines, milieu LB (en bas) et RE (au dessus) – INTEGRATIONS



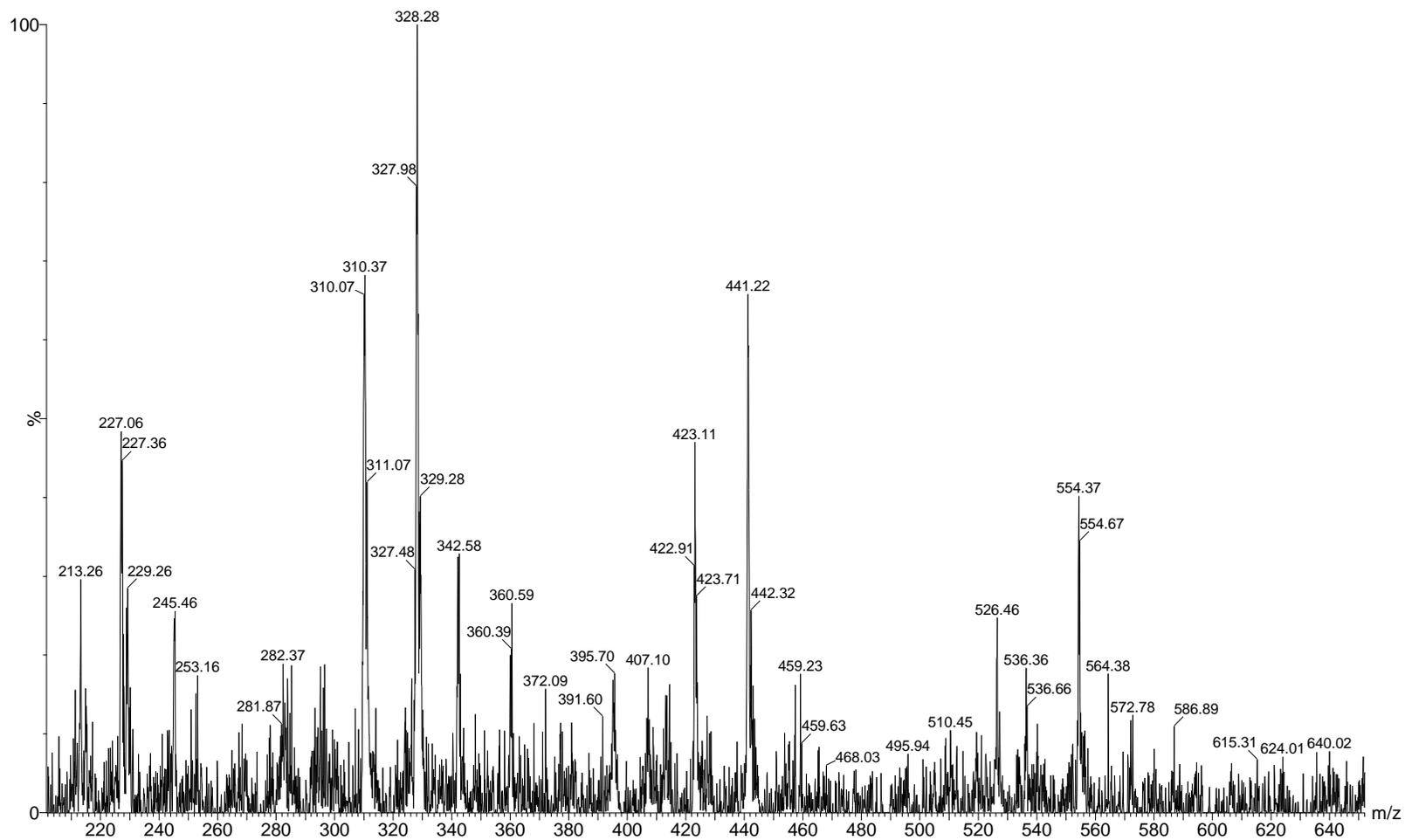
Fractionnement HPLC – Fraction 4 : chromatogramme

F4 VAL+ brute



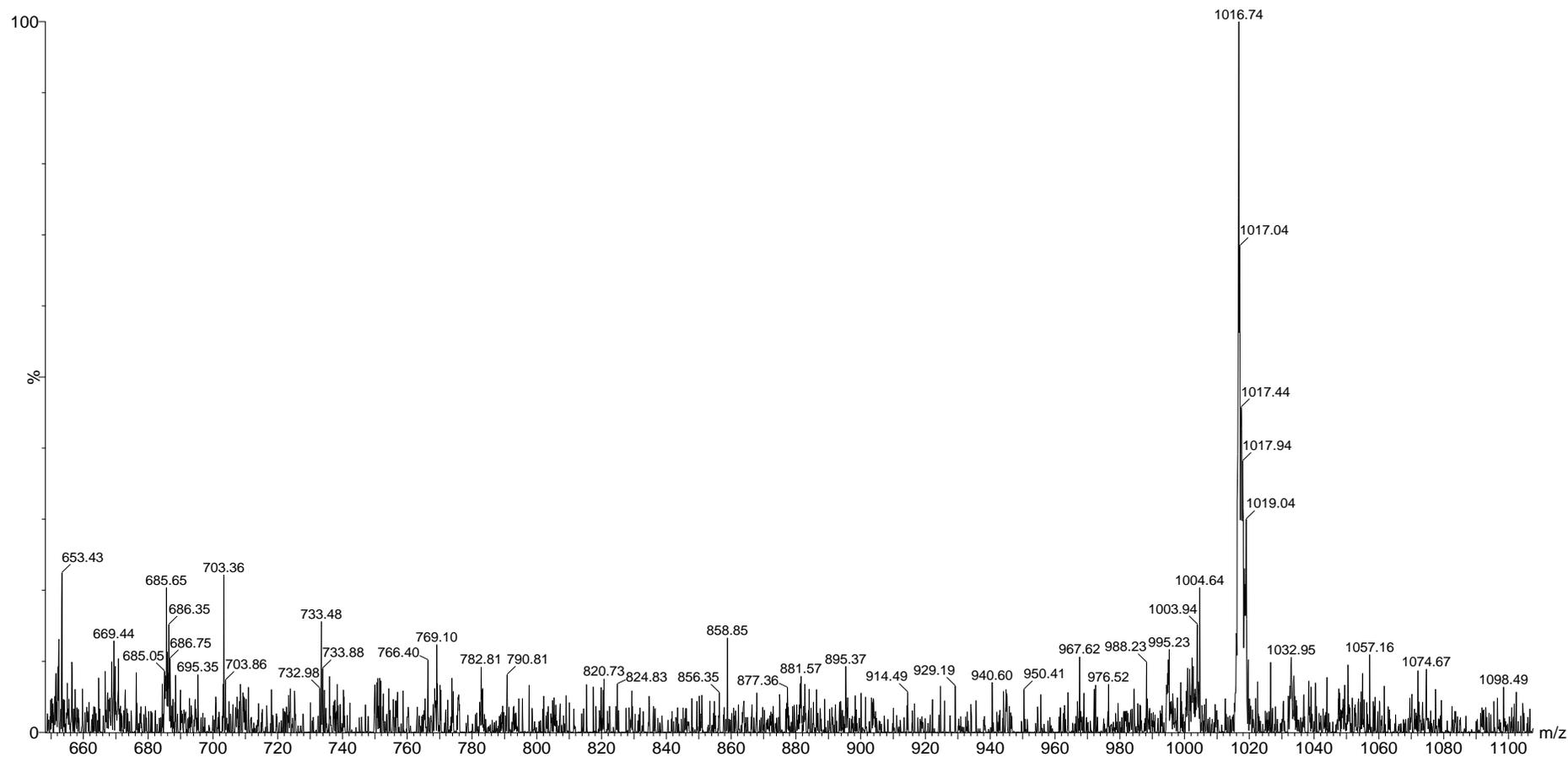
Fractionnement HPLC – Fraction 4 : MS 1^{er} pic, partie 1

