

## **Effet de la pectine et des pectate lyases sur la colonisation racinaire et la production de surfactine par bacillus velezensis**

**Auteur :** Boubsi, Farah

**Promoteur(s) :** Ongena, Marc

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

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

**Année académique :** 2018-2019

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/7996>

---

### *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.*

---

**EFFET DE LA PECTINE ET DES PECTATE  
LYASES SUR LA COLONISATION  
RACINAIRE ET LA PRODUCTION DE  
SURFACTINE PAR *BACILLUS VELEZENSIS***

**FARAH BOUBSI**

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

**ANNEE ACADEMIQUE 2018-2019**

**PROMOTEUR : MARC ONGENA**

**SUPERVISEUR : GREGORY HOFF**

*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 académique de Gembloux Agro-Bio Tech.*

*Le présent document n'engage que son auteur.*

**EFFET DE LA PECTINE ET DES PECTATE  
LYASES SUR LA COLONISATION  
RACINAIRE ET LA PRODUCTION DE  
SURFACTINE PAR *BACILLUS VELEZENSIS***

**FARAH BOUBSI**

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

**ANNEE ACADEMIQUE 2018-2019**

**PROMOTEUR : MARC ONGENA**

**SUPERVISEUR : GREGORY HOFF**

# RESUMÉ

---

Les PGPRs sont des bactéries bénéfiques du sol capables de protéger leur hôte contre les attaques de pathogènes. *B. velezensis* est l'un des PGPRs les plus étudiés et valorisés en tant qu'agent de biocontrôle. En effet, il se démarque de par son potentiel de sécrétion d'un large éventail de métabolites secondaires bioactifs spécialisés et fonctionnels, comprenant les lipopeptides cycliques non ribosomiques et les polycétides. Cependant, l'efficacité avec laquelle cet arsenal est effectivement produit dans des conditions naturelles (*i.e.* dans la rhizosphère) est encore mal connue. Il est donc essentiel d'améliorer nos connaissances en la matière pour mieux comprendre le fitness écologique de cette espèce et son potentiel en tant qu'agent de biocontrôle, ce dernier nécessitant d'être amélioré en terme d'efficacité d'un point de vue pratique. Dans ce contexte, le dialogue moléculaire entre le PGPR et les racines de la plante hôte est un élément clé des interactions multitrophiques se déroulant dans la rhizosphère, raison pour laquelle l'objectif général du laboratoire MiPI est d'approfondir la compréhension de ce dernier.

Le présent travail se focalise sur une nouvelle facette de cette interaction, à savoir la stimulation de la production de surfactine (qui est un lipopeptide cyclique multifonctionnel) chez *B. velezensis* suite à la perception des polymères de pectines de la paroi cellulaire végétale. Les résultats obtenus montrent d'une part que seul un certain fragment spécifique du squelette d'homogalacturonane de ces polymères complexes s'avère être responsable de cette production anticipée de surfactine. En effet, les homogalacturonanes faiblement ou hautement méthylés caractérisés par un degré de polymérisation élevé, se sont montrés particulièrement actifs dans l'induction de la synthèse de surfactine comparé aux monomères et oligomères d'acide galacturonique. Ce phénomène a également été confirmé au niveau transcriptionnel en évaluant le niveau d'expression du gène *surfAA*. Ainsi, les homogalacturonanes présentant un haut degré de polymérisation agiraient comme molécules signales responsables de la production anticipée de surfactine, qui en retour induit une amélioration de la colonisation des racines par *B. velezensis*.

D'autre part, des gènes codants pour des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire ont été identifiés dans le génome de *B. velezensis*. Deux d'entre eux seraient potentiellement impliquées dans la synthèse d'enzymes de dégradation de la pectine (pectate lyases PelA et PelB). Par conséquent, le second objectif de ce travail a été d'évaluer l'implication de ces gènes dans la faculté de colonisation des racines par la bactérie et dans la perception des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale. Les résultats suggèrent que les produits de dégradation des pectines par les enzymes PelA et PelB ne seraient pas utilisés par *B. velezensis* GA1 comme source de carbone pour générer de la biomasse, mais plutôt comme signal induisant la production de surfactine, étant donné que la souche sauvage, encore capable de dégrader les pectines s'est montrée plus compétitive dans la colonisation racinaire comparé au double mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$ .

Ces résultats ouvrent la porte à une étude plus approfondie des fonctionnalités de ces deux enzymes d'intérêt, notamment concernant le rôle de leurs produits de dégradation en tant que signaux déclencheurs de la synthèse de métabolites secondaires chez la bactérie ou comme éliciteurs de la réponse immunitaire de la plante hôte, ce qui s'avère bénéfique pour cette dernière afin de lutter contre l'invasion de ses racines par les agents phytopathogènes.

**Mots clés :** *B. velezensis*, surfactine, pectine, pectate lyases, homogalacturonane, colonisation racinaire

# ABSTRACT

---

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) are capable of protecting their host from pathogen attack. *B. velezensis* is one of the most studied and valorised PGPR as a biocontrol agent and this correlates with its potential to secrete a wide range of chemically diverse and functionally specialized Bioactive Secondary Metabolites (BSM) including non-ribosomal cyclic lipopeptides (CLP) and polyketides. However, how efficiently this arsenal is actually produced under natural conditions such as the competitive rhizosphere niche is still poorly known. Improving our knowledge is crucial to better understand the ecological fitness of this species and inherently its biocontrol potential that needs to be improved in terms of consistency and efficacy from a practical point of view. In that context, cross-talk with the host plant at the root level is of course a key component of the multitrophic interactions occurring in the rhizosphere and the general objective of MiPI research group is to further investigate this molecular dialogue.

This work was focused on a new facet of this interaction, which is the stimulation of surfactin (a multifunctional cyclic lipopeptide) production by *B. velezensis* upon perception of pectic cell wall polymers (CWP). Our results first show that only a certain specific fragment of the homogalacturonan backbone of this CWP was found to be responsible of such anticipated surfactin production. Homogalacturonan low or highly methylated but characterized by a high degree of polymerization, was particularly active at triggering surfactin synthesis compared to galacturonic acid monomers and oligomers. This phenomenon was confirmed at the transcriptional level by evaluating the expression of *surfAA* gene. High DP (Degree of Polymerization) homogalacturonan would therefore act as a signalling molecule responsible for the anticipated surfactin production, which in turn induces an improvement of root colonization by *B. velezensis*.

On another hand, genes coding for CWP degrading enzymes were identified in *B. velezensis* genome, including two that are potentially involved in the synthesis of pectin degrading enzymes (PelA and PelB pectate lyases). Therefore, another objective of this work was to assess the involvement of these genes in root colonization, and in the perception of CWP. Our results suggest that the products of pectin degradation by PelA and PelB are not likely to be used as a carbon source for growth by strain GA1 but maybe as a signal inducing surfactin production since the wild type strain, still capable to degrade pectin, was more competitive in root colonization compared to the mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$ . Our work opens the door for further investigations on the functionality of these two interesting enzymes and on the role of their degradation products as triggers of BSM production by the bacterium or as elicitors of immune responses in the host plant itself which is of clear benefit for resistance toward pathogen invasion of root tissues.

Key words: *B. velezensis*, surfactin, pectin, pectate lyases, homogalacturonan, root colonization

# REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord je tiens à remercier chaleureusement mon promoteur de TFE, Monsieur Marc Ongena pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci pour votre aide, vos conseils et votre positive attitude, même durant les réunions de crise.

Ce travail n'aurait pas été pareil sans l'encadrement de Grégory (*alias* l'homme pour qui tout a le mérite d'exister). Je tiens à te remercier de m'avoir intégrée à ton projet de recherche. Merci également pour tes précieux conseils, ta joie de vivre, ta patience ainsi que tes nombreux encouragements tout au long de la réalisation de ce travail. Ça a été un réel plaisir de travailler à tes côtés !

Je tiens également à remercier Monsieur Olivier Van Wuytswinkel, Professeur à l'Université Jules Verne d'Amiens de nous avoir fourni le matériel végétal nécessaire à l'élaboration de ce TFE et d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci à Sébastien pour ta disponibilité, ton sens de l'humour ainsi que pour tes encouragements durant les périodes difficiles.

Merci à Adrien, Anthony, Thibault, Imen, Hosni, Sofija, Jelena, Andrew, Dingrong... pour la bonne ambiance que vous instaurez au labo.

Merci également à mes compagnons de galère : Damien, Clémence, Augustin, Paapa, Germain, Hélène, François, et j'en passe... On a quand même eu de bons délires durant ces six mois !

Enfin, je souhaite remercier profondément ma mère, mon père et mon frère pour leur indispensable soutien tout au long de mes études. Ces quelques mots ne suffisent pas pour exprimer à quel point je vous suis reconnaissante.

# TABLE DES MATIERES

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

1	REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
1.1	LA RHIZOSPHERE.....	1
1.1.1	Généralités.....	1
1.1.2	Rôle des racines.....	2
1.1.3	Microflore.....	4
1.2	LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE .....	4
1.2.1	Structure .....	4
1.2.2	Composition en polysaccharides .....	6
1.2.3	Dégradation enzymatique de la paroi cellulaire végétal.....	10
1.2.4	Rôle des polysaccharides de la paroi dans l'immunité des plantes .....	14
1.3	LE BIOCONTROLE.....	16
1.3.1	Définition.....	16
1.3.2	Principales caractéristiques des PGPRs.....	17
1.4	<i>BACILLUS VELEZENSIS</i> .....	18
1.4.1	Taxonomie.....	18
1.4.2	Caractéristiques .....	18
1.4.3	Les lipopeptides.....	20
1.4.4	Enzymes de dégradation de la paroi végétale.....	25
1.5	OBJECTIFS.....	26

## CHAPITRE II: MATERIEL & METHODES

1	CONSTRUCTION DES SOUCHES MUTANTES.....	28
1.1	CONSTRUCTION DE LA CASSETTE DE REMPLACEMENT .....	28
1.1.1	Etapes PCR.....	28
1.1.2	Vérification des produits PCR.....	30
1.2	TRANSFORMATION BACTERIENNE .....	30
1.3	SELECTION ET VERIFICATION DES TRANSFORMANTS .....	31
2	SUIVIS DE CULTURE .....	31
2.1	CULTURES LIQUIDES .....	31
2.2	ANALYSES EN CYTOMETRIE EN FLUX .....	32
2.3	ANALYSE UPLC-MS DES SURNAGEANTS DE CULTURE.....	32
2.4	ANALYSE RT-qPCR .....	33
2.4.1	Extraction des ARNs .....	33



2.4.2	Evaluation de l'expression relative des gènes d'intérêt.....	33
2.5	EVALUATION DE L'ACTIVITE TOTALE DES PECTATE LYASES .....	34
3	TEST DE COLONISATION <i>in planta</i> .....	35
3.1	PREPARATION DES PLANTULES DE TOMATE .....	35
3.2	INOCULATION DES PLANTULES DE TOMATE .....	35
3.3	EVALUATION DE LA COLONISATION.....	35
3.4	DOSAGE DE LA SURFACTINE SUR MILIEU SOLIDE.....	35
CHAPITRE III: RESULTATS & DISCUSSION		
1	EFFET DE LA PECTINE SUR L'APTITUDE A LA COLONISATION DES RACINES.....	36
1.1	VALIDATION DES MUTANTS $\Delta pelA$ , $\Delta pelB$ , $\Delta pelA\Delta pelB$ .....	36
1.2	TEST DE COLONISATION <i>in planta</i> .....	37
1.2.1	Test de colonisation individuelle.....	37
1.2.2	Test de colonisation en compétition .....	39
1.3	EVOLUTION DE LA CROISSANCE DE <i>B. VELEZENSIS</i> GA1 EN PRESENCE DE FRAGMENTS DE PECTINE.....	40
1.3.1	Evaluation de la viabilité des cellules et de leur activité métabolique entre 24h et 48h	43
1.3.2	Evaluation du niveau d'expression des gènes <i>pelA</i> et <i>pleB</i> .....	46
1.3.3	Evaluation de l'activité totale des pectate lyases.....	48
1.4	EVOLUTION DE LA CROISSANCE DU DOUBLE MUTANT EN PRESENCE DE POLYMERS PURS DE PECTINE .....	50
2	UTILISATION DE LA PECTINE EN TANT QU'INDUCTEUR DE LA PRODUCTION DE SURFACTINE .....	52
2.1	EVALUATION DE LA PRODUCTION DE SURFACTINE <i>in planta</i> .....	52
2.2	EVALUATION DE L'INDUCTION DE PRODUCTION DE SURFACTINE PAR <i>B.</i> <i>VELEZENSIS</i> GA1 EN PRESENCE DE FRGMENTS DE PECTINE.....	53
CONCLUSION & PERSPECTIVES..... ;;;		56
BIBLIOGRAPHIE.....		59
ANNEXE.....		68

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

A : domaine d'adénylation  
aa : acide aminé  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN: acide ribonucléique  
Bp : base paire  
C : domaine de condensation  
CAZy: carbohydrate-active enzymes  
DAMPs : damage associated molecular patterns  
DO : densité optique  
ESI: electrospray ionization  
ETI: effector-Triggered Immunity  
ETS : effector-Triggered Susceptibility  
GA: galacturonic acid  
GHM: galacturonate high methylated  
GLM : galacturonate low methylated  
LAR : Local Acquired Resistance  
LB : lysogeny broth  
MAMPs: microbe associated molecular patters  
MMG : minimum medium glutamate  
NBS-LRR: nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat  
NRPS: non-Ribosomal Peptides Synthase  
PAE : pectine Acetylestérase  
PAMPs : pathogen associated molecular patterns  
PBS : phosphate buffered saline  
PCP : peptidyl carrier protein  
PCR : polymerisation chain reaction  
PG : polygalacturonase  
PGA; polygalacturonic acids  
PGPR: plant growing promoting rhizobacteria  
PI : propidium iodide  
PME : pectine méthylestérase  
PTI: PAMP-triggered immunity  
RE : recomposed exsudates  
RLK: receptor-like kinase  
RPM : revolution par minute  
RSG : redox sensor green  
RT-qPCR: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
SAR : systemic Acquired Resistance  
T : domaine de thyolation  
TAE : tris-acétate EDTA  
TE : domaine thyoestérase  
Tm : melting temperature  
UPLC-MS : ultra high pressure liquid chromatography-mass spectrometry  
UV : ultra violet

# CHAPITRE I : INTRODUCTION

---

## 1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 LA RHIZOSPHERE

#### 1.1.1 Généralités

La rhizosphère peut être définie comme « *la région du sol où les racines des plantes, le sol et son microbiote entrent en interaction les uns avec les autres* » (Lynch & Leij, 2012). Bien que cette portion de sol se doit d'être considérée comme continue, elle est généralement scindée en trois régions (**Figure 1**) : l'ectorrhizosphère définie comme la surface de sol entourant directement les racines), le rhizoplan qui est la surface même des racines, comprenant donc l'épiderme et les mucilages et l'endorrhizosphère englobant les différentes couches cellulaires des racines, de l'endoderme jusqu'au cortex (Fageria & Stone, 2006). L'étendue de cette portion de sol dépend de la morphologie et de la physiologie des racines mais aussi des propriétés intrinsèques du sol considéré telles que sa granulométrie, sa porosité ou encore son pH (Neumann & Römheld, 2011).