F4 VAL+ brute



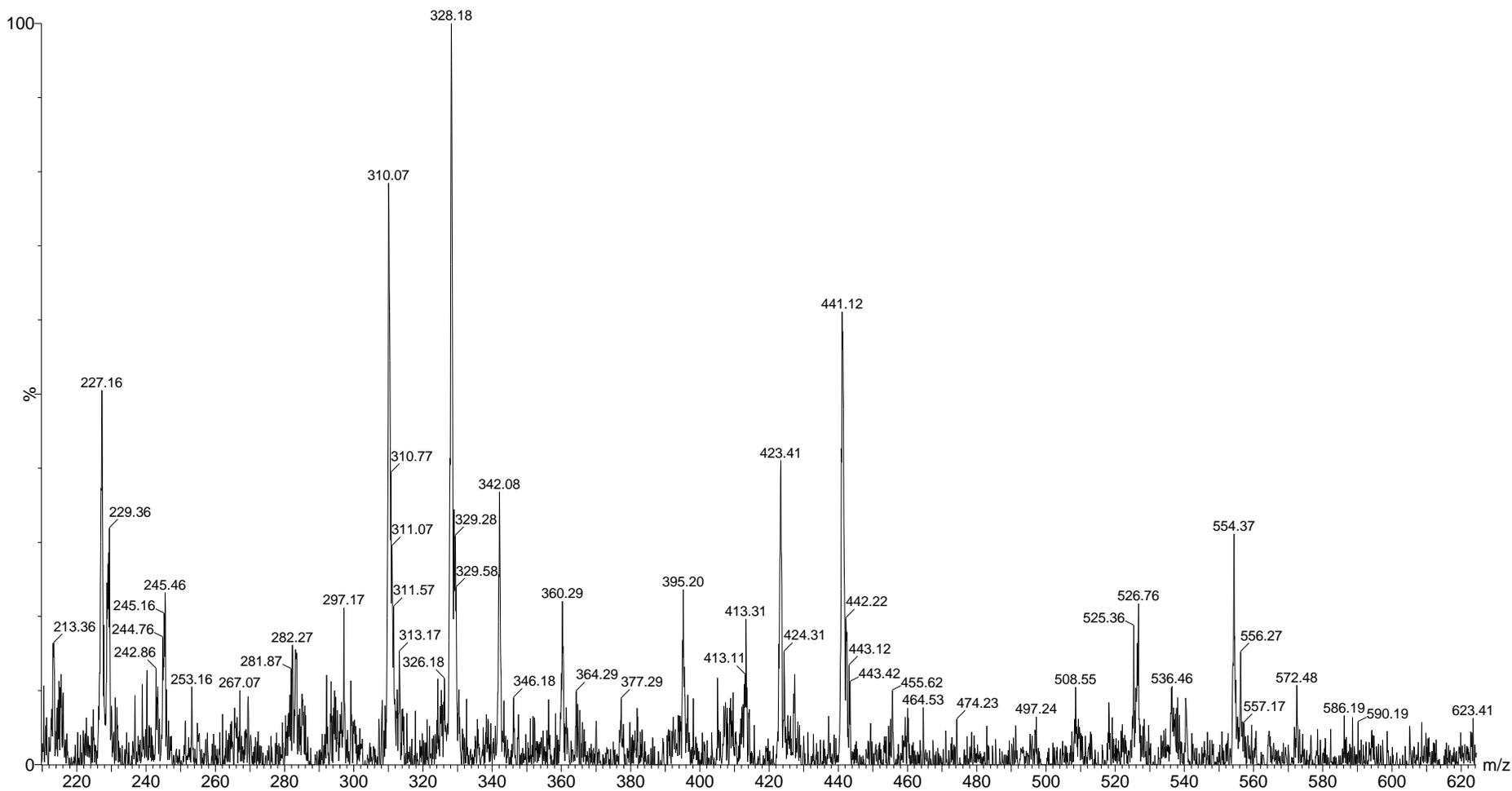
Fractionnement HPLC – Fraction 4 : MS 1^{er} pic, partie 2

F4 VAL+ brute



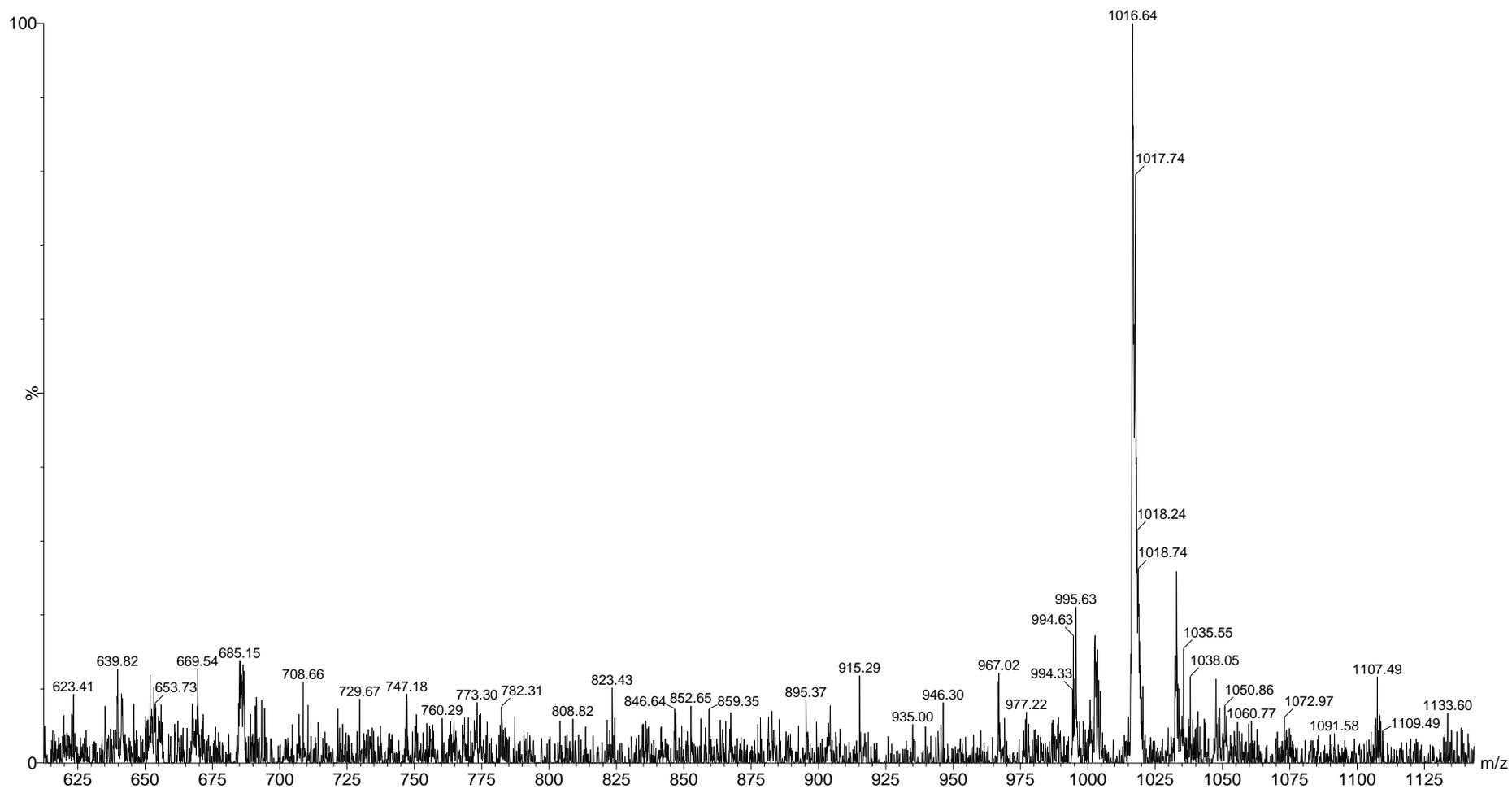
Fractionnement HPLC – Fraction 4 : MS 2nd pic, partie 1

F4 VAL+ brute



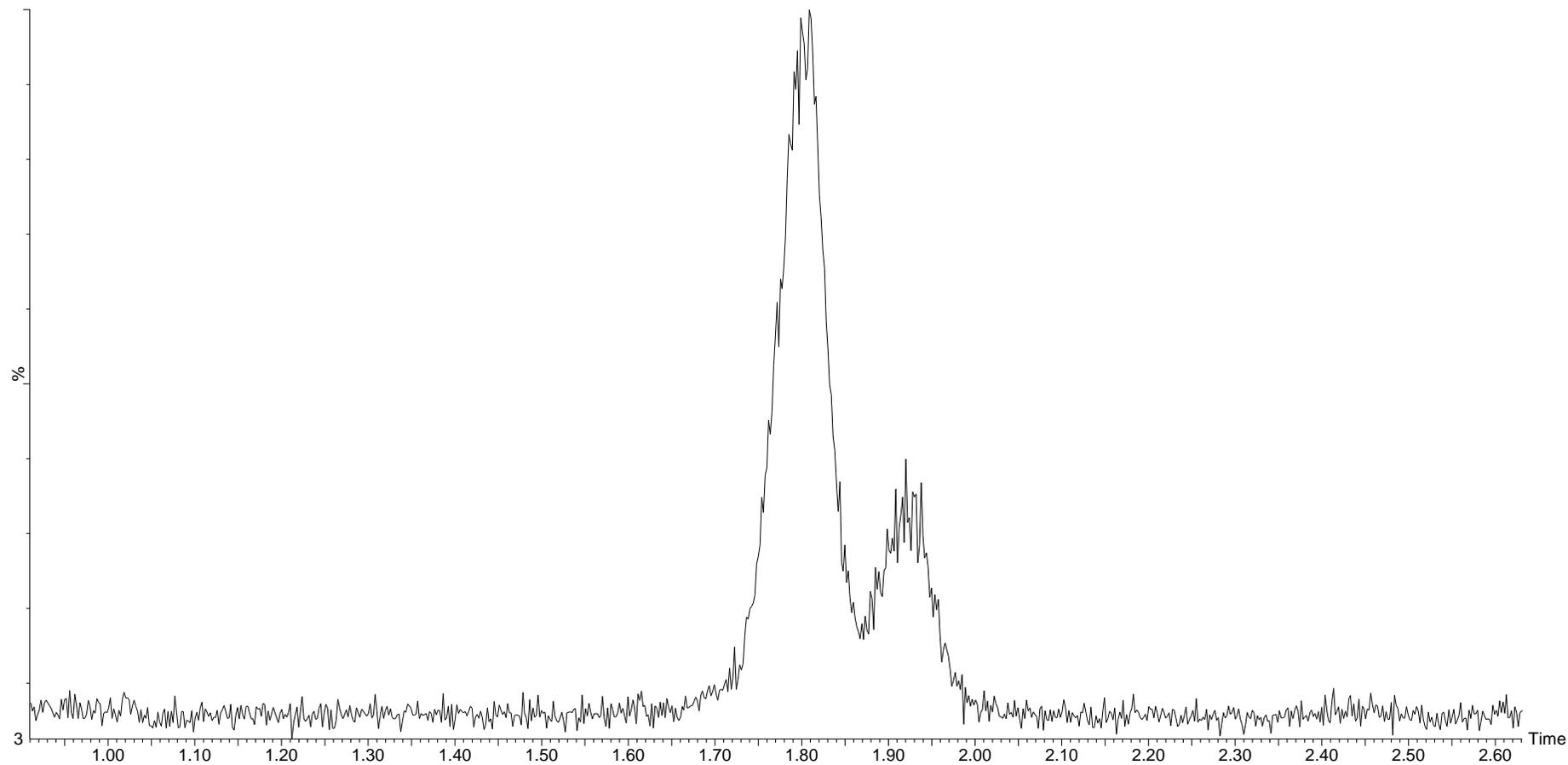
Fractionnement HPLC – Fraction 4 : MS 2nd pic, partie 2

F4 VAL+ brute



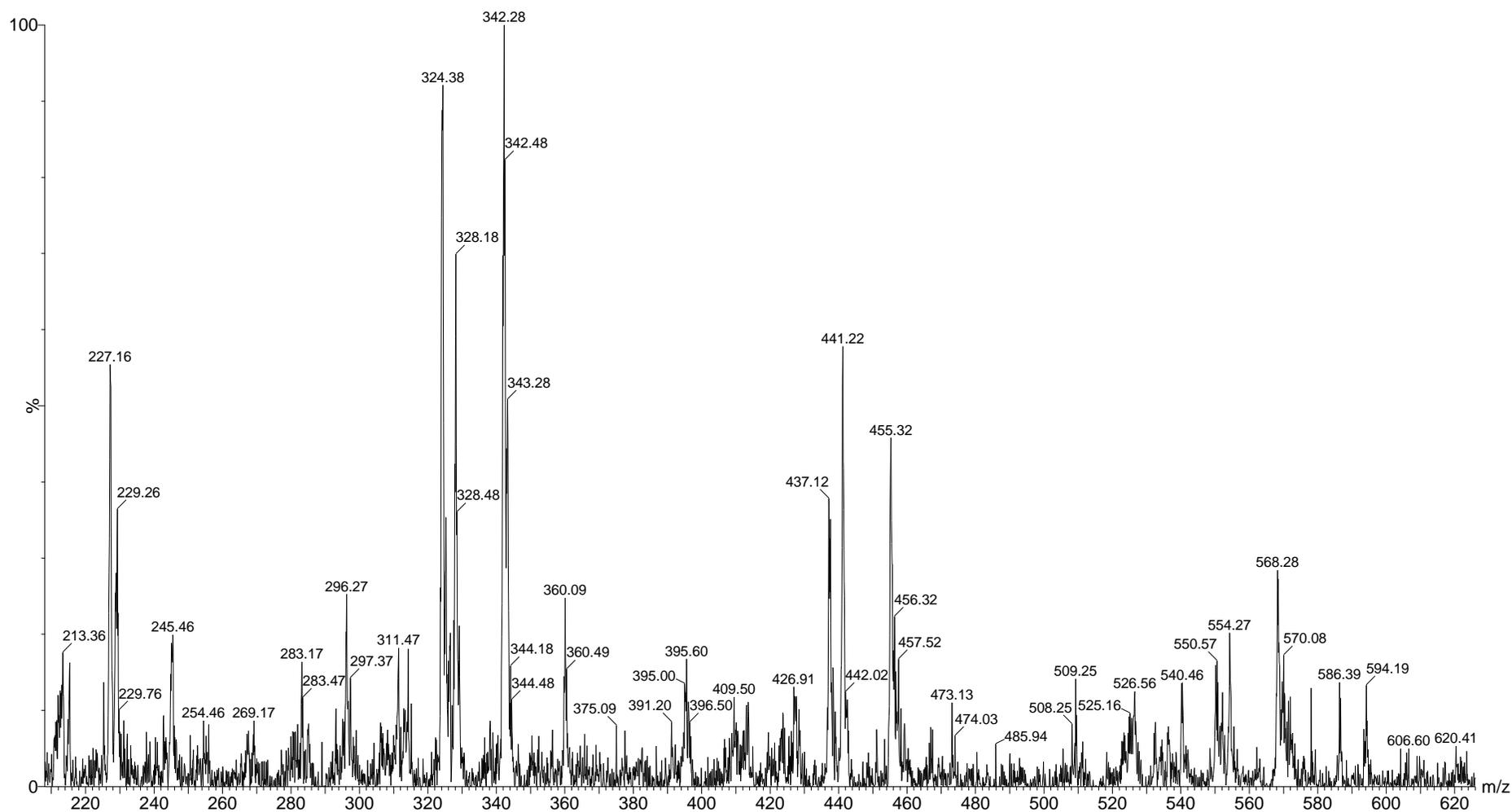
Fractionnement HPLC – Fraction 6 : chromatogramme

F6 VAL+ brute



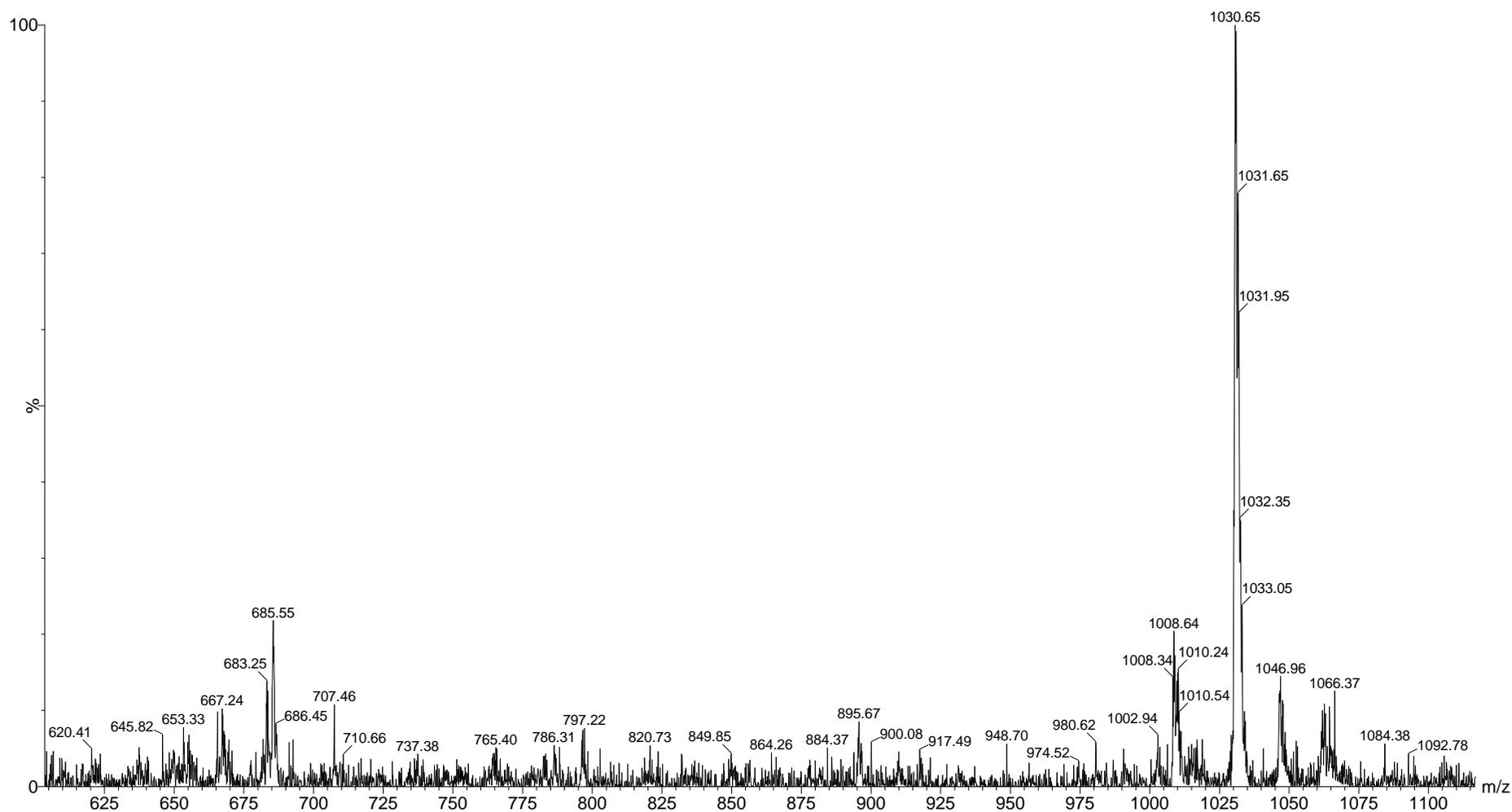
Fractionnement HPLC – Fraction 6 : MS 1^{er} pic, partie 1