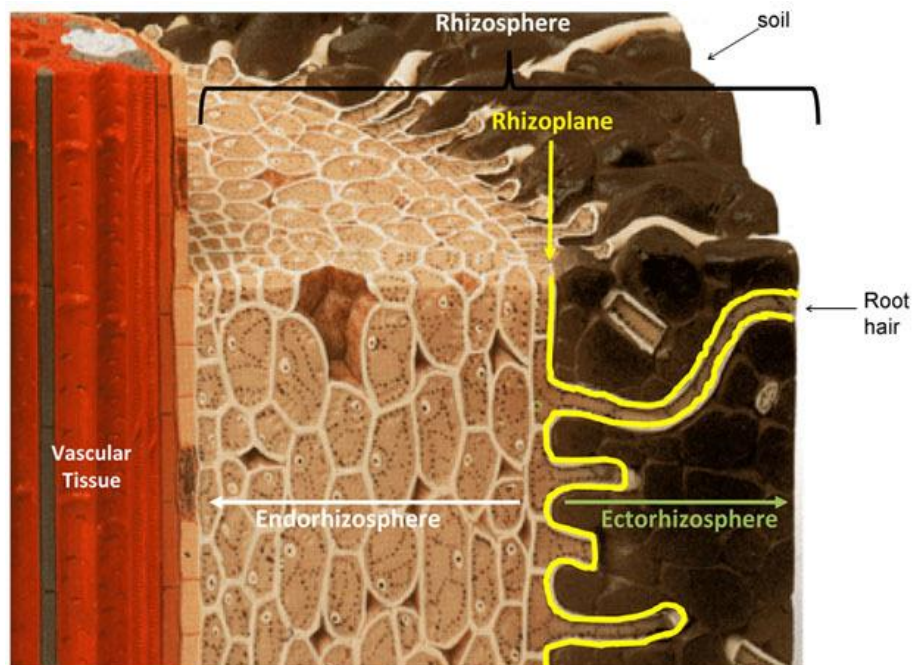


Figure 1. Section transversale d'une racine montrant les délimitations entre l'endorrhizosphère (blanc), le rhizoplan (jaune) et l'ectorrhizosphère (vert). Ces trois zones réunies constituent la rhizosphère proprement dite (McNear, 2013).

### 1.1.2 Rôle des racines

Les racines des plantes jouent un rôle majeur dans la structure physico-chimique du sol mais également dans l'activité biologique se développant au sein de la rhizosphère. En effet, les systèmes racinaires des végétaux ont une influence sur la taille et le nombre de macropores présents dans le sol, ces deux paramètres permettant d'y augmenter l'oxygénation et d'y faciliter le mouvement de l'eau (Angers & Caron, 1998). A côté de cela, elles assurent également la formation d'agrégats stables, évitant ainsi la compaction du sol et l'imperméabilisation de sa surface (Vergani & Graf, 2016).

D'un point de vue chimique, les racines sont responsables du développement de différents gradients radiaux et longitudinaux au cœur de la rhizosphère. Ceux-ci sont causés par les échanges de gaz, d'eau, de composés organiques et de nutriments se déroulant entre le système racinaire de la plante et son milieu environnant (Neumann & Römheld, 2011). L'affinité des composés organiques et des nutriments pour la matrice du sol, ainsi que les propriétés mêmes du sol régissent leur distance de diffusion dans la rhizosphère. Ainsi les composés tels que les sucres non chargés de faible poids moléculaire et les acides aminés présentent une distance de migration radiale pouvant s'étendre sur plusieurs millimètres (Jones *et al.*, 1994). A contrario, les composés ayant une affinité pour les sites de sorption chargés positivement présents dans la matrice du sol tels que le malate, le citrate, l'oxalate ou encore les acides polygalacturoniques et les composés phénoliques sont essentiellement retrouvés au niveau de la partie de sol directement en contact avec la surface externe des racines (Jones *et al.*, 2003, Neumann & Römheld, 2011).

Tout comme les composés organiques, les nutriments présentent également des distances de diffusion différentes qui dépendent de leur solubilité, de leur mobilité et de leur niveau d'absorption par les racines (Marschner, 2011). Par exemple, le potassium, le phosphore, l'ammonium, le fer, le manganèse, le zinc, le cuivre et le molybdène sont caractérisés par une faible mobilité dans le sol. Par conséquent, ils sont peu disponibles pour les plantes et les micro-organismes de la rhizosphère, contrairement au calcium et au magnésium qui sont des nutriments solubles et donc plus mobiles (Neumann & Römheld, 2011). L'absorption de nutriments par les racines implique généralement un échange de protons entre ces dernières et la rhizosphère, ce qui engendre des variations de pH pouvant être plus ou moins importantes selon la teneur en acide carbonique ( $H_2CO_3$ ) du sol (Haynes, 1990). Les échanges gazeux ( $CO_2/O_2$ ) entre les différents acteurs présents dans la rhizosphère et le  $CO_2$  en solution présent dans le sol ont également un impact sur le pH de cette portion de sol, les ions  $H^+$  et  $HCO_3^-$  générés par l'hydratation du  $CO_2$  étant caractérisés par une faible mobilité (Hinsinger *et al.*, 2003).

Les racines des plantes sont également responsables du relargage de rhizodépôts au sein de la rhizosphère (**Figure 2**). La quantité, la qualité ainsi que la composition de ces composés dépendent de facteurs environnementaux tels que le type de sol, son oxygénation et sa température ; le pH ; l'intensité

lumineuse ; la présence ou non de micro-organismes ainsi que la disponibilité en nutriments (Nguyen, 2009). Les rhizodépôts peuvent être scindées en deux catégories majeures : (i) celles libérées par des mécanismes de transport actif (sécrétions racinaires telles que des enzymes, des vitamines, des hormones, des mucilages) ou passif (exsudats racinaires comprenant des sucres simples, des acides organiques, des acides aminés et des composés phénoliques) et (ii) celles issues du renouvellement des cellules racinaires (Lynch & Leij, 2012).

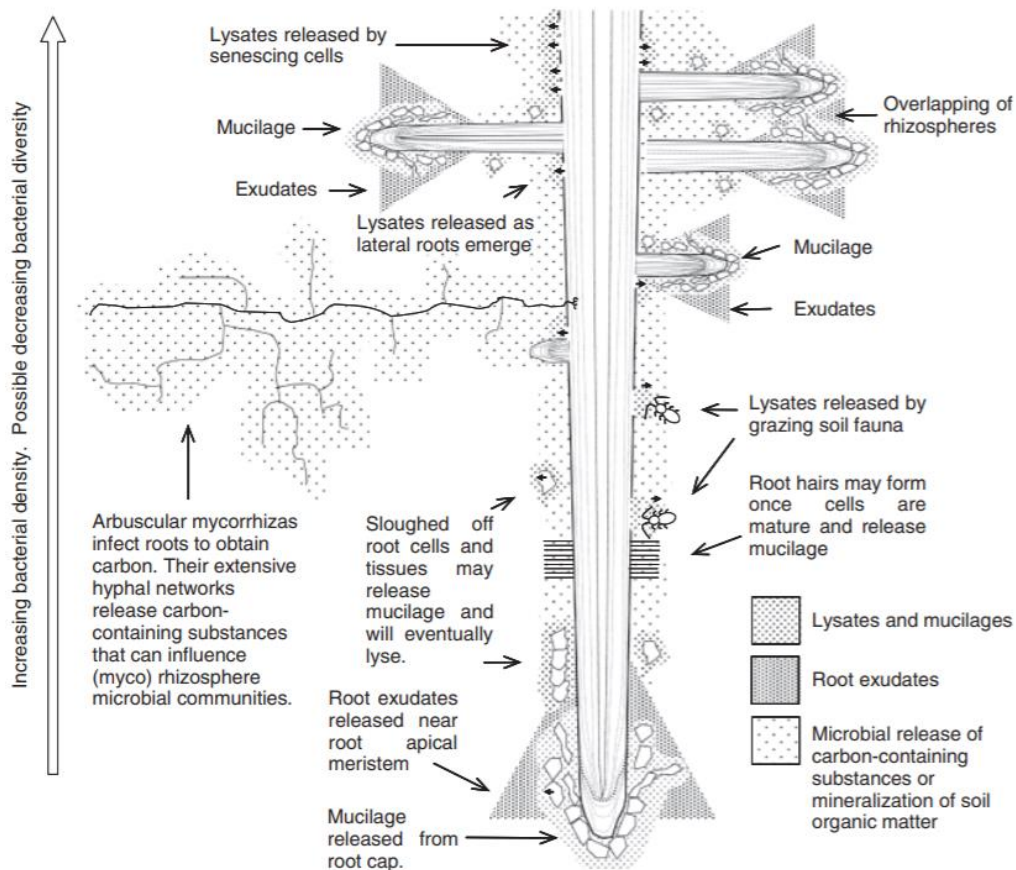


Figure 2. Origine des différents types de rhizodépôts relargués au sein de la rhizosphère (Dennis *et al.*, 2010). Les rhizodépôts retrouvés au niveau des apex sont essentiellement des mucilages, des exsudats et des cellules (lysées ou non) ou des tissus détachés. Au niveau des régions constituées de cellules ayant terminé leur développement, les rhizodépôts proviennent de la lyse des cellules, des mucilages et des tissus libérés lorsqu'une racine secondaire émerge. Les poils absorbants retrouvés au niveau de ces cellules sont également responsables du relargage de mucilages. La dégradation de la paroi végétale par la faune du sol génère également des lysats cellulaires.

Les exsudats racinaires, principalement constitués de composés solubles de faible poids moléculaire, représentent la principale source de nutriments pour les microorganismes de la rhizosphère et sont donc rapidement consommés (Jones *et al.*, 2005). Par conséquent, leur disponibilité diminue lorsque la distance par rapport à la surface des tissus racinaires augmente (Dennis *et al.*, 2010). Les microorganismes peuvent également se développer dans les mucilages qui sont des composés gélatineux constitués d'acides polygalacturoniques et de polysaccharides produits au niveau de la coiffe racinaire. La matrice gélatineuse alors formée de mucilages, de microorganismes et de colloïdes du sol est appelée

mucigel (Greaves & Darbyshire, 1972). Knee *et al.* (2001) ont pu constater que certains microorganismes comme *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia cepacia*, et *Pseudomonas fluorescens* sont capables d'utiliser les mucilages comme seule source de carbone, ce qui pourrait leur conférer un certain avantage dans la colonisation des racines.

### 1.1.3 Microflore

Le relargage de nombreux composés carbonés et azotés par les racines des plantes ainsi que leur effet sur l'aération du sol fait que la rhizosphère est une zone extrêmement propice au développement des microorganismes. En effet, les concentrations en bactéries qui y sont retrouvées sont au moins cent fois plus importantes que celles retrouvées dans le sol non rhizosphérique (Foster, 1988). Bien que les bactéries (pathogènes et non pathogènes) soient les microorganismes les plus présents dans la rhizosphère, la microflore qui s'y développe est particulièrement diversifiée et comprend également des champignons, des nématodes, des protozoaires, des algues et des microarthropodes (Raaijmakers *et al.*, 2009 ; Mendes *et al.*, 2013). Cette microflore joue notamment un rôle primordial dans la décomposition et la minéralisation des composés organiques via des réactions d'oxydo-réduction, de solubilisation ou encore de chélation (Marschner, 2011). Notons que l'activité qui se développe au sein de la rhizosphère est directement dépendante de la température, de la disponibilité en eau et en oxygène, du pH ainsi que de la structure du sol (Lynch & Leij, 2012).

## 1.2 LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE

### 1.2.1 Structure

La membrane plasmique des cellules végétales est entourée d'une épaisse paroi complexe semi-perméable. En plus de protéger les cellules, elle assure leur soutien structurel lors de leur croissance et est également impliquée au niveau des phénomènes de différenciation tissulaire, de communication intercellulaire ou encore de défense contre les pathogènes (Keegstra, 2010 ; Srivastava *et al.*, 2017). De manière générale, la paroi cellulaire primaire des dicotylédones contient environ 35% de pectines, 30% d'hémicelluloses, 30% de cellulose et 5% de glycoprotéines (Voragen *et al.*, 2009). La cellulose, organisée en microfibrilles cristallines est intégrée dans une matrice comprenant les hémicelluloses, les pectines, les protéines et autres polymères phénoliques ou aliphatiques (**Figure 3**). Notons que la composition de cette paroi, son épaisseur ainsi que l'orientation des microfibrilles de cellulose diffèrent selon l'espèce végétale, le tissu ainsi que le stade de développement de la plante (Srivastava *et al.*, 2017).

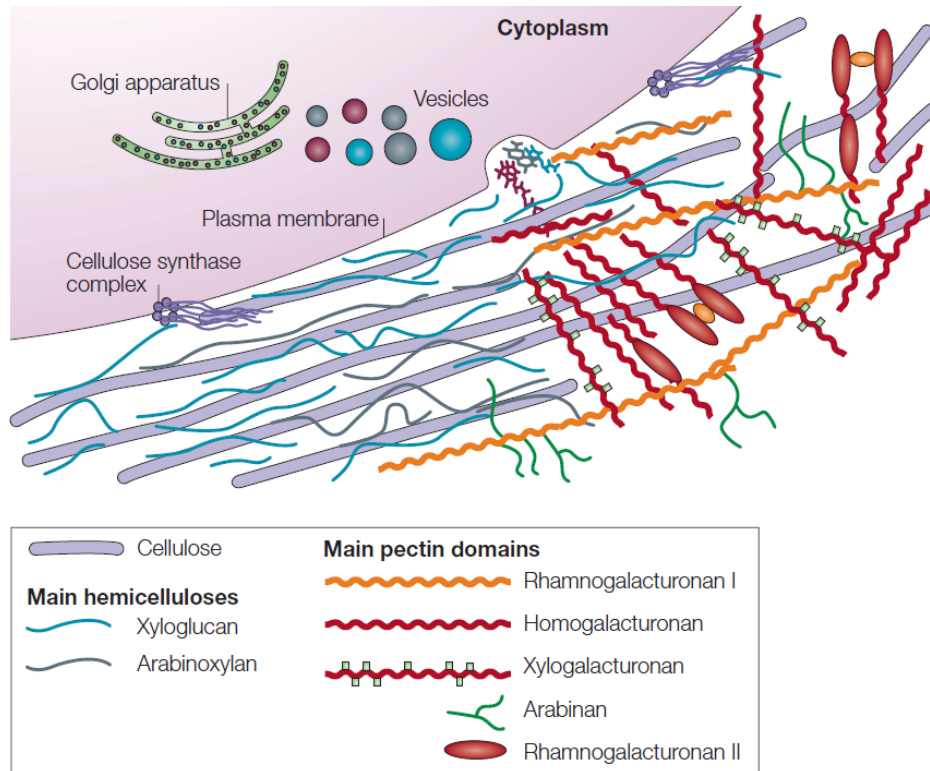


Figure 3. Représentation schématique de la paroi cellulaire végétale (Cosgrove, 2005)

Il est possible de distinguer la paroi cellulaire primaire de la paroi cellulaire secondaire. La paroi primaire entoure directement les cellules en phase de croissance. En fin de croissance, une paroi cellulaire secondaire se situant entre la membrane plasmique et la paroi primaire peut être synthétisée. Généralement, cette dernière n'est présente qu'au niveau des cellules étant soumises à des contraintes physiques importantes telles que les cellules conductrices du xylème transportant la sève brute (Cosgrove, 2005). La paroi secondaire est donc un tissu peu flexible qui présente une importante teneur en cellulose et ce, au détriment des pectines et des hémicelluloses majoritairement présentes dans la paroi primaire. La structure peut également être renforcée grâce à la présence de lignine (Barros *et al.*, 2015). Pour ce qui est de la cohésion entre les cellules, elle est rendue possible grâce à la lamelle mitoyenne située juste au-dessus de la paroi primaire, comportant une haute teneur en pectines acides capables de former des gels (Srivastava *et al.*, 2017). La paroi primaire représente donc la matrice polymérique exposée à la surface des cellules végétales et donc potentiellement impliquée dans les mécanismes d'interactions moléculaires avec les autres organismes.

## 1.2.2 Composition en polysaccharides

### 1.2.2.1 La cellulose

La cellulose est un polymère linéaire constitué de molécules de D-glucose reliées de façon covalente par une liaison  $\beta$ -1,4 osidique. La biosynthèse de la cellulose est initiée à la surface de la membrane plasmique, au niveau d'un complexe de 36 celluloses synthases adoptant une structure de rosette (Guerriero *et al.*, 2010 ; Cosgrove, 2005). Les molécules de cellulose sont ensuite liées entre elles de façon parallèle par des forces de van der Waals et des ponts hydrogènes pour former une structure cristalline rigide portant le nom de microfibrille (Teeri, 1997). Les structures microscopique et macroscopique de la cellulose sont présentées à la **Figure 4**.

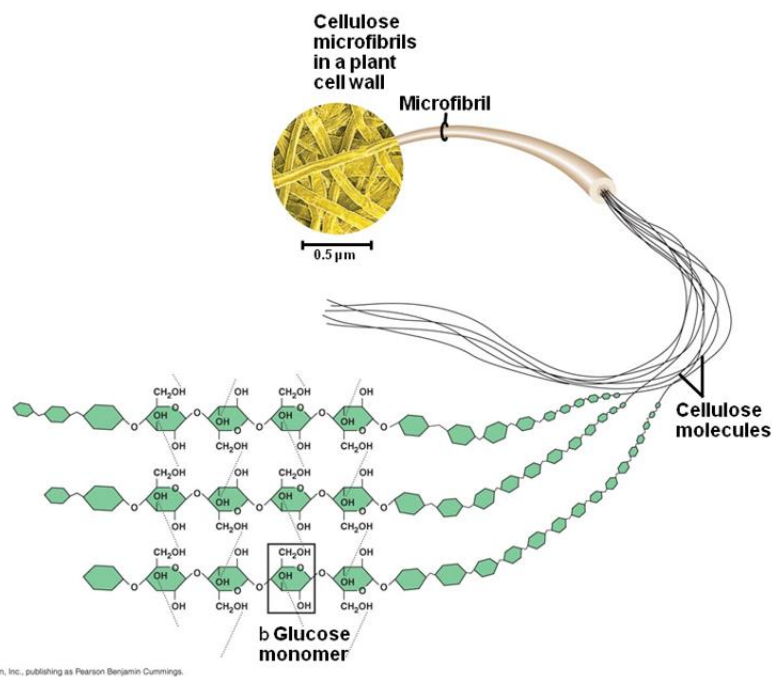


Figure 4. Structures microscopique et macroscopique de la cellulose présente dans la paroi cellulaire végétale (adapté de Campbell *et al.*, 2008)

Au sein de la paroi cellulaire végétale, les microfibrilles peuvent s'associer avec des lignines ou encore des hémicelluloses et former des structures plus complexes via la formation de ponts hydrogènes (Atalla *et al.*, 1993). Ce type d'association confère à la cellulose une rigidité supplémentaire, rendant sa biodégradation plus compliquée (Pérez *et al.*, 2002). Ainsi, ce sont majoritairement les domaines cristallins amorphes des microfibrilles de cellulose qui sont les plus sensibles à l'hydrolyse chimique ou biologique auxquelles elles peuvent être confrontées (Béguin & Aubert, 1994).



### 1.2.2.2 *Les hémicelluloses*

Les hémicelluloses regroupent tous les polysaccharides complexes solubles dans des solutions alcalines et insolubles dans l'eau (Holtzapfle, 2003 ; Srivastava *et al.*, 2017). Ces biopolymères hétérogènes sont composés de différents monomères de sucres acides (D-acide galacturonique, D-acide glucuronique, acide 4-O-méthyl-glucuronique), pentamériques (xylose ou arabinose) ou encore hexamériques (glucose, galactose, mannose) généralement reliés par une liaison osidique  $\beta$ -1,4 ou plus rarement  $\beta$ -1,3 (Pérez *et al.*, 2002). Les hémicelluloses peuvent être scindées en quatre familles (Scheller & Ulvskov, 2010 ; Wertz, 2011) :

- Les **xylanes**, constitués d'un squelette de  $\beta$ -1,4 xylose auquel sont greffés :
  - Aucun groupement  $\rightarrow$  *homoxylanes non substitués*
  - Des molécules d'acide galacturonique ou d'acide 4-O-méthyl-glucuronique  $\rightarrow$  *glucuronoxylanes*
  - Des molécules d'arabinose  $\rightarrow$  *arabinoxylanes*
  - Des molécules d'arabinose et d'acide glucuronique  $\rightarrow$  *glucuronoarabinoxylanes*
- Les **xyloglucanes**, constitués d'un squelette de  $\beta$ -1,4 glucose auquel sont greffés des molécules de xylose, galactose et/ou de fructose.
- Les **mannanes** constitués d'un squelette de mannose auquel sont greffés des molécules de galactose  $\rightarrow$  *galactomannanes* et les **glucomannanes** constitués d'un squelette de glucose et de mannose auquel sont greffés des molécules de galactose  $\rightarrow$  *galactoglucomannanes*.
- Les  **$\beta$ -1,3 ; 1,4 glucanes** qui sont des polysaccharides de glucose à liaisons mixtes. .

Ces polysaccharides complexes sont synthétisés dans l'appareil de Golgi des cellules végétales par des glucosyltransferases. Elles sont ensuite transportées à la surface de la membrane plasmique dans des vésicules via exocytose (Cosgrove, 2005 ; Keegstra, 2010). De manière globale, les hémicelluloses sont caractérisées par un poids moléculaire plus faible que celui des celluloses et présentent un important degré de ramification (Holtzapfle, 2003). Par conséquent, elles sont plus facilement dégradées que la cellulose car elles ne sont pas capables de former des agrégats complexes tels que les microfibrilles (Pérez *et al.*, 2002).

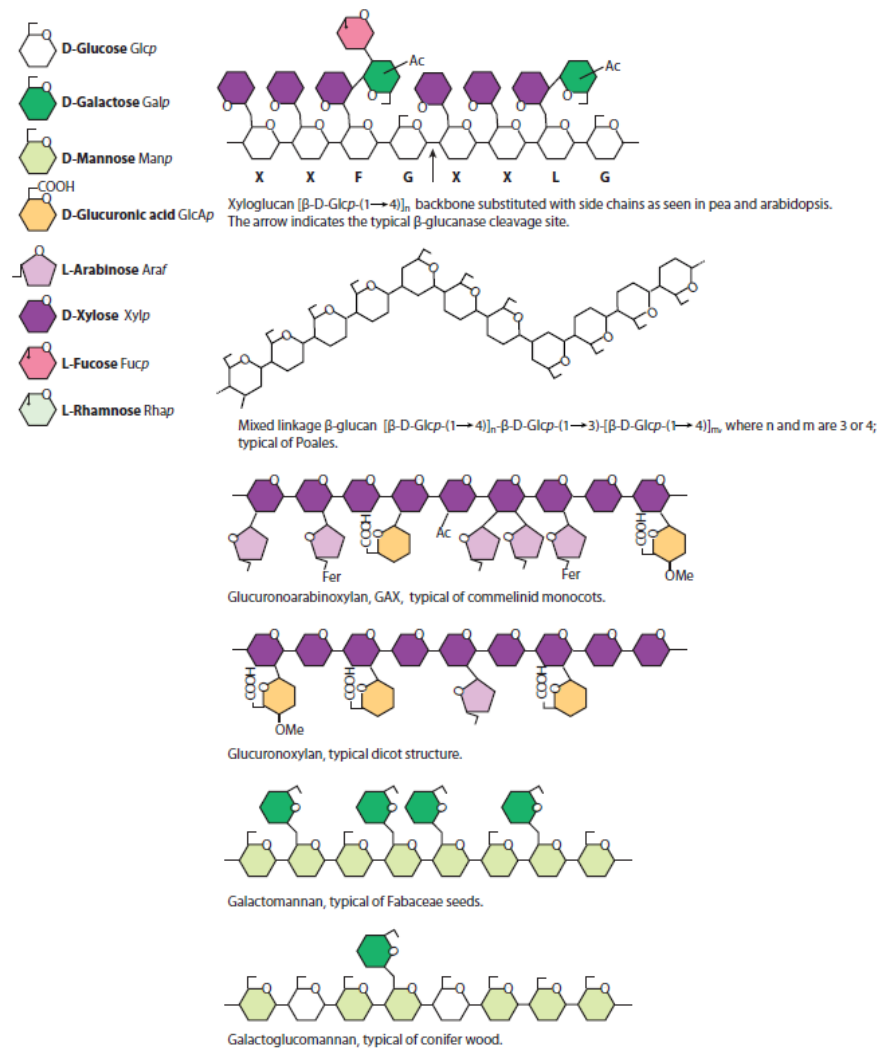


Figure 5. Principales hémicelluloses rencontrées dans les parois cellulaires végétales (Scheller & Ulvskov, 2010)

### 1.2.2.3 Les pectines

Les pectines sont considérées comme les hétéro-polysaccharides les plus complexes présents dans la nature. Elles sont majoritairement composées d'acide galacturonique. Il est possible de distinguer des régions lisses constituées d'un enchaînement de résidus d'acide galacturonique et des régions ramifiées, où les résidus d'acide galacturonique présentent des branchements de sucres neutres (**Figure 6**) (Voragen *et al.*, 2009). Les pectines peuvent être réparties en trois grandes familles (Srivastava *et al.*, 2017) :

- Les **galacturonanes**, qui comprennent les homogalacturonanes constitués d'un squelette de molécules d'acide galacturonique liées en  $\alpha$ -1,4 et les xylogalacturonanes présentant des molécules de xylose greffées au niveau de la chaîne linéaire d'acide galacturonique. Ce sont les principaux composés pectiques présents au niveau des parois cellulaires végétales, avec une

teneur pouvant atteindre jusqu'à 60% du contenu total en pectines (Caffall & Mohnen, 2009). Leur degré de polymérisation minimal s'étend de 72 à 100 résidus d'acides galacturoniques chez le citron, la betterave et la pomme (Renard *et al.*, 1995). Les groupements carboxyles des galacturonanes peuvent être méthyl-estérifiés en C6 et/ou acétylés en O2/3 (Voragen *et al.*, 2009).

- Les **rhamnogalacturonanes I** qui sont formés d'un squelette de résidus d'acide galacturonique et de rhamnose. Des sucres neutres tels que des galactosyls et/ou des arabinosyls sont greffés sur les résidus rhamnose en position O4 (Srivastava *et al.*, 2017). Des substitutions polymériques d'arabinane ou d'arabinogalactane peuvent également se produire (Voragen *et al.*, 2009).
- Les **rhamnogalacturonanes II** qui sont formés d'un squelette de résidus d'acide galacturonique sur lequel sont greffés jusqu'à onze résidus de sucres différents (**Figure 6**). Ils sont capables de former des dimères avec d'autres rhamnogalacturonanes II via la formation de ponts borate diesters entre les résidus apiofuranose, ce qui augmente la solidité de la paroi cellulaire (Chormova *et al.*, 2014).

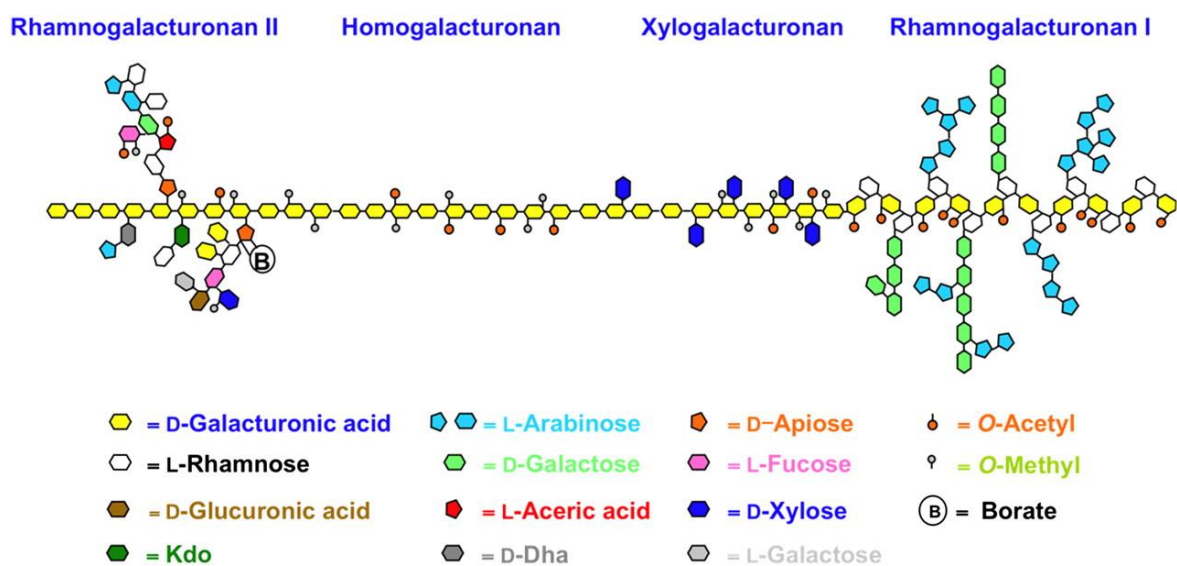


Figure 6. Représentation schématique de la molécule de pectine (Harholt *et al.*, 2010)

De manière générale, les homogalacturonanes sont les domaines pectiques les plus abondants (65% des pectines totales), alors que les xylogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes II ne sont présents qu'en moindre mesure (moins de 10% des pectines totales). Pour ce qui est des rhamnogalacturonanes I, ils constituent 20 à 30% des pectines totales (Zandleven *et al.*, 2007 ; Harholt *et al.*, 2010).