F6 VAL+ brute



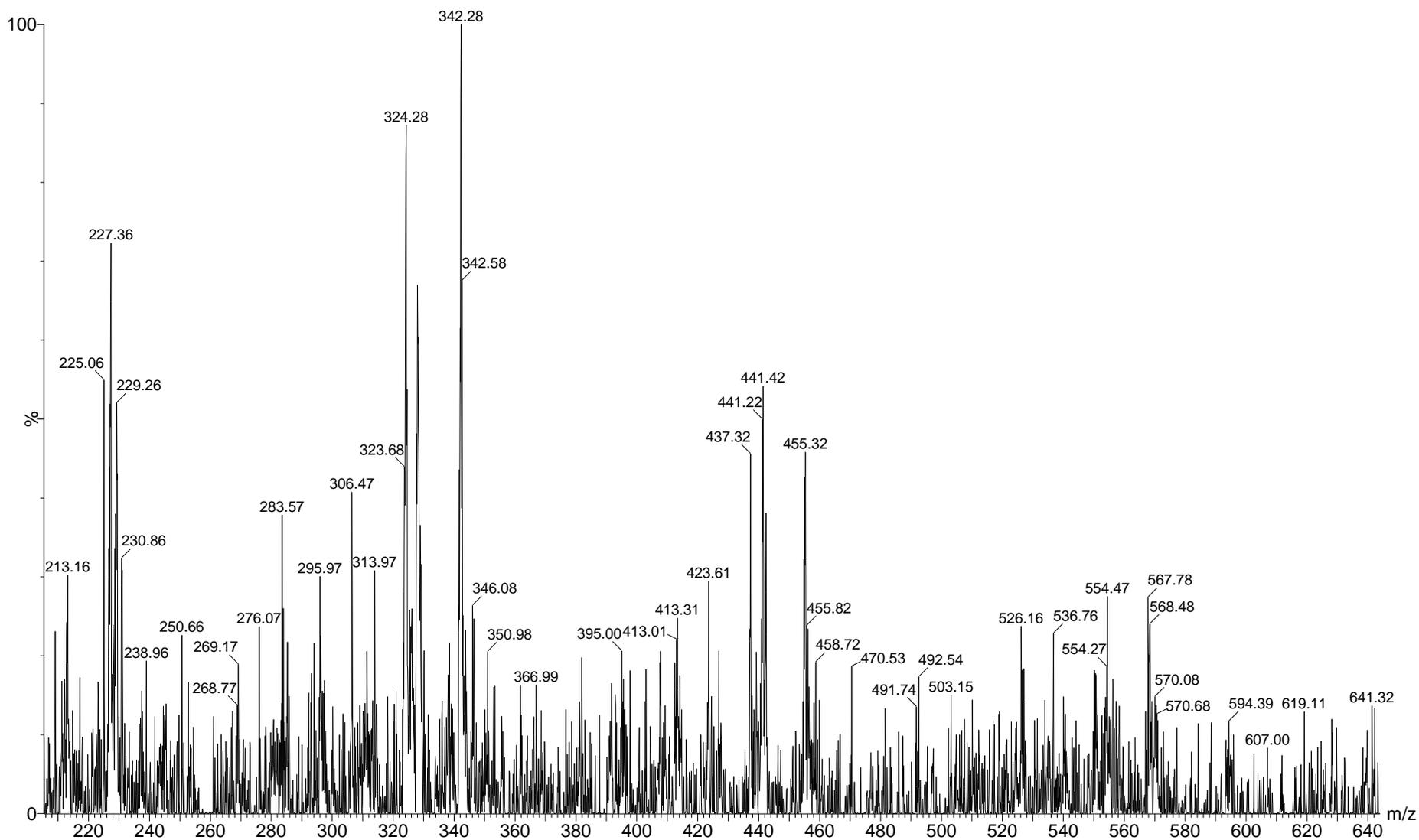
Fractionnement HPLC – Fraction 6 : MS 1^{er} pic, partie 2

F6 VAL+ brute



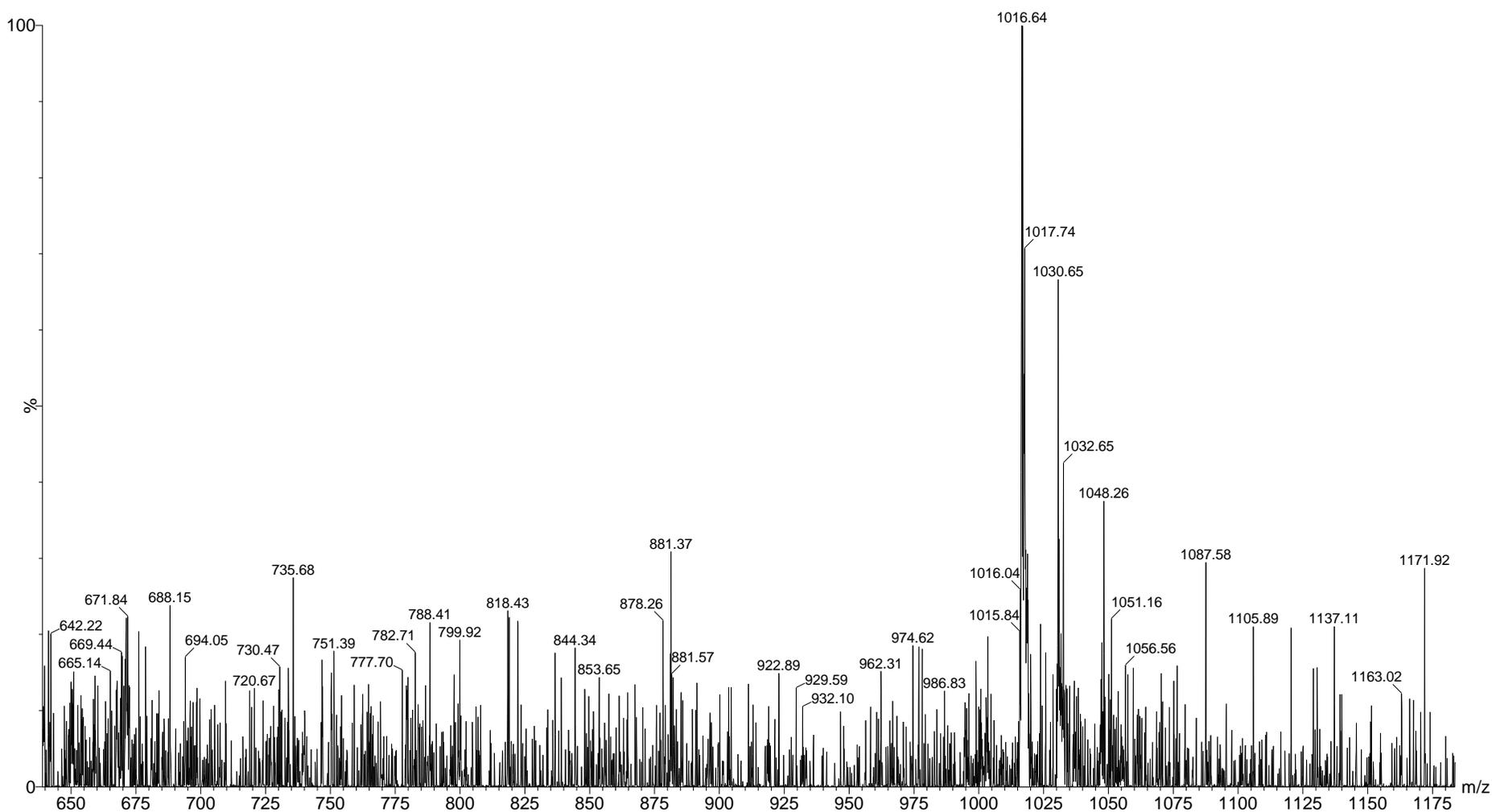
Fractionnement HPLC – Fraction 6 : MS 2nd pic, partie 1

F6 VAL+ brute



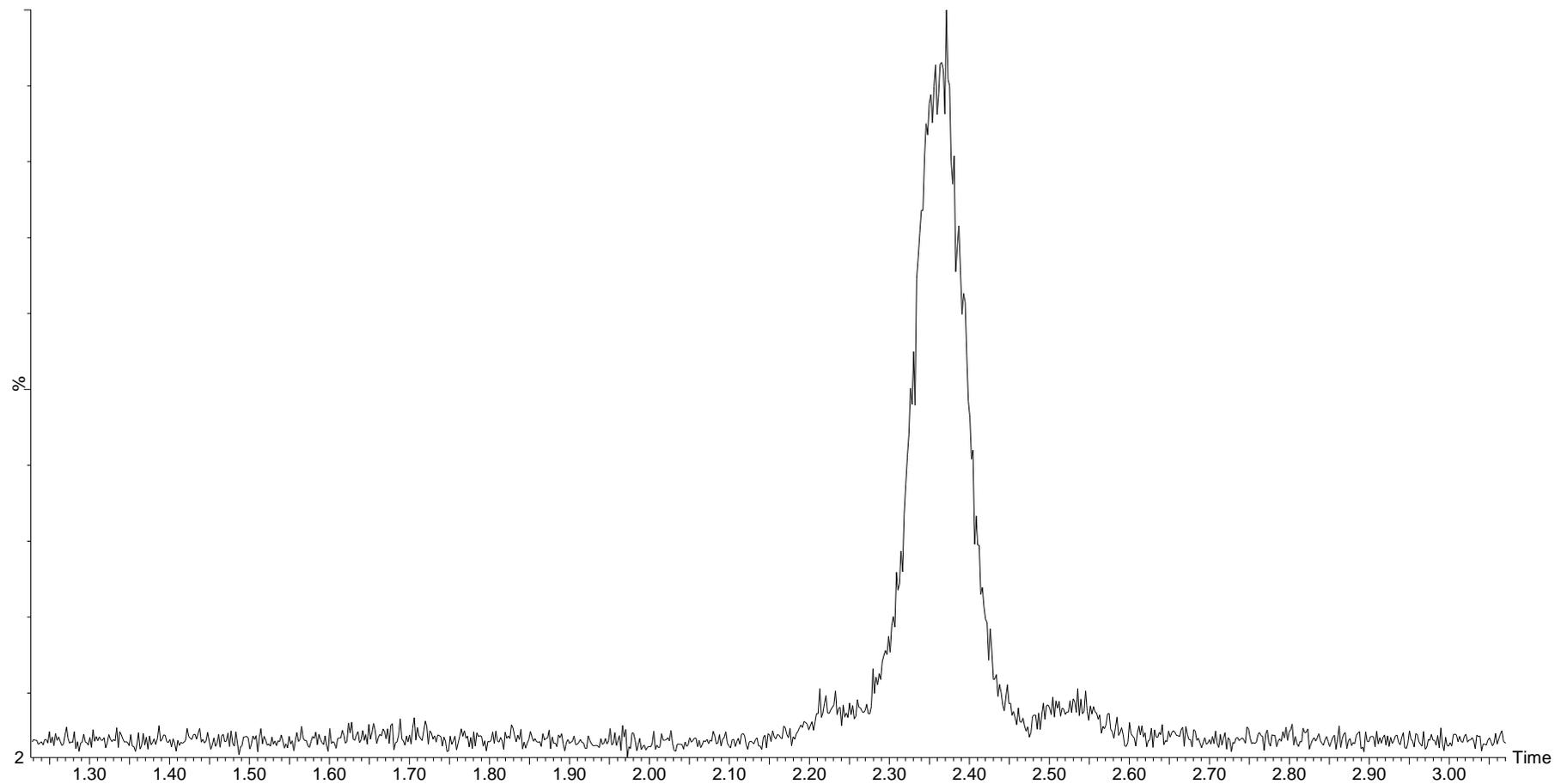
Fractionnement HPLC – Fraction 6 : MS 2nd pic, partie 2

F6 VAL+ brute



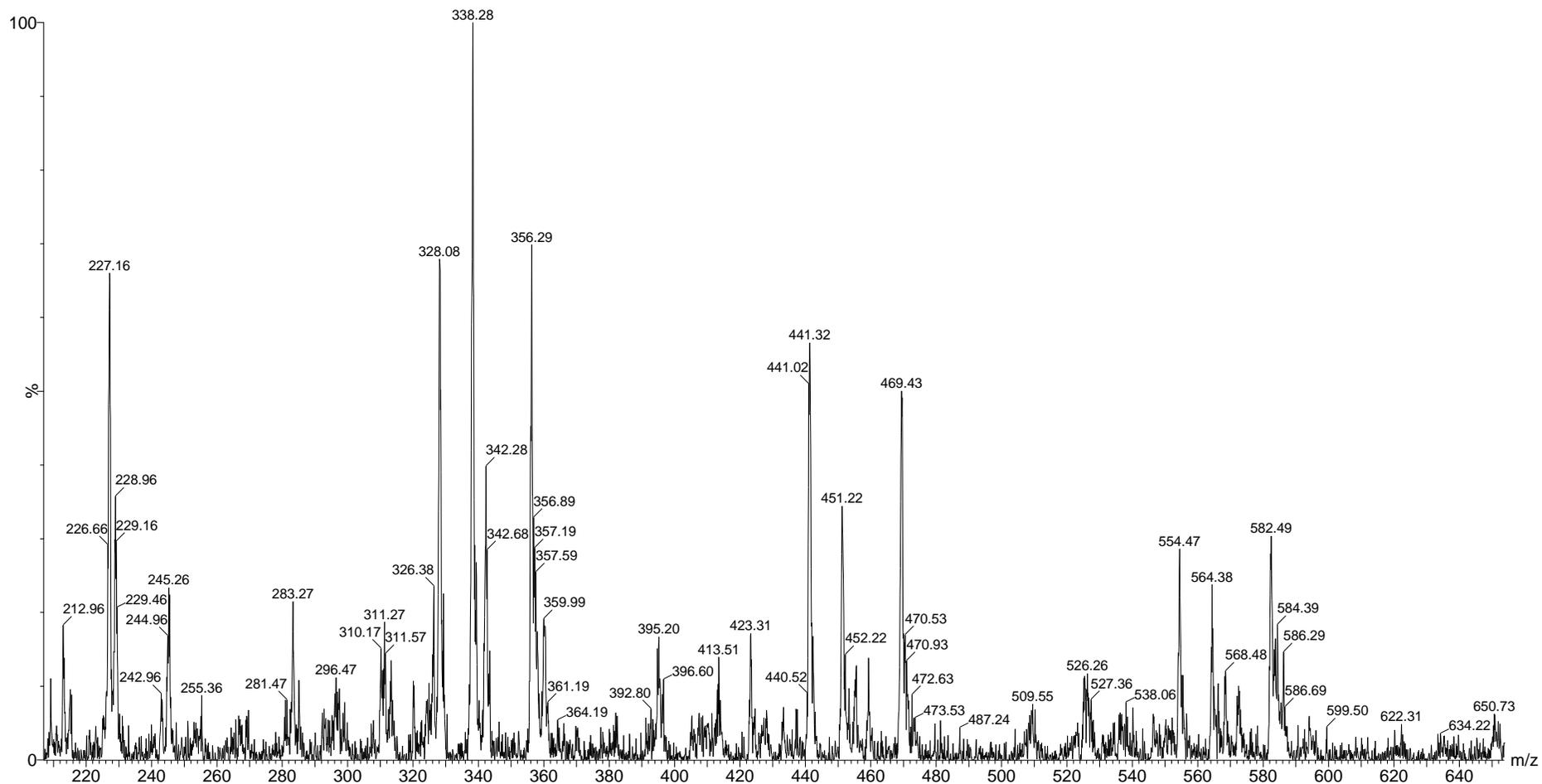
Fractionnement HPLC – Fraction 8 : Chromatogramme

F8 VAL+ brute



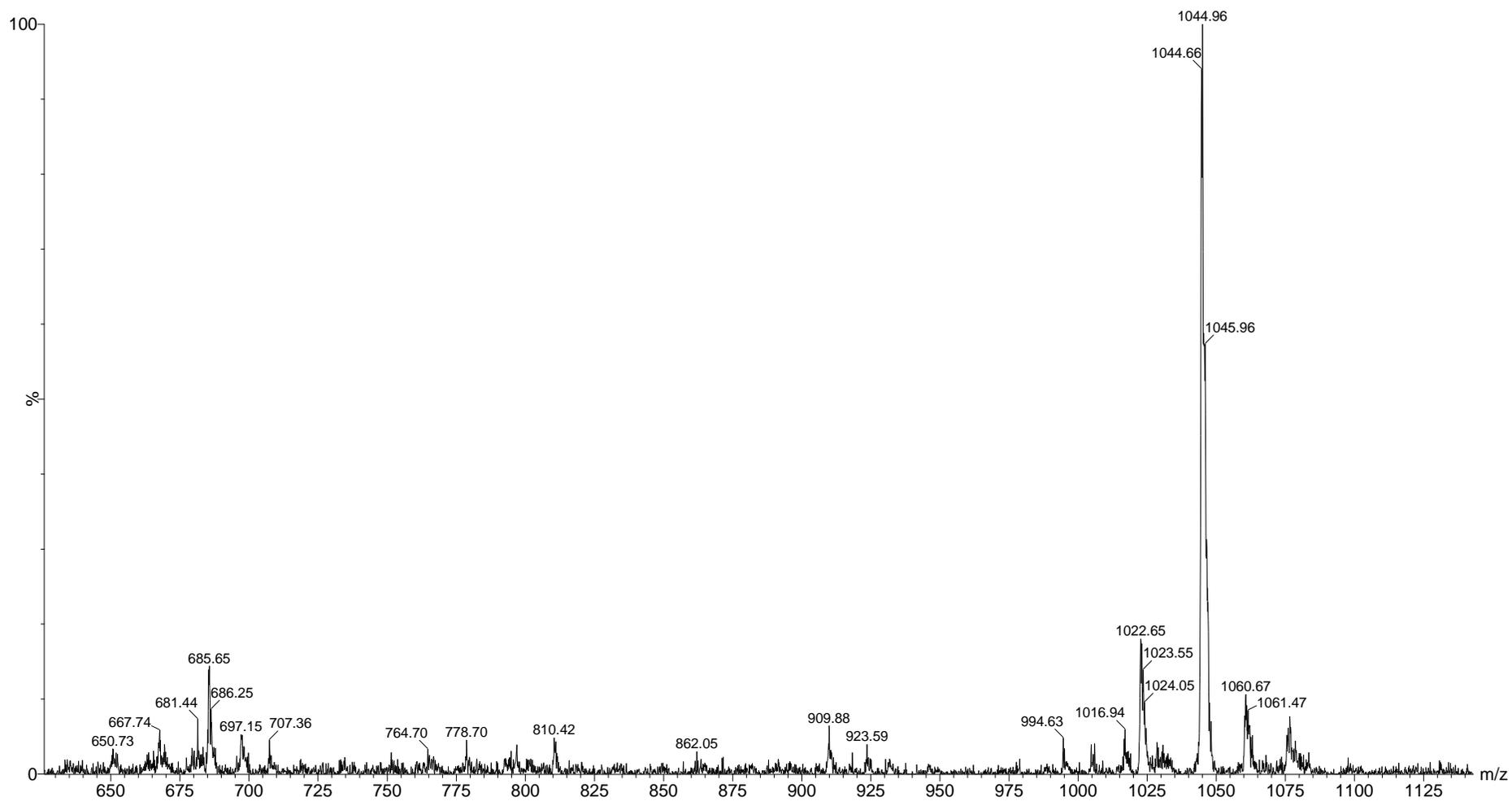
Fractionnement HPLC – Fraction 8 : MS partie 1