Tout comme les hémicelluloses, les pectines sont synthétisées dans l'appareil de Golgi, transportées dans des vésicules et excrétées via exocytose au niveau de la membrane plasmique (Cosgrove, 2005). En ce qui concerne leur rôle, elles assurent la cohésion des cellules végétales mais également leur maintien structurel (Caffall & Mohnen, 2009 ; Voragen *et al.*, 2009). Les propriétés physiques de la pectine sont notamment régies par le degré de méthylation des galacturonanes. En effet, plus il est faible, plus la pectine est rigide (Cosgrove, 2005). Les pectines sont initialement déposées au sein de la paroi cellulaire avec un haut degré de méthyl-estérification. Elles sont ensuite partiellement dé-méthylestérifiées par des pectines méthyl-estérases produites par la plante même (Willats *et al.*, 2001). Les polymères d'acide galacturonique faiblement méthylés sont ainsi capables de se lier entre eux via l'établissement de ponts calciques. Ces derniers se réalisent entre les blocs d'acide galacturonique non méthylestérifiés, au niveau de leur groupement carbonyle chargé négativement. Ce type de structure est directement responsable du caractère gélifiant des molécules de pectine retrouvées dans la paroi cellulaire et surtout dans la lamelle mitoyenne (O'Neill *et al.*, 2001 ; Cosgrove, 2005). Ainsi, les pectines méthyl-estérases contribuent entre autres à l'adhésion intercellulaire responsable de la rigidité de la paroi (Willats *et al.*, 2001) mais également au remodelage de la pectine lors de la croissance des cellules végétales (Pelloux *et al.*, 2007 ; Hocq *et al.*, 2017).

### 1.2.3 Dégradation enzymatique de la paroi cellulaire végétal

De par sa structure complexe, la paroi cellulaire végétale constitue une barrière contre l'attaque des pathogènes. Afin de franchir cette dernière et tirer avantage des nombreux polysaccharides entrant dans sa composition, les organismes phytopathogènes (bactéries, champignons, protistes) produisent des enzymes capables de dégrader de façon spécifique les celluloses, hémicelluloses et pectines de la paroi (Kubicek *et al.*, 2014). A titre d'exemple, la bactérie *Dyckea dadantii* et les champignons du genre *Aspergillus spp.* (notamment *A. niger* ou encore *A. flavus*) font partie des phytopathogènes les plus étudiés pour la dégradation de la paroi cellulaire notamment grâce à leur impressionnant arsenal enzymatique (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014 ; de Vries & Visser, 2001).

#### 1.2.3.1 Les cellulases

Dans la rhizosphère, la dégradation complète de la cellulose implique trois types de cellulases (Juturu & Wu., 2014) : (i) les endoglucanases, (ii) les exoglucanases et (iii) les  $\beta$ -glucosidases (**Figure 7**). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser la cellulose au niveau des liens  $\beta$ -1-4 du polymère de glucose. Le premier clivage est réalisé de manière aléatoire par les endoglucanases au niveau des liens glycosidiques  $\beta$ -1-4 dans les zones amorphes de la structure cellulosique. Les produits libérés sont des longs oligomères de glucose qui sont ensuite hydrolysés par des exoglucanases. Le clivage de ces molécules peut se faire soit au niveau de leur extrémité réductrice soit au niveau de leur extrémité non réductrice. Dans les deux cas, les produits de dégradation sont des dimères de glucose, également

appelés cellobiose. La dernière hydrolyse, réalisée par les  $\beta$ -glucosidases libère à partir de la cellobiose, des monomères de glucose pouvant être directement utilisés comme source de carbone par les micro-organismes du sol (Béguin & Aubert, 1994).

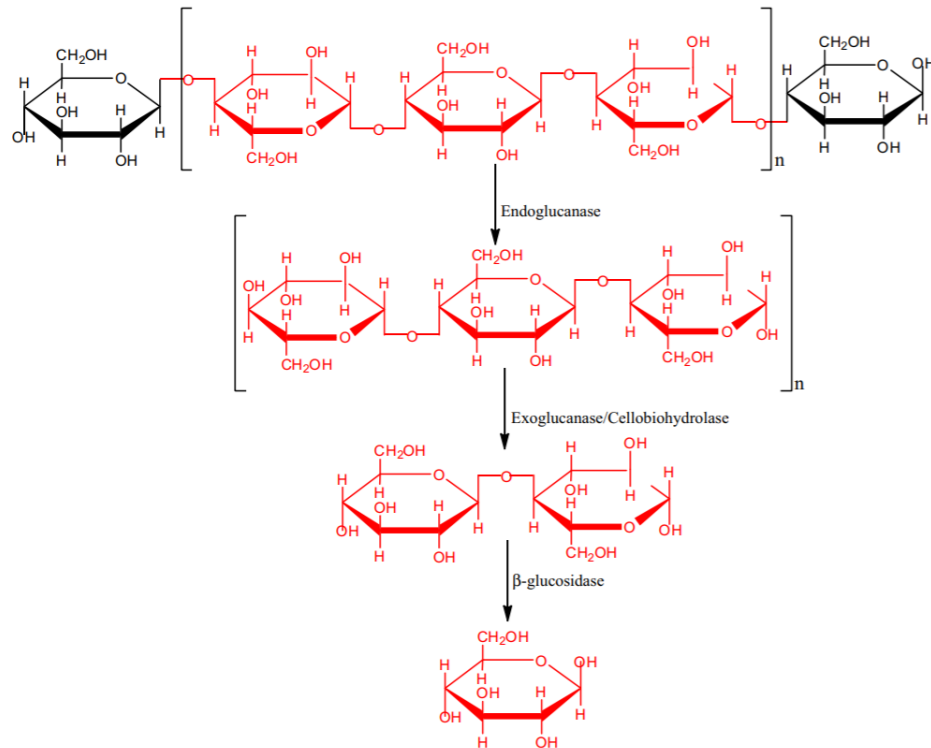


Figure 7. Schéma de la dégradation enzymatique de la cellulose jusqu'à obtention de monomères de glucose suite à l'action successive des trois principaux types de cellulases (endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glucanase). Les régions amorphes de la cellulose (noir) sont distinguées des régions cristallines (rouge) (Juturu & Wu., 2014).

### 1.2.3.2 Les hémicelluloses

Etant donné la complexité structurale des hémicelluloses, leur dégradation complète requiert l'action conjointe de plusieurs hémicellulases agissant chacune sur un polymère spécifique (Saha, 2003). Les principales hémicellulases produites par les micro-organismes du sol sont regroupées dans le **Tableau 1**. Les produits de dégradation libérés suite à l'action des hémicellulases pourront alors également servir de source de carbone pour les micro-organismes de la rhizosphère capables de les métaboliser.

Tableau 1. Principales hémicellulases rencontrées chez les micro-organismes du sol (Wertz., 2011).

Enzyme	Substrat
Endo- $\beta$ -1,4-xylanase	$\beta$ -1,4-xylanes
Exo- $\beta$ -1,4-xylosidase	$\beta$ -1,4-xylooligomères
Endo- $\beta$ -1,4-mannanase	$\beta$ -1,4-mannanes
Exo- $\beta$ -1,4-mannosidase	$\beta$ -1,4-mannooligomères
$\alpha$ -arabinofuranosidase	Hémicelluloses contenant des groupes $\alpha$ -arabinofuranosyls
Endo- $\alpha$ -1,5-arabinanase	$\alpha$ -1,5-arabinanes
$\alpha$ -glucuronidase	Xylooligomères liés en $\alpha$ -1,2 avec l'acide 4-O-méthyl glucuronique
Acetyl xylane estérase	O-acetyl xylanes

### 1.2.3.3 Les pectinases

Les pectinases sont considérées comme des facteurs de virulence des bactéries et champignons phytopathogènes. En effet, elles agissent en dégradant les pectines contenues dans la lamelle mitoyenne et dans la paroi cellulaire végétale. Par conséquent, la stabilité de la paroi est affectée, entraînant ainsi la lyse des cellules végétales (Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2016). Etant donné l'important degré de polymérisation du squelette d'homogalacturonane des pectines, leur clivage en monomères d'acide galacturonique est réalisé dans différents compartiments cellulaires chez ces bactéries. Par conséquent, leur catabolisme est fortement dépendant des systèmes de transports (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014). De manière générale, le premier clivage enzymatique est réalisé dans le milieu extracellulaire par des pectinases ayant été secrétées via des systèmes de sécrétion protéiques. Les oligomères sont ensuite importés par des porines spécifiques dans le périplasme où se déroule le second clivage générant des oligomères de plus faible degré de polymérisation. Enfin, ces derniers sont transportés dans le cytoplasme bactérien par des systèmes d'absorption des sucres afin qu'ils puissent y être clivés en monomères et être utilisés comme source de carbone par la bactérie.

La complexité de la molécule de pectine implique donc l'existence d'une grande diversité d'enzymes capables de la dégrader de façon spécifique (**Figure 8**). Les pectinases peuvent être réparties en deux catégories, à savoir (i) les pectines-méthylestérases et acétylestérases (PME et PAE) et (ii) les dépolymérase, comprenant les polygalacturonases (PG) et les lyases (Combo *et al.*, 2011).

Les PME entrent en action avant les dépolymérase, ces dernières agissant sur des substrats faiblement ou non méthylestérifiés. Les PME s'attaquent préférentiellement aux pectines hautement méthylées en hydrolysant leurs groupes méthyl-esters (Jayani *et al.*, 2005). Les produits de dégradation de ces enzymes sont donc de l'acide polygalacturonique et du méthanol. Elles hydrolysent uniquement le groupe méthyl-ester des galacturonates se trouvant à côté d'un galacturonate non estérifié (Combo *et*

*al.*, 2011). Quant aux PAE, elles clivent les groupements acetyl-esters des homogalacturonanes pour libérer de l'acide polygalacturonique et de l'acétate.

Les PG sont capables de cliver les pectines et les pectates au niveau du lien glycosidique établi entre les monomères d'acide galacturonique via hydrolyse du lien glycosidique  $\alpha$ -1,4, libérant ainsi des D-galacturonates. Le clivage du substrat peut se faire de manière aléatoire (endo-polygalacturonases) ou au niveau de l'extrémité non réductrice du substrat (exo-polygalacturonases), générant ainsi des monogalacturonates et parfois des digalacturonates (Pedrolli *et al.*, 2009). Pour ce qui est des lyases, le clivage des pectines et des pectates se fait via une réaction de  $\beta$ -élimination, entraînant la libération d'oligogalacturonates insaturés ( $\Delta$ 4,5-D-galacturonate) et d'oligomères d'acide galacturonique (Combo *et al.*, 2011).

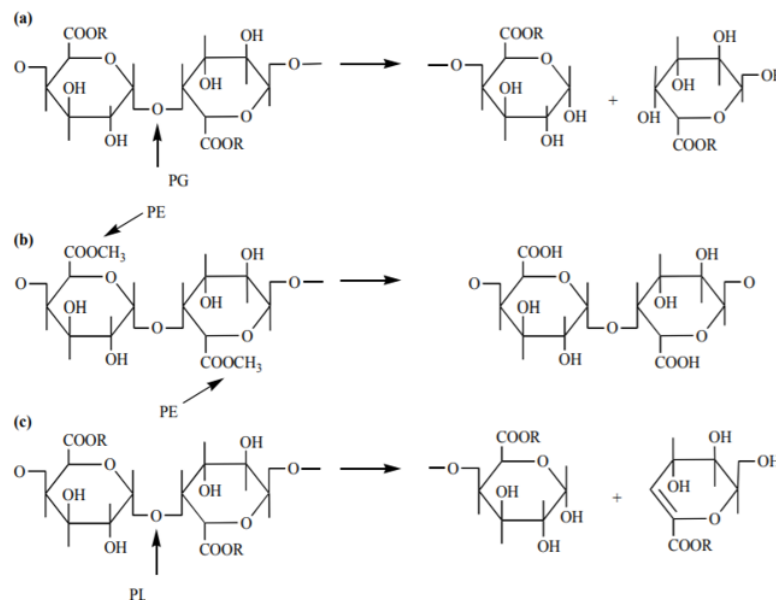


Figure 8. Mode d'action des pectinases (Pedrolli *et al.*, 2009). (a) Mode d'action des polygalacturonases (PG). (b) Mode d'action des pectine estérases (PE). (c) Mode d'action des pectine lyases (PL).

Tout comme pour les polygalacturonases, il est possible de faire la distinction entre les endo- et les exo-lyases. Il est également possible de différencier les lyases en fonction de leur substrat, les pectines lyases clivant préférentiellement les pectines hautement méthylées alors que les pectate lyases s'attaquent aux pectines faiblement méthylées (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014). Les pectate lyases ont généralement besoin de calcium pour être activées. Parfois, elles peuvent également l'être grâce à d'autres cations divalents comme le magnésium, le cobalt ou encore le strontium (Combo *et al.*, 2011). Quant aux pectine lyases, leur activité n'est pas dépendante des ions  $\text{Ca}^{2+}$  mais elle peut toutefois être stimulée par la présence de cations divalents (Jayani *et al.*, 2005). Notons que parmi les dépolymérases, seules les pectine lyases ont la capacité de dégrader les pectines hautement méthylées sans intervention préalable des méthylestérases (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014).

Toutes les pectinases évoquées jusqu'à présent s'attaquent à la partie lisse de la molécule de pectine, à savoir le squelette constitué de résidus d'acide galacturonique. D'autres enzymes de dégradation de la pectine sont également responsables du clivage des régions ramifiées que présente cette molécule. Citons entre autres les rhamnogalacturonases, les arabinases, les xylogalacturonases ou encore les galactanases (Pedrolli *et al.*, 2009).

#### 1.2.4 Rôle des polysaccharides de la paroi dans l'immunité des plantes

Les plantes sont la cible de multiples organismes pathogènes ou parasites tels que les animaux et insectes herbivores, les nématodes, les virus, les champignons ou encore les bactéries pathogènes. Contrairement aux mammifères, elles ne possèdent pas de cellules immunitaires et ne sont pas capables de développer une réponse immunitaire adaptative. Par conséquent, leur seul moyen de défense contre ces agressions extérieures repose sur leur système immunitaire inné et sur les signaux moléculaires émis au niveau des sites ayant été endommagés. Ces molécules ou motifs moléculaires capables d'induire une réponse immunitaire chez les végétaux sont regroupés sous le nom d'éliciteurs (Choi & Klessig, 2016 ; Schellenberger *et al.*, 2019). Ils peuvent être divisés en deux sous-catégories (**Figure 9**) :

- Les **éliciteurs spécifiques**, qui sont caractéristiques du pathogène et capables d'induire une réponse immunitaire uniquement chez les végétaux possédant dans leur génome, le gène de résistance correspondant (relation gène pour gène).
- Les **éliciteurs non-spécifiques** capables de déclencher une réponse immunitaire chez les végétaux indépendamment de leur espèce. Au sein de ceux-ci peuvent être distingués (i) les « *Pathogen Associated Molecular Patterns* » (PAMPs), (ii) les « *Damage-Associated Molecular Patterns* » (DAMPs) et (iii) les « *Microbe Associated Molecular Patterns* » (MAMPs).



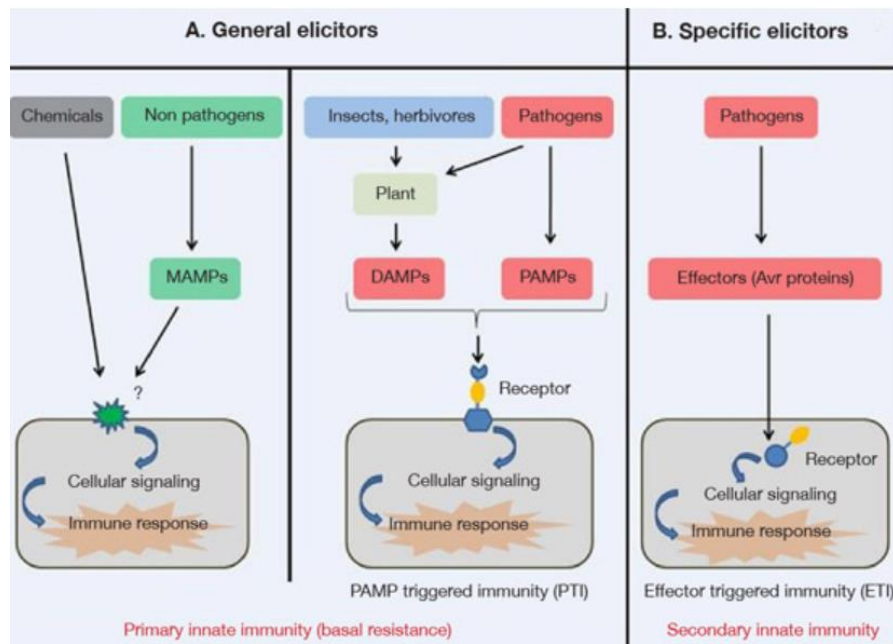


Figure 9. Schéma simplifié de la réaction immunitaire enclenchée par la reconnaissance d'éliciteurs spécifiques (A) et non spécifiques (B) (Henry *et al.*, 2011)

La perception des agents pathogènes par la plante peut se réaliser de manière directe via la reconnaissance des PAMPs et de manière indirecte via la reconnaissance des DAMPs. En effet, comme cela a été discuté au point précédent, les agents pathogènes possèdent tout un arsenal d'enzymes de dégradation de la paroi végétale. L'altération enzymatique de cette dernière engendre notamment la libération d'oligosaccharides de la paroi capables d'induire le système immunitaire inné de la plante. Les oligomères d'acide galacturonique, de cellulose et de xyloglucane se sont notamment avérés être reconnus comme DAMPs par la plante (Hou *et al.*, 2019). Notons que la lyse des cellules végétale causée par l'action des pathogènes engendre la libération de leur contenu cytosolique (protéines, peptides, nucléotides, acides aminés) également impliqué dans l'induction du système immunitaire inné du végétal (Choi & Klessig, 2016). La perception à la fois des DAMPs et des MAMPs lors de l'attaque d'un pathogène permet à la plante d'amplifier les signaux immunitaires induits afin de limiter le plus rapidement possible la prolifération du pathogène.

#### 1.2.4.1 Mécanismes de défense mis en place

Lorsque la plante est attaquée par un organisme pathogène, elle est d'abord protégée par sa cuticule et sa paroi végétale et éventuellement par des composés antimicrobiens se trouvant à la surface des cellules végétales (Nurnberger & Lipka, 2005). Lorsque ces barrières physiques et chimiques sont franchies par le pathogène, le système immunitaire inné de la plante est enclenché. En premier lieu, les DAMPs/PAMPs sont reconnus par des récepteurs transmembranaires, les « Pattern Recognition Receptors » (PRRs) également appelés « extracellular Receptor-Like Kinases » (RLKs) (Couto &

Zipfel, 2016 ; Boutrot & Zipfel, 2017). Cette reconnaissance induit une réponse immunitaire de base, la « PAMP-Triggered Immunity » (PTI), ayant pour rôle d'arrêter la colonisation de la plante par le pathogène. Cette réaction immunitaire est d'abord localisée au niveau du site de l'infection et est appelée « Local Acquired Resistance » (LAR). Des signaux moléculaires tels que des espèces oxydantes réactives (ion superoxyde, radical hydroperoxyl, peroxyde d'hydrogène) ou encore de l'acide salicylique sont alors synthétisés et transportés vers les cellules des tissus sains de la plante, déclenchant ainsi une PTI non plus localisée mais généralisée à l'ensemble de la plante. Ces moyens de défense peuvent également être de nature mécanique tels que des dépôts de callose ou de lignine entraînant un épaissement de la paroi de cellules adjacentes au site de l'infection (Pour revue : Yu *et al.*, 2017). Ce phénomène porte le nom de « Systemic Acquired Resistance » (SAR). Ainsi, le déclenchement de la SAR permet de protéger l'ensemble de la plante contre une éventuelle attaque de pathogènes qui serait susceptible de se produire ultérieurement (Gourbal *et al.*, 2018).

Cependant, les pathogènes ont développé des stratégies adaptatives pour contourner la réponse immunitaire de base des plantes. En effet, ceux ayant réussi à pénétrer au sein du cytoplasme de cellules végétales vont sécréter des protéines d'avirulence, capables d'inhiber la PTI en interrompant ou en stoppant complètement la biosynthèse des signaux moléculaires de l'immunité (Abramovitch & Martin, 2004). La plante devient alors sensible à l'attaque des pathogènes. Cette étape porte le nom de « Effector-Triggered Susceptibility » (ETS). Pour faire face à cette sécrétion d'effecteurs, les plantes ont développé une PTI amplifiée et accélérée, appelée « Effector-Triggered Immunity » (ETI). Ainsi, chaque effecteur est reconnu de façon spécifique par une protéine polymorphique « Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat » (NBS-LRR) résultant de l'expression de gènes de résistance du végétal (R genes) (Couto & Zipfel, 2016). A la suite de cette forte réaction immunitaire, la plante développe une réponse hypersensible caractérisée par la mort des cellules végétales au niveau du site de l'infection (Jones & Dangl, 2006). Il s'agit là d'un moyen de limiter la propagation de l'agent pathogène vers les tissus sains de la plante voire d'inhiber directement l'agent infectieux. Finalement, la dernière phase rend compte de la capacité des pathogènes à développer de nouveaux gènes effecteurs grâce à la sélection naturelle afin de contourner l'ETI de la plante. Etant donné que les plantes évoluent au même titre que les agents pathogènes, ces derniers développent également de nouveaux gènes R, rendant ainsi possible l'enclenchement de l'ETI.

## 1.3 LE BIOCONTROLE

### 1.3.1 Définition

Le biocontrôle peut être défini comme « l'ensemble des méthodes de protection des cultures basées sur le recours à des organismes vivants ou des substances naturelles » (Pierucci, 2015). Depuis quelques années, l'utilisation de micro-organismes (PGPRs) en tant que biopesticides est en constante

augmentation. En effet, ils constituent une alternative durable aux pesticides car en plus d'être hautement spécifiques à leur cible, ils ne présentent pas d'effets négatifs sur l'environnement, les animaux et les humains (Ye *et al.*, 2018). Les bactéries du genre *Pseudomonas spp* (telles que *P. fluorescens*, *P. putida*) et *Bacillus spp* (telles que *B. subtilis* ou encore *B. velezensis*) comptent parmi les PGPRs les plus couramment étudiés en vue de protéger les cultures contre les ravageurs (Bishnoi, 2015).

### 1.3.2 Principales caractéristiques des PGPRs

Premièrement, les PGPRs présentent la faculté de coloniser efficacement les racines des végétaux (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Cette caractéristique est d'une importance primordiale car elle permet aux PGPRs d'instaurer une compétition pour l'espace et les nutriments avec les pathogènes dans la rhizosphère. Deuxièmement, ils sont capables d'inhiber la prolifération des agents pathogènes via antagonisme direct (Raaijmakers *et al.*, 2010). Pour ce faire, les PGPRs produisent tout un arsenal d'antibiotiques, de composés antimicrobiens de faible poids moléculaire (bactériocines, sidérophores) et d'enzymes hydrolytiques (protéases, chitinases, lipases, glucanases, ...) (Bishnoi, 2015). D'autres travaux ont également montré que les PGPRs peuvent directement limiter la formation de biofilm du pathogène, inactiver ses facteurs de germination ou encore dégrader les toxines responsables du pouvoir pathogène (Compant *et al.*, 2005 ; Mariutto & Ongena, 2015). Troisièmement, les PGPRs possèdent la faculté d'induire la résistance systémique de la plante (Kloepper *et al.*, 2004 ; Bakker *et al.*, 2007 ; Jourdan *et al.*, 2008). En effet, les MAMPs que présentent les PGPRs sont responsables du phénomène de « priming » pouvant être considéré comme une mise en alerte de la plante, lui permettant de résister plus efficacement aux différents stress biotiques (infection par un pathogène) et abiotiques auxquels elle pourrait être sujette ultérieurement (Ton *et al.*, 2009). Ces MAMPs peuvent être de différente nature : flagelle, sidérophores, acide salicylique, composés volatils ou encore lipopeptides cycliques (Bishnoi, 2015 ; Choi & Klessig, 2016 ; Schellenberger *et al.*, 2019). Leur perception par la plante induit des changements métaboliques, physiologiques et transcriptionnels au sein de la plante qui permettront la mise en place plus rapide et plus efficace de ses mécanismes de défense lorsqu'elle sera exposée à l'attaque des agents phytopathogènes (Mauch-Mani *et al.*, 2017). De nombreuses recherches menées sur des plantes traitées ou colonisées par certaines souches de bactéries du genre *Bacillus* (*B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*) ou *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida* ou encore *P. aeruginosa*) ont montré l'avantage du priming sur la réponse immunitaire développée par ces dernières lors de leur exposition à un agent pathogène (Choudhary *et al.*, 2007 ; Mariutto & Ongena, 2015 ; Mauch-Mani *et al.*, 2017). Par conséquent, ces deux bactéries se sont avérées être des candidats de choix en tant qu'agents de biocontrôle.

## 1.4 BACILLUS VELEZENSIS

### 1.4.1 Taxonomie

La taxonomie de *B. velezensis* a fait l'objet de nombreuses adaptations. Récemment, un groupe opérationnel « *amyloliquefaciens* » a été proposé, ce dernier regroupant *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* et *B. velezensis* (Fan *et al.*, 2017) (**Figure 10**). Deux sous-espèces ont également été distinguées au sein de l'espèce *B. amyloliquefaciens* : (i) *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* associée aux plantes, FZB42 étant la souche type considérée comme modèle des bactéries Gram positives vivant en association avec les racines des plantes (Fan *et al.*, 2018) et (ii) *B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens* non associée aux plantes, la souche type étant DSM7. En effet, ces dernières présentent des dissemblances à la fois physiologiques et génomiques (Borriss *et al.*, 2011). Actuellement, *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* est considéré comme étant un synonyme de *B. velezensis*.

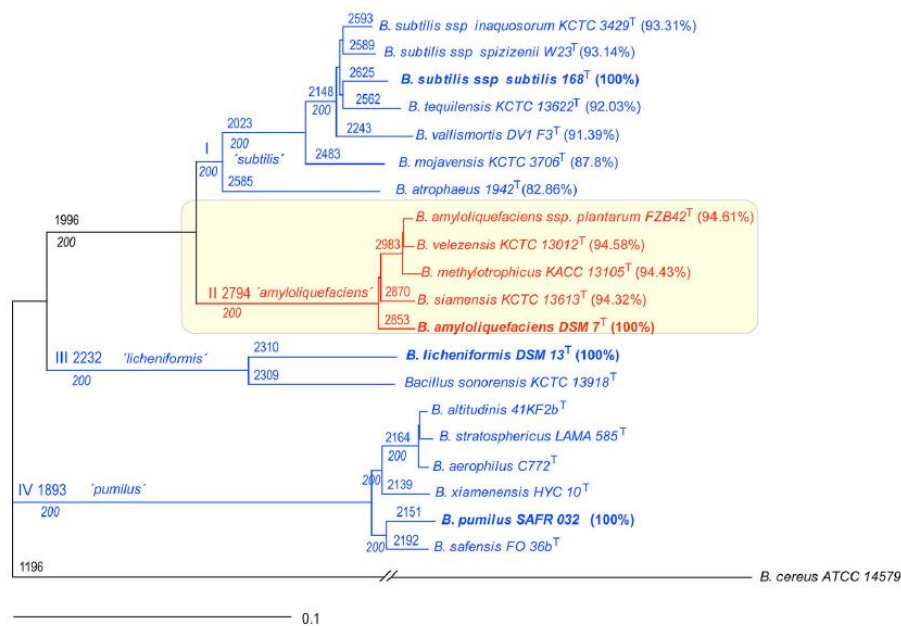


Figure 10. Arbre phylogénétique des espèces comprises dans le groupe « *Bacillus subtilis* » (Fan *et al.*, 2017). Le groupe opérationnel « *amyloliquefaciens* » est encadré en jaune. Au sein de ce groupe, les espèces *B. amyloliquefaciens subsp. Plantarum*, *B. velezensis* KCTC 13012 et *B. methylotrophicus* KACC 13105 sont conspécifiques.

### 1.4.2 Caractéristiques

*Bacillus velezensis* est une bactérie Gram positive aérobie largement rencontrée au sein de la rhizosphère (Fan *et al.*, 2018). Comme son nom l'indique, elle se présente sous forme de bâtonnet et est capable d'hydrolyser l'amidon grâce à la production d'amylase liquéfiant. Sa croissance est optimale à des températures et pH intermédiaires (entre 30°C et 40°C à pH 7) (Priest *et al.*, 1987). Sous des conditions de stress biotique ou abiotique (stress hydrique ou thermique, exposition à des radiations UV

ou électromagnétiques, ...), les bactéries du genre *Bacillus* forment des endospores (De Boer & Diderichsen, 1991). Cet état physiologique est caractérisé par une absence d'activité métabolique, cette dernière se rétablissant lorsque les conditions extérieures s'améliorent. Les spores entrent alors en germination pour se transformer en cellules végétatives. Dans un contexte naturel, à savoir au contact des tissus végétaux, cette bactérie comme beaucoup d'autres se développe sous forme de biofilm, ce dernier étant constitué de cellules et d'une matrice extracellulaire ayant l'aspect d'un gel hydraté (Ben Abdallah *et al.*, 2018).