F8 VAL+ brute



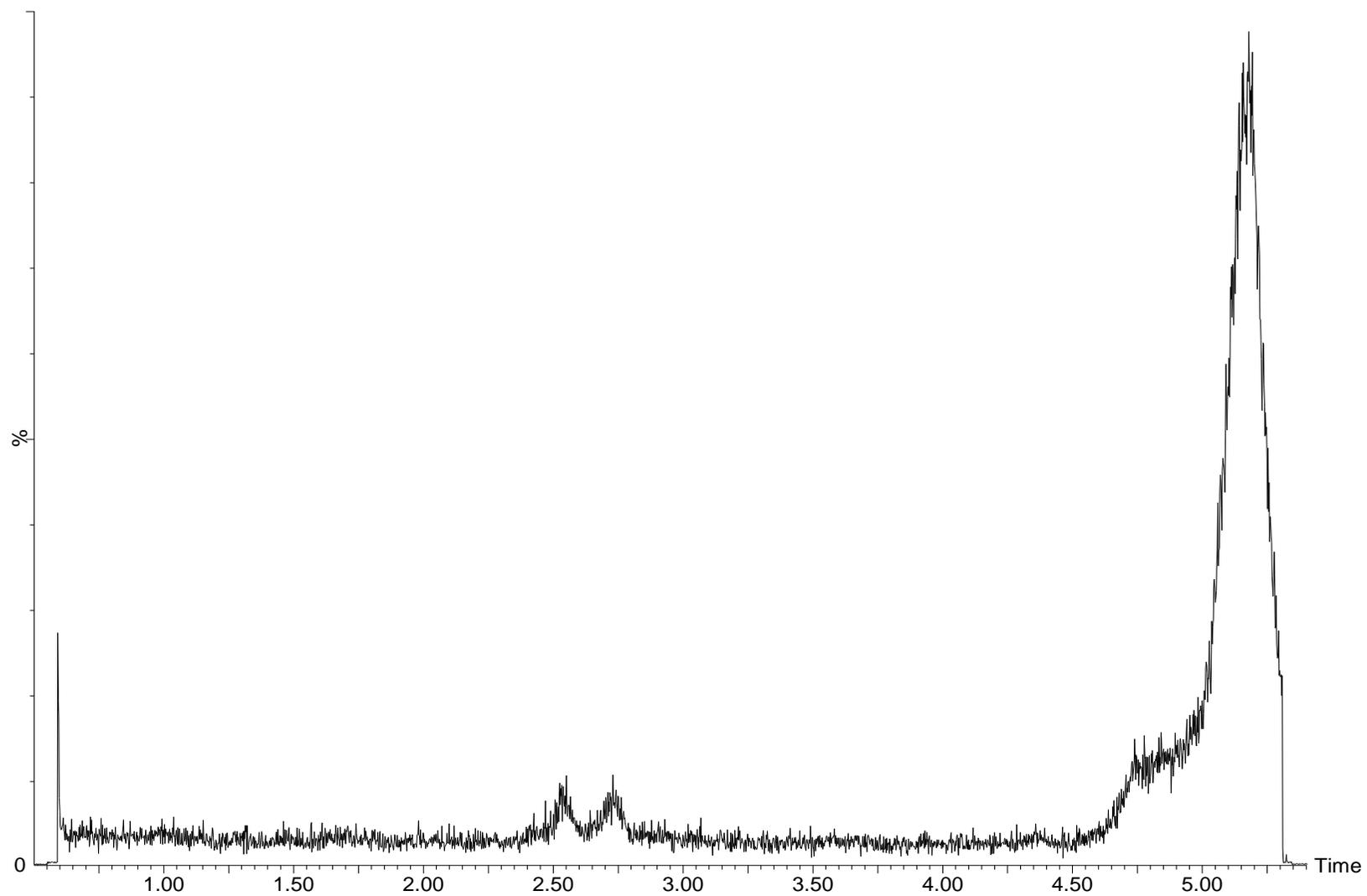
Fractionnement HPLC – Fraction 8 : MS partie 2

F8 VAL+ brute



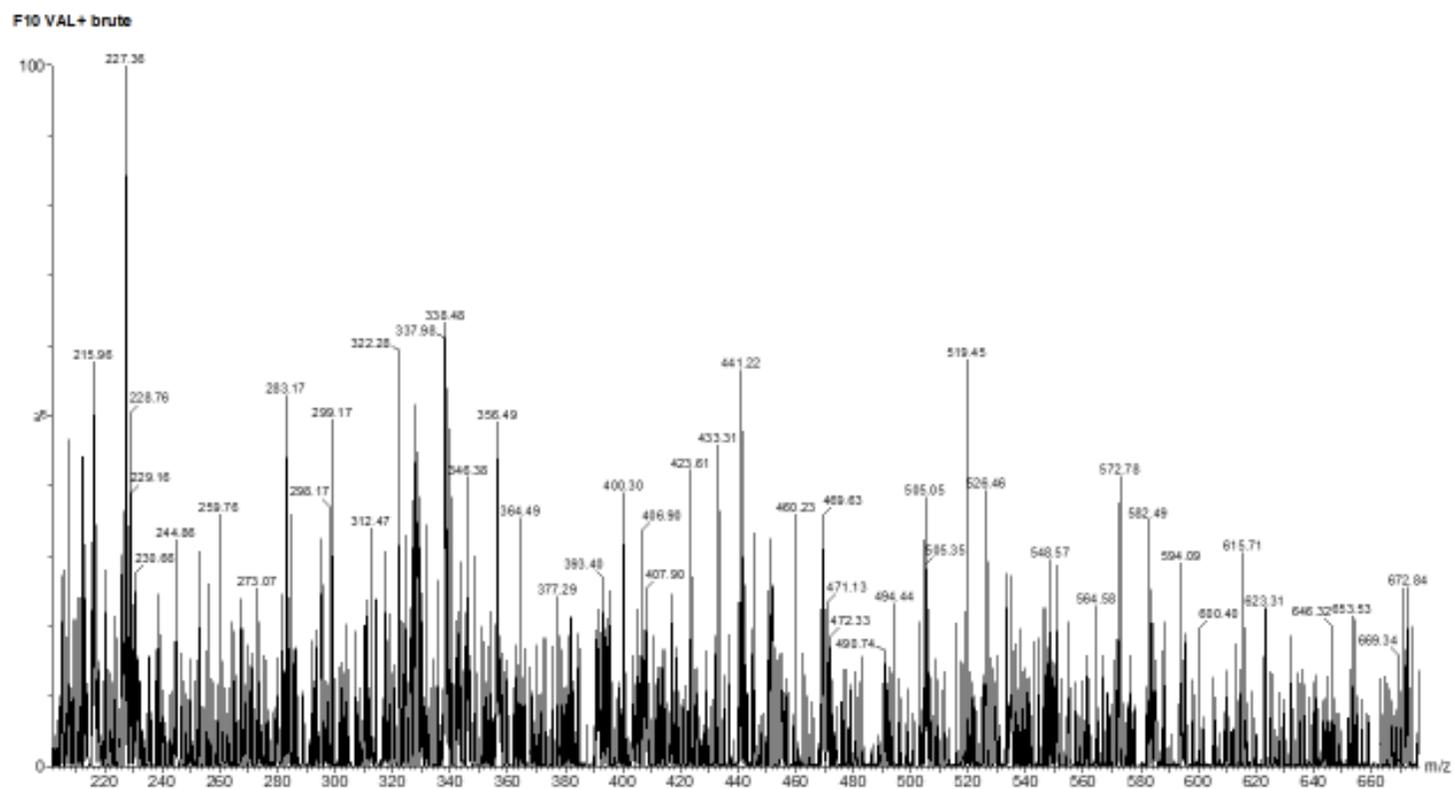
Fractionnement HPLC – Fraction 10 : Chromatogramme

F10 VAL+ brute



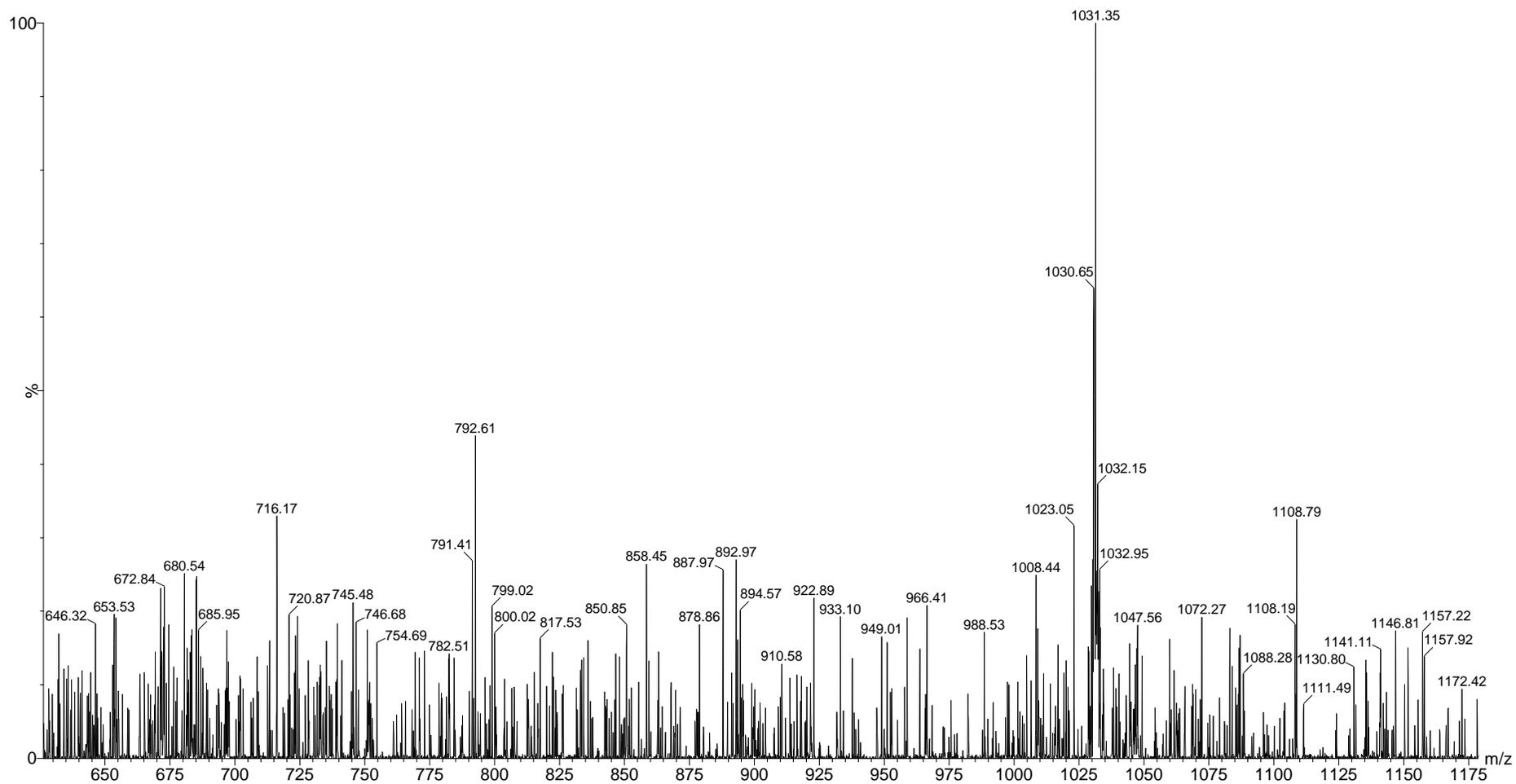
Fractionnement HPLC – Fraction 10 : MS 1^{er} pic, partie 1

Fraction 10 – Pic 1



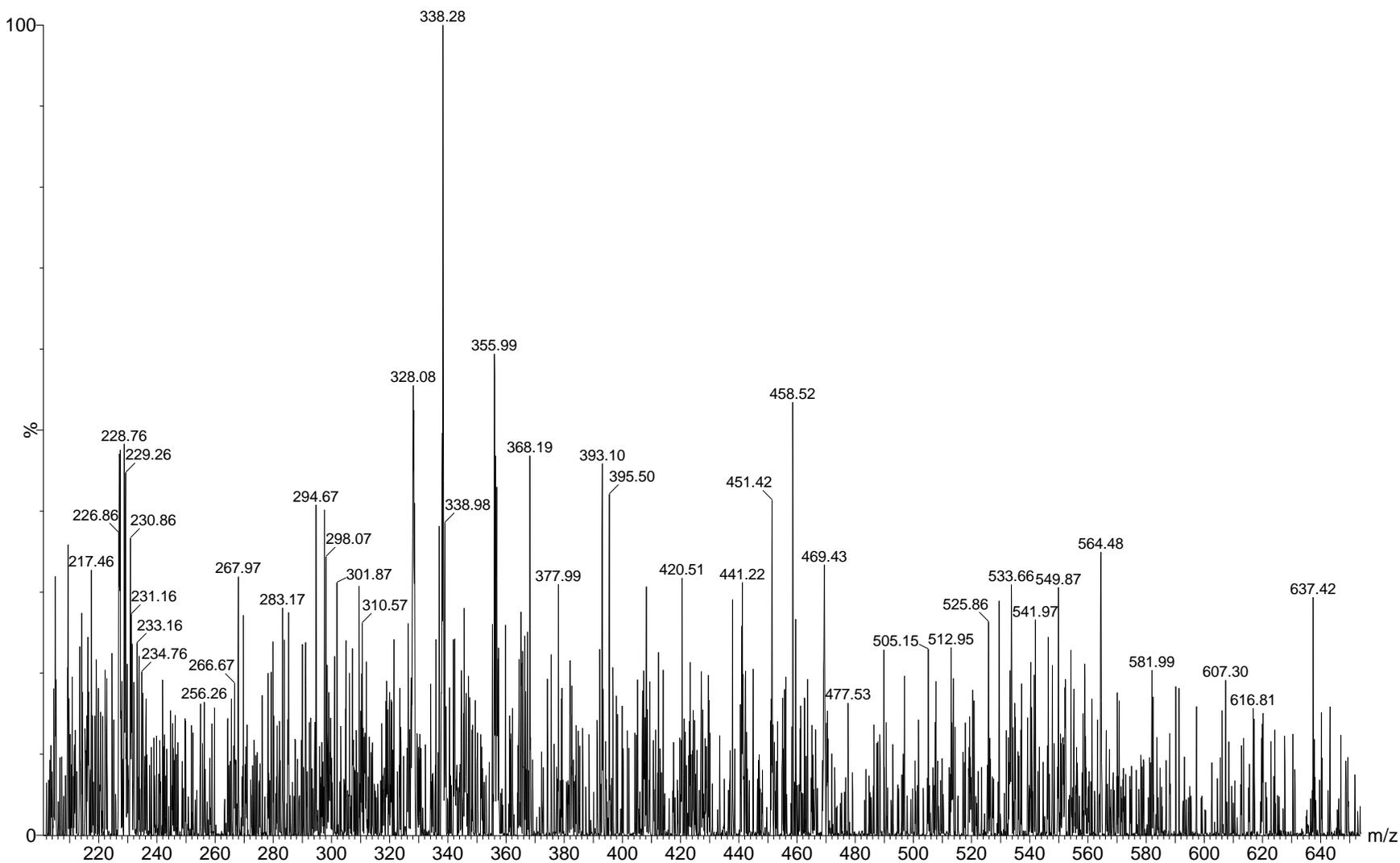
Fractionnement HPLC – Fraction 10 : MS 1^{er} pic, partie 2

F10 VAL+ brute



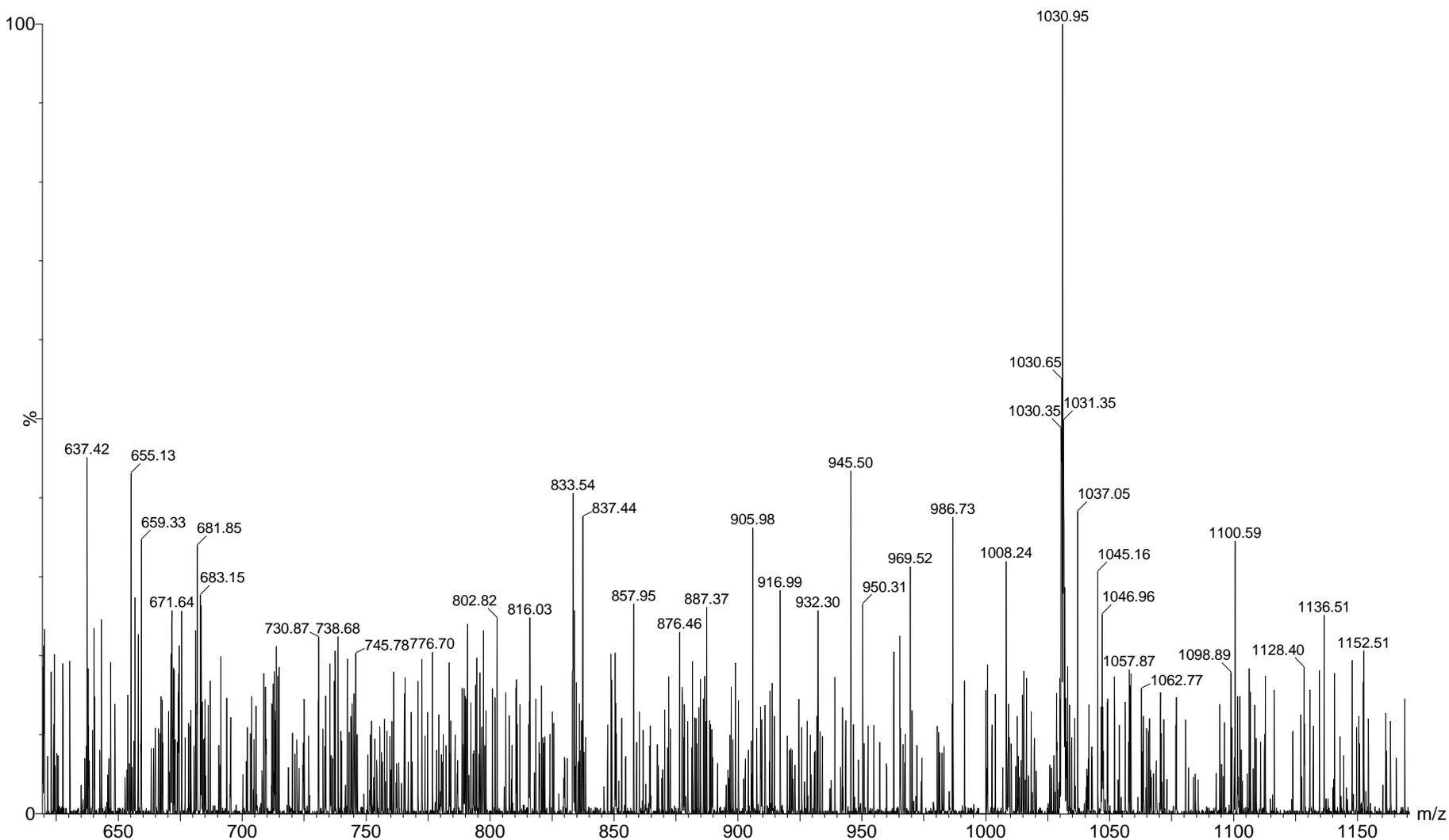
Fractionnement HPLC – Fraction 10 : MS 2nd pic, partie 1