D'un point de vue génétique, la taille du génome de *B. velezensis* FZB42 est d'environ 3,900 kb et comporte plus ou moins 3700 séquences codantes (Chen *et al.*, 2007). Une de ses particularités est que plus de 10% de son génome est voué à la production de métabolites secondaires bioactifs au sens large et en particulier antimicrobiens alors qu'en général ce n'est que 4 à 5% du génome des bactéries du genre *Bacillus* qui est dédié à cette fonction (Stein, 2005 ; Chen *et al.*, 2007). Le **Tableau 2** dresse un aperçu de la diversité des métabolites secondaires produits par *B. velezensis*.

Tableau 2. Gènes et clusters de gènes codant pour les métabolites secondaires de *B. velezensis* (adapté de Rabbee *et al.*, 2019)

Métabolite	Gène ou cluster de gènes	Taille (kb)
<b><i>Lipopeptides cycliques</i></b>		
Surfactine	<i>srfABCD</i>	32,0
Fengycine	<i>fenABCDE</i>	38,2
Bacillomycine-D	<i>bmyCBAD</i>	39,7
<b><i>Polykétides</i></b>		
Difficidine	<i>dfnAYXBCDEFGHIJKLM</i>	71,1
Bacillaene	<i>baeBCDE</i> <i>acpK</i> <i>baeGHIJLMNRS</i>	74,3
Macrolactine	<i>mlnABCDEFGH</i>	53,9
<b><i>Sidérophores</i></b>		
Bacillibactine	<i>dhbABCDEF</i>	12,8
<b><i>Antibiotiques</i></b>		
Bacilysine	<i>bacABCDE</i> <i>ywfG</i>	6,9
<b><i>Bactériocines</i></b>		
Plantazolicine	<i>pznFKGHIAJC DBEL</i>	9,96
Amylocyclicine	<i>ac n BACDEF</i>	4,49
<b><i>Composés organiques volatils</i></b>		
Acetoin et 2,3-butandiol	<i>alsSD</i> <i>bdhA</i>	3,6

### 1.4.3 Les lipopeptides

Les lipopeptides sont des métabolites secondaires de structure très variée produits par de nombreux genres bactériens dont *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptomyces spp.*, et quelques champignons comme *Aspergillus* (Raaijmakers *et al.*, 2010). Ces molécules sont constituées d'une chaîne d'acides gras hydrophobe liée à un oligopeptide hydrophile linéaire ou cyclique. Étant donné leur caractère amphiphile, les lipopeptides sont dotés de propriétés tensioactives. Ces molécules peuvent aussi avoir des propriétés antimicrobiennes, cytotoxiques ou encore anti-tumorales (Cameotra & Makkar, 2004). Ceci explique entre autres l'intérêt croissant qui leur est porté dans les domaines environnementaux et pharmaceutiques (Pirri *et al.*, 2009).

#### 1.4.3.1 Structure

Les lipopeptides produits par *B. velezensis* sont répartis au sein de trois familles distinctes : les surfactines, les iturines et les fengycines (**Figure 11**). L'importante diversité structurale des lipopeptides est due à la variabilité de la longueur de la chaîne lipidique ainsi qu'à ses multiples configurations isomériques. Il en va de même pour la partie peptidique pouvant présenter une grande variabilité au niveau du nombre d'acides aminés la constituant, de leur séquence et de leur configuration (Ongena & Jacques, 2008). Les lipopeptides d'une même famille qui présentent une chaîne peptidique de même longueur mais de séquence différente sont appelés variants. Les variants qui diffèrent de par la longueur et l'isomérisation de leur chaîne d'acide gras sont appelés homologues (Raaijmakers *et al.*, 2010).

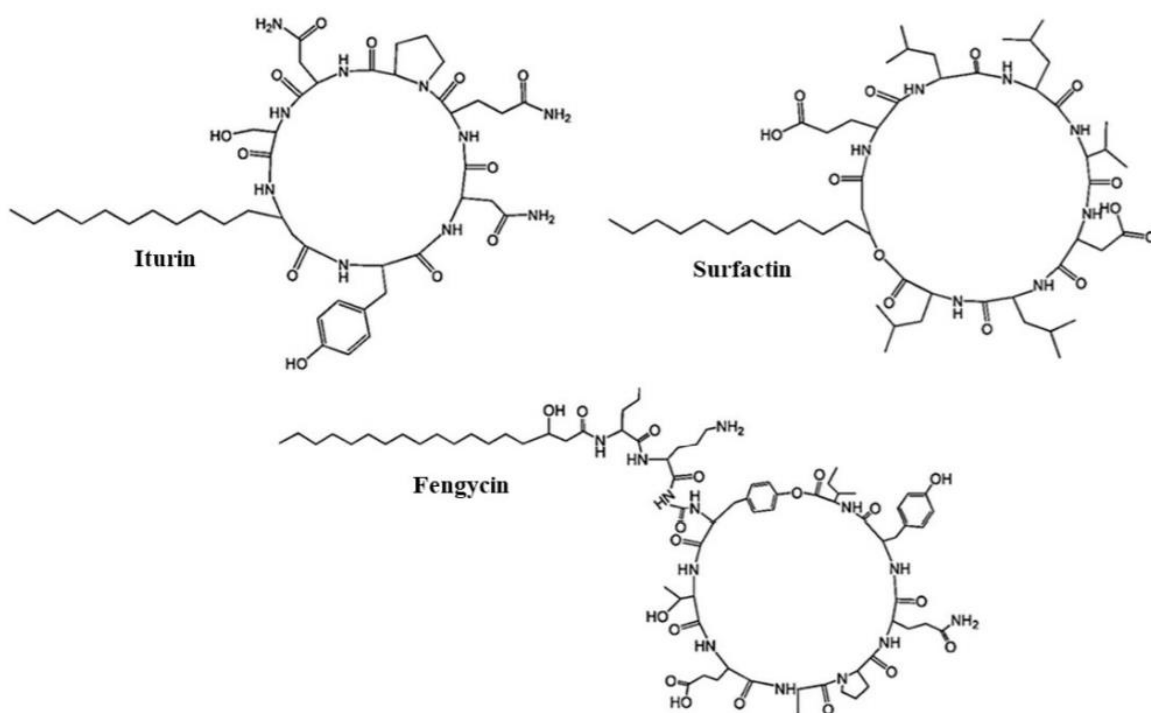


Figure 11. Structures générales des lipopeptides cycliques (surfactines, iturines et fengycines) produits par *Bacillus spp* (Khan *et al.*, 2017).

Les lipopeptides faisant parti du groupe des surfactines sont des heptapeptides liés à un  $\beta$ -hydroxy acide gras constitué de 12 à 16 atomes de carbone. La liaison entre la partie peptidique et la partie lipidique est assurée au moyen d'une liaison acyle. La cyclisation de la séquence d'acides aminés est réalisée entre le groupement  $\beta$ -hydroxyle de la chaîne d'acide gras et le carbone terminal du peptide via une liaison ester. Ce type de cycle porte le nom de macrolactone.

Le groupe des iturines ou bacillomycines rassemble également des heptapeptides, sauf que ces derniers sont liés, toujours via un lien acyle, à un  $\beta$ -amino acide gras composé de 14 à 17 atomes de carbone. Dans le cas des iturines, la cyclisation du peptide se fait via la réalisation d'un lien amide entre le groupement  $\beta$ -amine de la chaîne d'acide gras et le carbone terminal du peptide. Dans ce cas-ci, la structure cyclique est de type macrolactame.

Enfin, le groupe de fengycines comprend des decapeptides liés à un  $\beta$ -hydroxy acide gras constitué de 14 à 16 atomes de carbone. Cette chaîne lipidique peut être ou non saturée. Tout comme pour la surfactine, le cycle est de type macrolactone sauf que dans le cas présent, le carbone terminal du peptide est lié à la chaîne latérale du résidu tyrosine située en troisième position via un lien ester.

#### 1.4.3.2 *Mécanisme de biosynthèse*

Contrairement aux protéines conventionnelles, les lipopeptides ne sont pas synthétisés par les ribosomes, responsables de la traduction des ARNs messagers en protéines. En effet, leur mécanisme de synthèse repose sur l'action de mégaenzymes indépendantes des ARNs messagers appelées Non-Ribosomal Peptides Synthase (NRPS) (Stein, 2005). Les NRPS sont constitués de plusieurs modules, qui chacun à leur tour vont activer un acide aminé, parfois le modifier, puis le transférer au niveau du module adjacent afin de former un peptide (**Figure 12**) (Finking & Marahiel, 2004). Notons que l'ordre et le nombre des modules conditionnent directement la séquence du peptide qui sera synthétisé in fine.

Chaque module est constitué d'au moins trois domaines à savoir un domaine d'adénylation (A), un domaine de thiolation aussi appelé « Peptidyl Carrier Protein » (T ou PCP) et un domaine de condensation (C) (Raaijmakers *et al.*, 2010). La synthèse du peptide commence au niveau du module d'initiation, constitué d'un domaine A dont la fonction est de sélectionner et d'activer l'acide aminé (aa) en le liant à une molécule d'adénine (Finking & Marahiel, 2004). L'aa activé porte alors le nom d'amino acyl adénylate. Ce premier module comprend également un domaine PCP responsable de l'établissement d'un lien covalent entre l'atome de soufre de la molécule de phosphopantéthéine du domaine PCP et l'aa activé (réaction de thioestérification) (Stein, 2005). Notons que dans le cas de la synthèse des lipopeptides, le module d'initiation comprend également un domaine de condensation, responsable de la liaison entre le premier aa de l'oligopeptide et la chaîne d'acide gras via une réaction

d'acylation (Raaijmakers *et al.*, 2010). Les modules suivants sont des modules d'élongation et contiennent principalement des domaines A, T et C. Dans ces modules-ci, le domaine C est responsable de l'établissement du lien peptidique entre un nouvel acide aminé activé et l'acide aminé ou l'oligopeptide issu du module précédent via une réaction de condensation (Finking & Marahiel, 2004). Les modules d'élongation peuvent parfois contenir des domaines plus spécialisés appelés domaines secondaires responsables entre autres de la méthylation, de la formylation, de l'oxydation, de la réduction, de l'hétérocyclisation ou encore de l'épimérisation de l'acide aminé qui va être intégré au peptide (Ongena & Jacques, 2008). Ainsi, tous ces domaines secondaires contribuent également à la grande diversité structurale des lipopeptides synthétisés par les PGPR. Enfin, le module terminal du NRPS contient, en plus des domaines A, T et C un domaine thyoestérase (TE), responsable du clivage du lien thioester établi entre la PCP du domaine TE du dernier module et le dernier aa inséré au niveau de l'oligopeptide. Ce domaine terminal catalyse également la cyclisation de la partie peptidique du lipopeptide libéré (Bruner *et al.*, 2002).

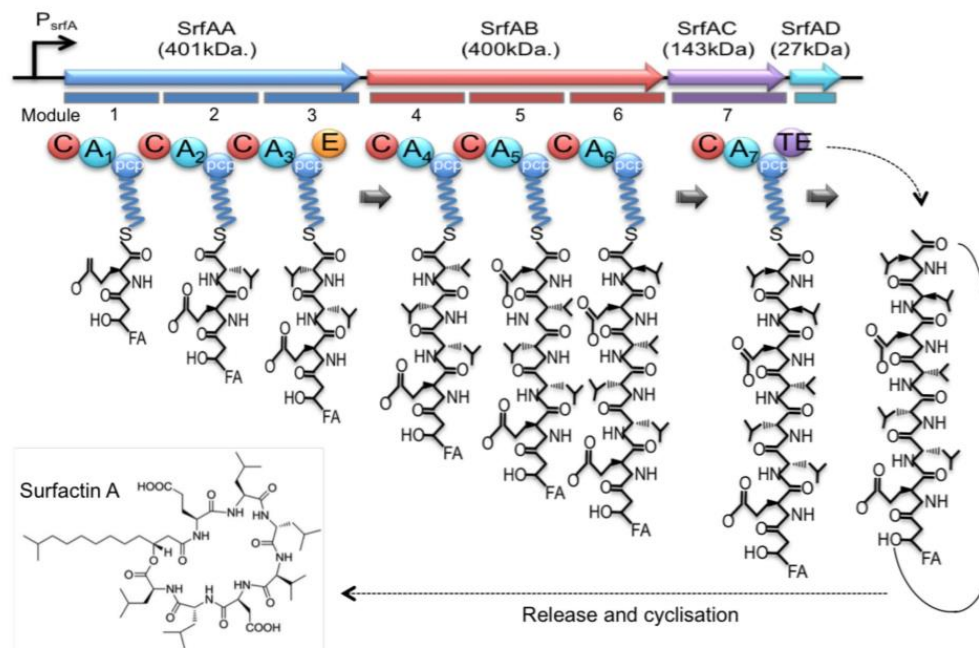


Figure 12. Représentation schématique de la synthèse de surfactine (Harwood *et al.*, 2018)

La synthèse des lipopeptides chez *Bacillus spp* est entre autres régulée par le quorum sensing, plus particulièrement par le système de protéines régulatrices comP/comA (Roongsawang *et al.*, 2011). En effet, dans le cas particulier de la surfactine, l'expression des gènes impliqués dans sa synthèse est étroitement liée à l'augmentation de la densité cellulaire. Ainsi, cette dernière se déroule généralement lors de la phase exponentielle alors que les iturines et fengycines sont synthétisées en fin de croissance cellulaire, au tout début de la phase stationnaire pour les fengycines et légèrement plus tard pour les



iturines (Raaijmakers *et al.*, 2010). Les gènes codant pour la synthèse de la surfactine se situent sur l'opéron *surfA* (35kb), ce dernier étant sous le contrôle du promoteur *Psrf*. *surfA* est également impliqué dans le développement de la compétence et de la sporulation chez *B. subtilis* (Hu *et al.*, 2019). Notons que la régulation de la production de surfactine a essentiellement été étudiée pour l'espèce *B. subtilis*. Par conséquent, une analogie totale avec les mécanismes impliqués dans cette régulation chez *B. velezensis* reste encore à démontrer.

#### 1.4.3.3 *Rôle dans le biocontrôle*

Les lipopeptides synthétisés par les bactéries du genre *Bacillus spp* sont impliqués dans l'induction de l'immunité de la plante, l'antagonisme direct envers les pathogènes ainsi que dans la colonisation de la rhizosphère (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Comme cela a été évoqué précédemment, les PGPRs sont capables d'induire l'ISR des végétaux via la perception de motifs moléculaires qui leur sont associés. La surfactine en fait notamment parti. En effet, plusieurs travaux menés sur *B. velezensis* FZB42 et S499 ont montré qu'en présence de faibles concentrations en surfactine, la réponse immunitaire des plants de tabacs exposés à un agent pathogène est améliorée (Jourdan *et al.*, 2009 ; Henry *et al.*, 2011 ; Cawoy *et al.*, 2014). Ce phénomène a également été mis en évidence sur des plants d'*Arabidopsis*, de tomates et de haricots ou encore sur des plants de laitue (Ongena *et al.*, 2007 ; Chowdhury *et al.*, 2015). Notons que l'ampleur de l'ISR induite chez la plante est directement dépendante de la diversité et de la quantité de surfactine produite par le PGPR (Cawoy *et al.*, 2014). La façon dont la surfactine interagit avec la membrane plasmique des cellules racinaires et les signaux moléculaires qui en découlent n'ont pas encore été complètement élucidés à l'heure actuelle. Contrairement aux autres éliciteurs connus jusqu'à présent, la surfactine ne serait pas reconnue par un récepteur spécifique situé à la surface de la membrane plasmique, mais interagirait de façon préférentielle avec la phase lipidique de la membrane plasmique des cellules végétales en s'y introduisant de façon partielle (Jourdan *et al.*, 2009). Cette perturbation au niveau de la membrane plasmique activerait certaines protéines clés impliquées dans l'ISR de la plante.

Certains lipopeptides ont également un rôle dans l'antagonisme direct dont font preuve les PGPRs face aux microorganismes et aux parasites auxquels ils peuvent être confrontés dans la rhizosphère. L'activité antifongique est essentiellement assurée par les fengycines et les iturines (Romero *et al.*, 2007). Les fengycines produites par *Bacillus spp* se sont montrées efficaces contre de nombreux champignons filamenteux tels que *Botrytis cinerea* (Touré *et al.*, 2004) ou encore *Fusarium graminearum* et *Gibberella zea* (Dunlap *et al.*, 2011). Quant aux iturines, elles se sont avérées efficaces contre *Colletotrichum dematium* (Hiradate *et al.*, 2002) ou encore *Aspergillus flavus* (Moyné *et al.*, 2001). Ces deux lipopeptides agissent principalement en ralentissant la croissance du champignon au

niveau du site infecté (Romero *et al.*, 2007), en perturbant l'organisation de la membrane plasmique du pathogène la rendant ainsi plus perméable (Deleu *et al.*, 2008) ou encore en inhibant la synthèse de toxines fongiques (Hu *et al.*, 2009). Pour ce qui est de l'activité antibactérienne de *B. velezensis* (ou plus généralement de *Bacillus spp*) elle serait essentiellement attribuable aux polykétides et antibiotiques sécrétés par la bactérie, plus particulièrement la difficidine et la bacilysine respectivement plutôt qu'aux lipopeptides (Rabbee *et al.*, 2019). Il en va de même pour l'activité nématocide observée en traitant des plantules de tomates infectées par le nématode *Caenorhabditis elegans* avec *B.velezensis* FZB42. La réduction d'œufs et de larves observée a été attribuée à la synthèse de plantazolicine qui est une bactériocine produite par le PGPR (Liu *et al.*, 2013).

Enfin, les lipopeptides et plus particulièrement la surfactine, jouent un rôle primordial dans la colonisation de la rhizosphère. En effet, de par son caractère amphiphile, la surfactine permet d'améliorer la motilité de la bactérie en abaissant la tension de surface. Par ailleurs, une étude menée sur *Bacillus subtilis* 168 a montré que les mutants ne produisant plus de surfactine perdaient leur faculté de motilité sur milieux agar semi-solides (Julkowska *et al.*, 2005). Le déplacement collectif des cellules de *Bacillus spp* peut se faire par « swarming » ou « sliding ». Le swarming est un processus de migration actif et coordonné impliquant une différenciation des cellules végétatives en cellules hyperflagellées tandis que le sliding consiste en un déplacement passif des cellules sur la surface grâce à la production de molécules tensioactives (Raaijmakers *et al.*, 2010). Notons que la surfactine s'est également avérée induire une augmentation du niveau d'expression de la flagelline chez *B. subtilis*, se traduisant par une augmentation de la synthèse de flagelles qui permet donc d'améliorer la motilité de la bactérie sur les surfaces solides (Ghelardi *et al.* 2012). Au niveau de la rhizosphère, cette capacité de motilité que possèdent les bactéries du genre *Bacillus* leur confère un avantage considérable, leur permettant ainsi de coloniser, au niveau de la surface des racines, des niches plus riches en nutriments. Ceci a pour conséquence de limiter à la fois l'espace et les nutriments disponibles pour les pathogènes. La surfactine est également impliquée dans la formation de biofilms qui sont des communautés multicellulaires sessiles et hautement structurées. La surfactine a la faculté d'agir comme un signal déclenchant la formation de la matrice extracellulaire du biofilm (Pandini *et al.*, 2017). En adoptant cette conformation d'agglomérat bactérien dense, les bactéries sont moins sensibles aux stress (a)biotiques et la diffusion de signaux moléculaires entre les bactéries est facilitée (Raaijmakers *et al.*, 2010). De plus, la colonisation de la plante ainsi que la persistance des bactéries sur les racines est ainsi maximisée, ce qui est une caractéristique de première importance pour les PGPRs.

#### 1.4.4 Enzymes de dégradation de la paroi végétale

Bien que *B. velezensis* (FZB42/S499) soit un PGPR, il s'est avéré que son génome comprend des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la paroi végétale (**Tableau 3**), ces derniers étant habituellement retrouvés chez les micro-organismes pathogènes et saprophytes. Cependant, au sein du groupe *Bacillus*, la présence de tels gènes n'est pas restreinte à l'espèce *velezensis*. En effet, ils ont également été mis en évidence chez *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou encore *B. pumilus*. Un tableau plus complet établissant un comparatif du nombre d'enzymes impliquées dans la dégradation de la pectine chez ces différentes espèces peut être consulté à l'**Annexe 1**. Le tableau annexe a été réalisé pour la souche modèle de chacune des espèces qui y figure. Toutes les familles d'enzymes intervenant dans la dégradation et le remodelage de la paroi végétale chez les champignons ont d'abord été recensées à partir de la revue de Kubicek *et al.* (2014). Ensuite, le nombre de gènes codant pour chaque famille d'enzyme, leur fonction (si connue) et leur conservation ont été recherchés pour chacune des souches représentatives des espèces de *Bacillus* étudiées via la base de données CAZy (<http://www.cazy.org/>).

Tableau 3. Gènes de dégradation de la paroi cellulaire végétale identifiés chez *B. velezensis* S499 et FZB42 (Hoff, résultats non publiés). *pelA* et *pelB* codent pour des enzymes de dégradation de la pectine tandis que les autres enzymes du tableau codent pour des enzymes de dégradation des hémicelluloses

Gène	Locus tag	Famille enzymatique	Enzyme
<i>pelA</i>	AS588_00695	PL1	Pectate lyase
<i>pelB</i>	AS588_18195		
<i>xynA</i>	AS588_17000	GH11	1,4- $\beta$ -xylanase
	AS588_05650	GH30	Glycosyl hydrolase
<i>ynfF</i>	AS588_06240		Glucuronoxylanase
<i>abnA</i>	AS588_02280	GH43	Arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidase
<i>xynD</i>	AS588_06235		Arabinoxylan arabinofuranohydrolase
<i>xynB</i>	AS588_06590		$\beta$ -xylosidase
<i>yxiA</i>	AS588_18225		Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase
<i>abfA</i>	AS588_02325	GH51	$\alpha$ -N-arabinofuranosidase
<i>xsA</i>	AS588_02430		$\alpha$ -N-arabinofuranosidase
<i>ydhT</i>	AS588_17985	GH26	$\beta$ -mannosidase

Les bactéries capables de produire de telles enzymes revêtent notamment un intérêt industriel. Parmi les bactéries du genre *Bacillus*, *B. subtilis* et *B. pumilus* ont été étudiées pour leur faculté à produire des pectinases alcalines. Ces dernières ont de nombreuses applications industrielles telles que le prétraitement des eaux usées contenant des résidus de pectines issues des industries de transformation des végétaux ; le traitement des fibres textiles telles que le lin, la jute ou encore le chanvre ; la

fermentation du thé et du café, l'extraction d'huile végétale, ou encore le traitement de la pulpe de papier (Pedrolli *et al.*, 2009 ; Hoondal *et al.*, 2002). Par contre, l'implication de la présence de ces gènes de dégradation de la paroi dans l'écologie de ces PGPRs au sein de la rhizosphère est encore méconnue et reste donc à élucider.

## 1.5 OBJECTIFS

Le présent travail s'inscrit dans une ligne de recherches déjà initiée au laboratoire MiPI qui a pour objectif général de mieux comprendre les mécanismes moléculaires spécifiques impliqués dans l'interaction entre *B. velezensis* et la plante hôte et d'évaluer leur(s) impact(s) sur le fitness de la bactérie dans la rhizosphère. Dans ce contexte, des expériences préalables à ce TFE ont montré que *B. velezensis* est capable de percevoir certains polysaccharides de la paroi cellulaire végétale (plantes de la famille des *solanaceae* telles que tabac et tomate) et qu'en réponse, la bactérie peut stimuler sa production de surfactine, un des nombreux métabolites secondaires bioactifs et impliqué dans le biocontrôle. Plus précisément, suite à l'ajout d'extraits commerciaux relativement bruts de pectine et d'hémicellulose au milieu de culture de *B. velezensis*, une accumulation significativement plus rapide de surfactine dans le surnageant a été observée par rapport à des cultures non amendées (Debois *et al.*, 2015). En corrélation avec les fonctionnalités décrites pour ce lipopeptide dans la section 1.4.3.3 de l'introduction, cela a pour effet de favoriser la motilité de la bactérie, la formation de biofilm (Hoff, résultats non publiés) et donc très probablement son potentiel de colonisation. Ceci est à mettre en parallèle avec des résultats obtenus pour la souche *B. subtilis* NCIB 3610 montrant que certains polysaccharides végétaux sont capables d'induire la formation de biofilm en agissant en tant que signal régulant la phosphorylation du gène *spo0A* impliqué dans sa synthèse (Beauregard *et al.*, 2013).

De manière plus fine, une petite dizaine de polymères commercialement disponibles et représentatifs soit de composantes des hémicelluloses soit de la pectine, ont été comparés quant à leur effet sur la stimulation de la production de surfactine. Plusieurs d'entre-eux se sont montrés actifs mais la meilleure réponse de la bactérie a été observée suite à l'ajout d'homogalacturonane, représentatif du squelette de la pectine (**Annexe 2**).

D'autre part, sur base d'une analyse comparative des génomes disponibles pour le groupe fonctionnel *B. amyloliquefaciens* incluant *B. velezensis*, deux gènes potentiellement impliqués dans la dégradation du squelette pectique (*pelA* et *pelB* annotées en tant que pectate/pectine lyases) sont présents chez toutes les souches avec une forte identité nucléotidique (**Annexe 3**). De manière surprenante, cet équipement enzymatique est fortement réduit par rapport à d'autres espèces saprophytes appartenant au genre *Bacillus* mais non considérées comme « plant-associated » (*B. subtilis*, *B. licheniformis*). A *contrario*, aucun gène de dégradation des polymères pariétaux n'est présent dans le génome des espèces

*B. cereus* et *B. megaterium*, bactéries ubiquistes mais dont l'écologie n'est pas particulièrement liée à une interaction avec les végétaux. A ce stade de l'analyse bioinformatique, il est difficile de déterminer si le nombre plus restreint de pectinases chez *B. velezensis* résulte d'une perte ou d'une non-acquisition des gènes par rapport à *B. subtilis/licheniformis*. Cependant, il serait intéressant de comprendre pourquoi ces deux gènes *pelA* et *pelB* ont été conservés chez *B. velezensis*, considérée comme espèce prototype de la rhizosphère et développant une association bénéfique réciproque avec la plante hôte.

Sur cette base et bien que *B. velezensis* possède aussi des gènes potentiellement impliqués dans la dégradation des hémicelluloses (**Tableau 3**), ce TFE se focalisera sur l'étude de ces deux pectine hydrolases et sur une étude plus approfondie de l'effet des polymères de pectine en tant qu'inducteurs de la synthèse de surfactine. Plus précisément, les deux objectifs du présent travail sont les suivants :

- (1) Tester l'implication des enzymes codées par les gènes *pelA* et *pelB* dans le potentiel de colonisation de *B. velezensis* en utilisant comme modèle la souche GA1 très bien caractérisée au laboratoire MiPI au niveau génomique, métabolomique et pour ses propriétés de biocontrôle (Touré *et al.*, 2004 ; Arguelles-Arias *et al.*, 2009).
- (2) Etudier la relation structure-activité des polymères de pectine en se basant sur l'homogalacturonane comme base moléculaire, sur la production de surfactine par *B.velezensis* GA1. Ce polymère étant une potentielle cible des enzymes Pel, l'étude se portera principalement sur l'effet de la taille et du degré de méthylation de l'homogalacturonane.

# CHAPITRE II: MATERIEL & METHODES

## 1 CONSTRUCTION DES SOUCHES MUTANTES

### 1.1 CONSTRUCTION DE LA CASSETTE DE REMPLACEMENT

#### 1.1.1 Etapes PCR

Les différentes souches bactériennes utilisées dans le cadre de ce TFE sont reprises dans le **Tableau 4**. Le génotype *B. velezensis* GA1  $\Delta pelA$  a été construit antérieurement à la réalisation du présent travail.

Tableau 4. Inventaire des souches de *B. velezensis* GA1 utilisées

Souche	Génotype	Description
<i>Bacillus velezensis</i> GA1	Sauvage	-
	$\Delta pelA$	Délétion du gène codant pour la pectate lyase PelA
	$\Delta pelB$	Délétion du gène codant pour la pectate lyase PelB
	$\Delta pelA\Delta pelB$	Délétion des gènes codant pour les pectate lyases PelA et PelB

Afin d'inactiver le gène *pelB* codant pour une des deux putatives pectate lyases présente dans le génome de *B. velezensis* GA1, une cassette de remplacement contenant un gène de résistance à la phléomycine (**Figure 13**) est construite par la méthode de PCR overlap.

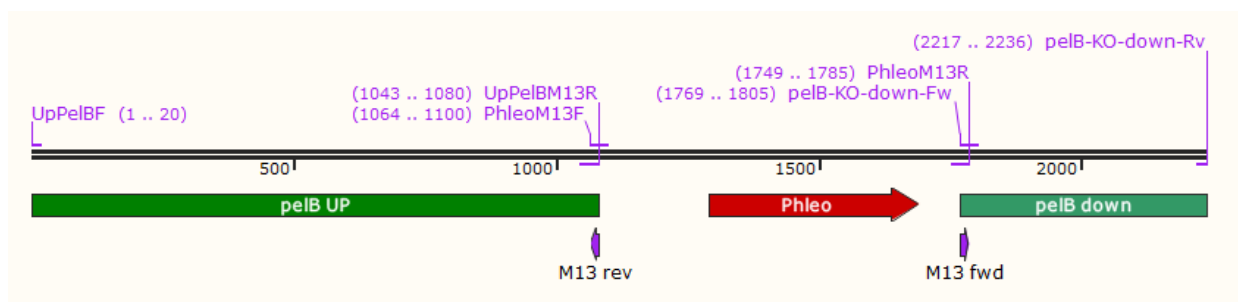


Figure 13. Représentation schématique de la cassette de remplacement du gène *pelB*

La première PCR vise à amplifier les séquences localisées en amont et en aval du gène *pelB* (respectivement *pelB* UP et *pelB* down, **Figure 13**) à partir de l'ADN génomique de *B. velezensis* GA1 ainsi que la séquence codant pour le gène de résistance à la phléomycine (Phleo). Cette première PCR

est réalisée au moyen des amorces UPPelBF et UPPelBM13R pour le fragment amont et pelB-KO-down-Fw et PelB-KO-down-Rv pour le fragment aval (**Annexe 4**). Les extrémités 5' des amorces UPPelBM13R et pelB-KO-down-Fw possèdent chacune une séquence flottante de 20 bp pouvant s'apparier respectivement à la région 5' et 3' des séquences flottantes ajoutées à la séquence Phleo. Etant donné que la zone en aval du gène *pelB* présente certaines incohérences probablement dues à des erreurs de séquençage ou d'assemblage du génome, il a été compliqué de dessiner un couple d'amorces compatible pour ce fragment. Pour cette raison, la séquence de l'amplicon aval est partiellement chevauchante avec la région 3' du gène *pelB* et la délétion du gène ne sera que partielle.