F10 VAL+ brute



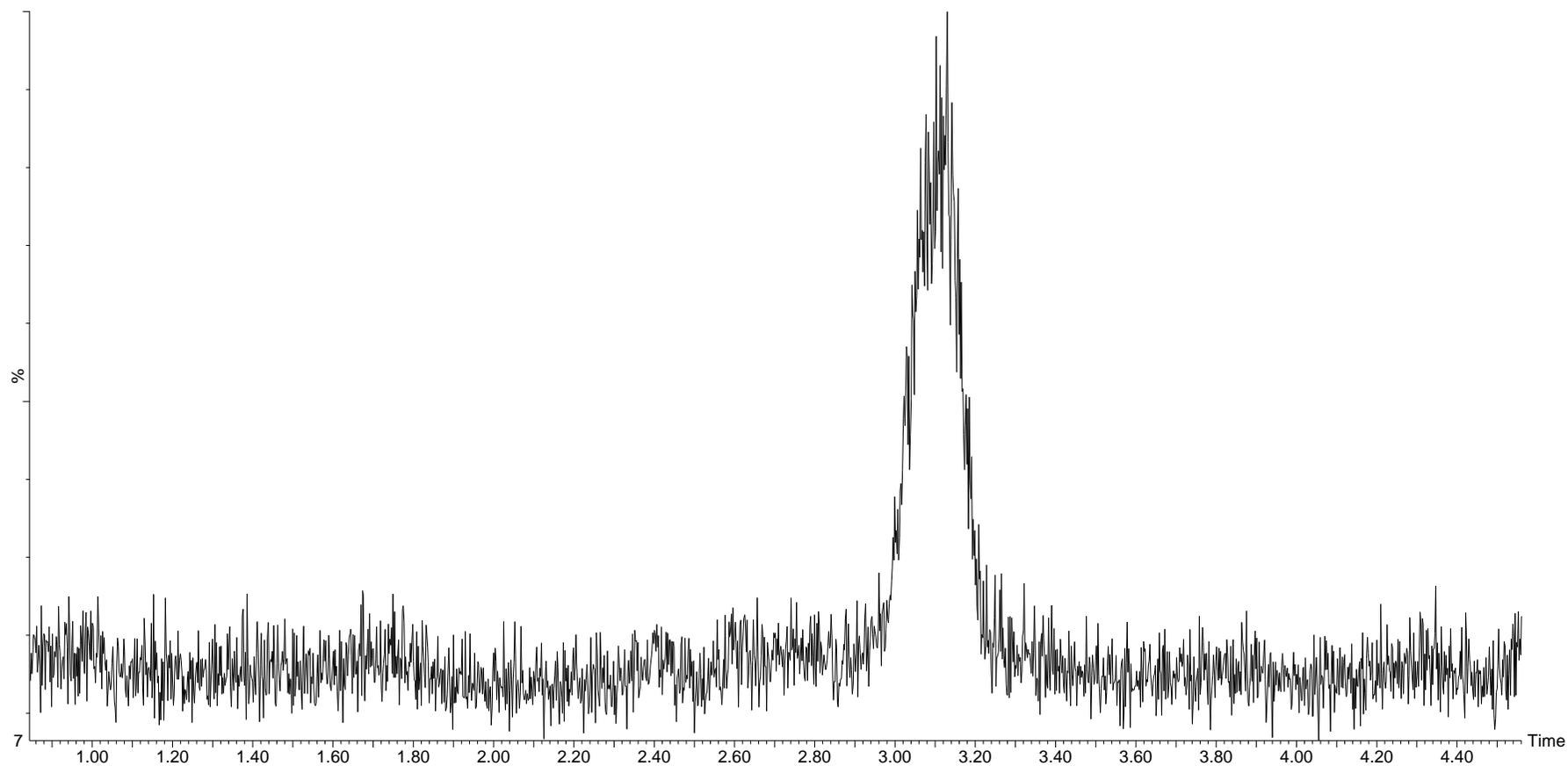
Fractionnement HPLC – Fraction 10 : MS 2nd pic, partie 2

F10 VAL+ brute



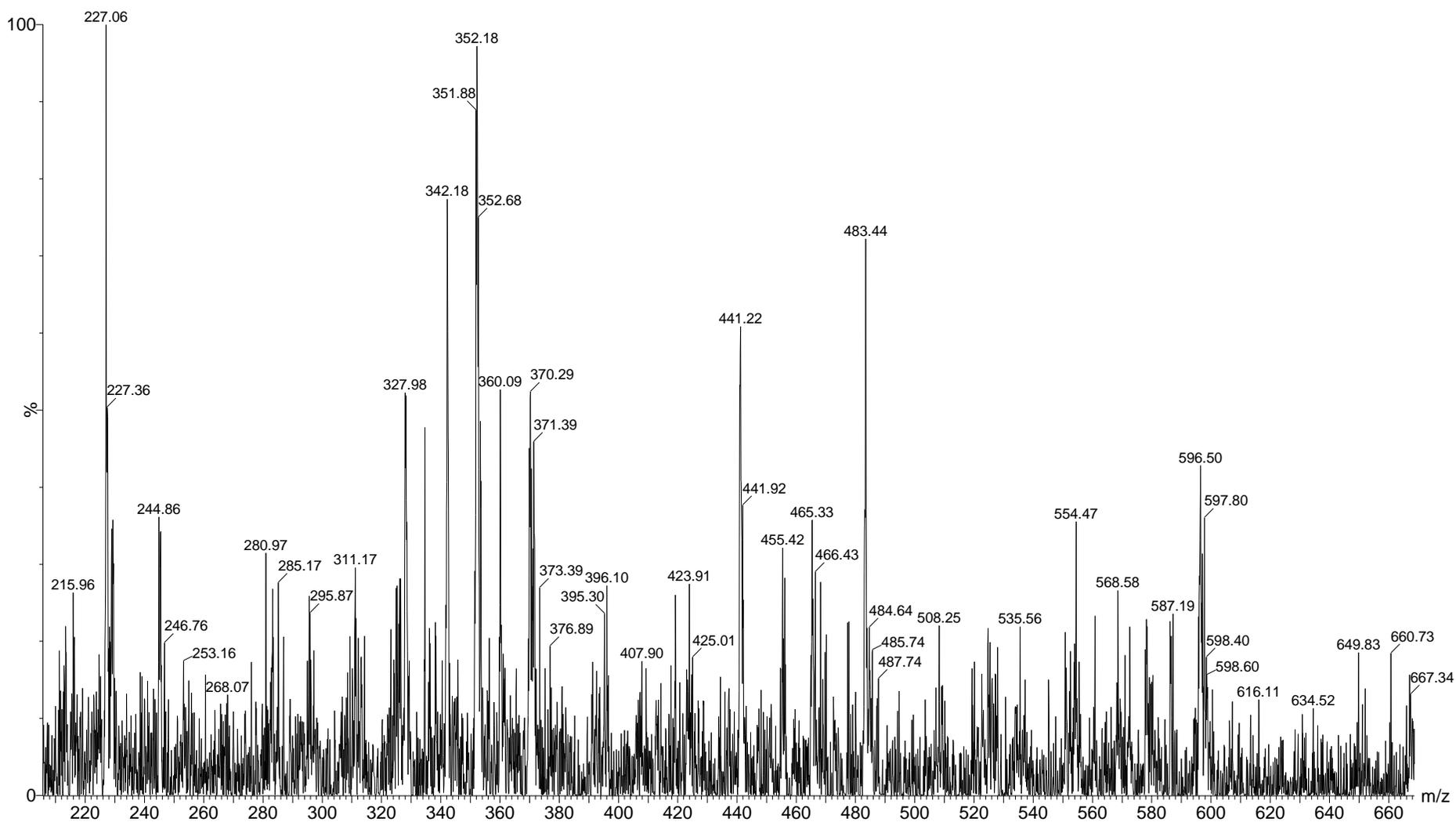
Fractionnement HPLC – Fraction 12 : Chromatogramme

F12 VAL+ brute



Fractionnement HPLC – Fraction 12 : MS, partie 1

F12 VAL+ brute



Fractionnement HPLC – Fraction 12 : MS, partie 2

F12 VAL+ brute