Chaque amplification est effectuée dans un volume final de 50 µl. La composition du milieu réactionnel (kit *Taq* DNA Polymerase with Standard *Taq* Buffer, New England BioLabs<sup>®</sup><sub>inc</sub>) est la suivante : 1X tampon de réaction standard *Taq* ; 200 µM dNTPs ; 0,2 µM amorces sens et antisens ; 100 µg ADN génomique ; 1,25U *Taq* DNA polymérase ; qsp 50µl H<sub>2</sub>O Dnase/Rnase free. Les conditions utilisées pour le cycle de PCR sont les suivantes : dénaturation initiale de 30 s à 95°C, dénaturation de 30 s à 95°C / hybridation de 60 s à (x) °C / extension de (y) s à 68°C durant 30 cycles, extension finale de 5 min à 68°C. La durée de l'étape d'extension (y) est calculée en considérant 1min/kb d'ADN à amplifier. La température pour l'étape d'hybridation (x) est choisie en fonction des amorces utilisées. Idéalement, elle se situe 5°C en dessous de la T<sub>m</sub> de l'amorce présentant la T<sub>m</sub> la plus basse. Ces dernières sont généralement indiquées par le fournisseur.

La séquence codant pour le gène de résistance à la phléomycine a également été amplifiée par PCR, en utilisant les amorces PhleoM13Fw et PhleoM13Rv (**Annexe 4**). L'amplification est réalisée dans un volume final de 50 µl. La composition du milieu réactionnel (Kit Q5<sup>®</sup>High-Fidelity DNA Polymerase, New England BioLabs<sup>®</sup><sub>inc</sub>) est la suivante : 1X tampon de réaction Q5 ; 200 µM dNTPs ; 0,5 µM amorces sens et anti-sens ; 100 ng cassette phléomycine ; 1U Q5 high fidelity DNA polymérase ; qsp 50 µl H<sub>2</sub>O Dnase/Rnase free.

La troisième et dernière PCR vise à assembler les amplicons issus des PCR 1 et 2 avec la séquence codant pour le gène de résistance à la phléomycine. Cette action est réalisée via PCR overlap en utilisant les amorces UPPelBF et PelB-KO-down-Rv (**Annexe 4**). La ligation entre les produits PCR 1 et 2 et la séquence codant pour le gène de résistance à la phléomycine s'effectue de façon spontanée par complémentarité de séquences. Les amorces sont ajoutées après les 11 premiers cycles afin d'amplifier la cassette recombinée.

L'amplification est effectuée dans un volume final de 50 µl. Le milieu réactionnel (Kit Q5<sup>®</sup>High-Fidelity DNA Polymerase, New England BioLabs<sup>®</sup><sub>inc</sub>) est le suivant : 1X tampon de réaction Q5 ; 200 µM dNTPs ; 0,5 µM amorces sens et anti-sens ; 100 ng cassette phléomycine ; 100 ng produit PCR 1 et 2 ; 1U Q5 high fidelity DNA polymérase ; qsp 50 µl H<sub>2</sub>O Dnase/Rnase free. Les conditions utilisées pour le cycle de PCR overlap sont les suivantes : Dénaturation initiale de 5 min à 95°C, dénaturation de

15 s à 95°C /hybridation de 30 s à 62°C/ élongation de 2min à 72°C durant 11 cycles. L'amplification de la cassette recombinée est ensuite réalisée selon les modalités suivantes : dénaturation de 15s à 95°C /hybridation de 15s à 62°C/ élongation de 2min à 72°C durant 25 cycles, élongation finale de 10 min à 72°C.

Tous les produits PCR générés (ainsi que la cassette finale) sont purifiés au moyen du kit GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) et leur concentration ainsi que leur pureté sont vérifiées au NanoDrop (NanoDrop 2000 spectrophotometer, ThermoFisher Scientific).

### 1.1.2 Vérification des produits PCR

L'amplification de chaque produit PCR est vérifiée via la réalisation d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels sont constitués de 0,8 % (m/v) d'agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza) dissouts dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 0,5x (EMD Millipore Corporation) auquel sont ensuite ajoutés 0,005 % (v/v) de Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, GmbH), utilisé comme agent révélateur de l'ADN. Les produits PCR préalablement mélangés à 3 µl de bleu de charge (6x Orange DNA Loading Dye, ThermoFisher Scientific) sont chargés sur le gel à raison de 5 µl. Le marqueur de poids moléculaire GeneRuler 1kb (ThermoFisher Scientific) est chargé de part et d'autre des échantillons. Ce dernier donne une indication sur la taille du produit PCR. La migration s'effectue à 100V durant 15 à 20 min. La révélation du gel sur fait sous lumière UV (VWR® GenoSmart).

## 1.2 TRANSFORMATION BACTERIENNE

Dans le protocole décrit ci-dessous adapté de Jarmer *et al.*, (2002) la phase de préparation des cellules compétentes et la phase de transformation sont réalisées simultanément. Pour ce faire, les cellules sont directement mises en présence de l'ADN exogène dans le milieu Minimum Medium Glutamate (MMG).

La souche à transformer est inoculée dans 10 ml de milieu LB liquide (composition en **Annexe 5**) puis est placée sous agitation (200rpm) à 26 °C durant au moins 4h. Les cellules sont lavées (2x) puis diluées avec du milieu MMG (composition en **Annexe 5**) afin d'obtenir une DO<sub>600nm</sub> finale de 0,01. Ces dernières sont ensuite mises en présence d'1 µg d'ADN exogène (i.e. cassette de remplacement de *pelB* purifiée) puis placées sous agitation (200rpm) à 37°C durant 24h pour provoquer la transformation naturelle des cellules. La manipulation est réalisée avec la souche sauvage et la souche  $\Delta pelA$  afin d'obtenir respectivement un simple mutant  $\Delta pelB$  et un double mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$ .



### 1.3 SELECTION ET VERIFICATION DES TRANSFORMANTS

Afin de sélectionner uniquement les bactéries ayant intégré l'ADN exogène, les suspensions bactériennes sont étalées sur milieu LB solide (composition en **Annexe 5**) supplémenté de 4 µg/ml de phléomycine (InvivoGen) et mises à incuber pendant une nuit à 37°C. L'ADN génomique d'une sélection de clones résistants à la phléomycine est extrait (Gene JET Genomic DNA Purification Kit, ThermoFisher Scientific), puis une PCR de vérification est réalisée en utilisant les amorces UPPelBF et PhleoM13Rv pour l'amplification (**Annexe 4**). En prenant une amorce sens localisée en amont du gène *pelB* et une amorce anti-sens située sur le gène de résistance à la phléomycine, il est possible à la fois de confirmer la présence de la cassette dans le génome mais également de s'assurer qu'elle y est insérée au bon *locus*. La PCR et sa vérification sont réalisées selon les mêmes modalités que décrites pour la première PCR du point 1.1.1. Une électrophorèse sur gel d'agarose est ensuite réalisée de la même manière que décrite au point 1.1.2.

## 2 SUIVIS DE CULTURE

### 2.1 CULTURES LIQUIDES

Pour l'ensemble des suivis de culture, une préculture de la souche à étudier est réalisée dans un milieu mimant les exsudats racinaires de la plante (RE ½) afin d'homogénéiser l'état physiologique des cellules (composition en **Annexe 5**). En fonction des modalités de l'expérience, 0.1% (m/v) d'acide galacturonique (Sigma-Aldrich), d'acides polygalacturoniques (Sigma-Aldrich), de galacturonate faiblement ou hautement méthylé (Elicityl OligoTech) ou de fractions pectiques (faiblement ou hautement méthylées) provenant de racines de tabac (partenariat avec le laboratoire BIOPI de l'Université Picardie Jules Verne d'Amiens) sont ajoutés au milieu de culture.

Les cultures sont réalisées en triplicat dans un volume total de 25 ml (fioles de 100 ml) excepté pour celles supplémentées de fractions racinaires de tabac où le volume de travail a dû être réduit à 6,25 ml (fioles de 25ml) en raison des quantités limitées de matériel disponible. Après deux lavages successifs à l'eau peptonée, les fioles sont inoculées à une  $DO_{600nm}$  finale de 0,02 et placées sous agitation (200 rpm) à 26°C durant 48h. La croissance bactérienne est suivie sur une période de 48h en réalisant un prélèvement toutes les heures et demie durant les 9 premières heures de culture. Un prélèvement à 24h et 48h est également réalisé. La densité optique de la culture est mesurée au spectrophotomètre à 600nm lors de chaque prélèvement (Genesis 10 Bio, ThermoFisher Scientific).

## 2.2 ANALYSES EN CYTOMETRIE EN FLUX

La mortalité des cellules est évaluée par marquage à l'iodure de propidium (Test PI). Pour ce faire, la culture bactérienne est diluée dans du PBS afin d'obtenir une concentration cellulaire inférieure ou égale à 2.500 évènements/ $\mu$ l dans un volume final de 1 ml. Après ajout de 5  $\mu$ l d'iodure de propidium (*BacLight™ Redox Sensor™ Green vitality Kit*, ThermoFisher Scientific) et incubation à température ambiante à l'abri de la lumière durant 10 min, la fluorescence des cellules est mesurée à 617 nm (canal FL-3) au cytomètre en flux (BD Acuri™ C6 FlowCytometer), réglé selon les paramètres suivants : vitesse fluidique moyenne, 20.000 évènements, seuil de 10.000.

L'activité métabolique des cellules est évaluée par marquage au Redox Sensor Green (Test RSG). Comme précédemment, la culture bactérienne est diluée dans du PBS afin d'obtenir une concentration cellulaire inférieure ou égale à 2.500 évènements/ $\mu$ l dans un volume final de 1 ml. Après ajout d'1  $\mu$ l de RSG (*BacLight™ Redox Sensor™ Green vitality Kit*, ThermoFisher Scientific) et incubation à température ambiante à l'abri de la lumière durant 15 min, la fluorescence des cellules est mesurée à 520 nm (canal FL-1) au cytomètre en flux, réglé selon les mêmes paramètres que décrits pour le test PI.

## 2.3 ANALYSE UPLC-MS DES SURNAGEANTS DE CULTURE

Le dosage de la surfactine libérée par les bactéries dans leur milieu de culture liquide est réalisé par UPLC-MS sur les différents surnageants de culture filtrés au travers de filtres de 0,22  $\mu$ m (Hydrophilic PTFE Syringe Filters, ROCC).

L'analyse UPLC-MS est réalisée au moyen de l'UPLC Acquity H-Class SQ detector (Waters) sur une colonne en phase inverse (Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m, 2.1 X 50 mm, Waters) suivant le programme « *Surfactine courte optimisée* ». Le volume d'injection des échantillons est de 10  $\mu$ l. L'élution est réalisée à 40°C à un débit constant de 0,6 ml/min suivant un gradient d'acétonitrile et d'eau acidifiés avec de l'acide formique (0,1%) (**Tableau 7**). Le spectromètre de masse est réglé selon les paramètres suivants : ionisation ESI<sup>+</sup>, voltage du cône 100V, température de la source 130°C, température de désolvatation 400°C, flux d'azote dans le cône 5  $\mu$ l/min, voltage du capillaire 3 kV. La gamme du spectre de masse s'étale de 850 à 1100 m/z.

Tableau 5. Paramètres d'élution de la méthode UPLC-MS « *Surfactine courte optimisée* »

Temps (min)	Eau (%)	Acétonitrile (%)
0	40	60
1,5	5	95
1,55	0	100
4	0	100
4,35	40	60
5,20	40	60

## 2.4 ANALYSE RT-qPCR

### 2.4.1 Extraction des ARNs

Les ARNs sont extraits des culots bactériens congelés dans de l'azote liquide après chaque prélèvement (du point 2.1) au moyen du kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel). La concentration en lysozyme est multipliée par 10 par rapport aux recommandations du fournisseur afin d'optimiser la lyse de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives.

### 2.4.2 Evaluation de l'expression relative des gènes d'intérêt

Les niveaux d'expression des gènes *srfAA*, *pelA* et *pelB* sont évalués par RT-qPCR. Ces derniers sont quantifiés grâce à la fluorescence émise par le SYBR Green lorsque celui-ci se fixe à de l'ADN double brin. Par conséquent plus il y a d'amplicons du gène d'intérêt, plus l'intensité de fluorescence détectée est élevée. La quantification du niveau d'expression des différents gènes d'intérêt est évaluée de manière relative par rapport au niveau d'expression du gène *gyrA* à un temps donné. Ce gène code pour l'ADN gyrase qui est une enzyme responsable du surenroulement négatif de l'ADN chez les bactéries. Ce gène est utilisé en tant que gène de référence car son expression est considérée comme étant constante au cours du temps et indépendante des paramètres expérimentaux. Les séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR sont reprises à l'**Annexe 4**.

Les étapes de rétrotranscription (RT) et de polymérisation en chaîne (PCR) sont réalisées successivement au cours d'un même programme. Chaque amplification est effectuée dans un volume final de 20 µl. La composition du milieu réactionnel (kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR, New England BioLabs®<sub>inc</sub>) est la suivante : 1X Luna One-step Reaction Mix ; 1X Luna WarmStart RT Enzyme Mix ; 0,4 µM amorces sens et anti-sens; 100 µg ARN ; qsp 20 µl H<sub>2</sub>O Dnase/Rnase free. La RT-qPCR est réalisée au moyen du thermocycler StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) selon les modalités suivantes : une étape de rétrotranscription de 10 min à 55°C, une dénaturation initiale d'une minute à 95°C et 40 cycles comprenant 10s de dénaturation à 95°C et 30 s d'extension à 60°C. Chaque cycle s'achève par une lecture de fluorescence de la plaque.

En fin de cycle, des courbes de fusions sont réalisées en augmentant la température de 60 à 95°C par pas de 0,5°C/5s. Ces dernières servent à évaluer la spécificité des couples d'amorces utilisés pour amplifier les différents gènes d'intérêt. La T<sub>m</sub> obtenue dépend de la composition nucléotidique et de la longueur des amplicons générés lors de la PCR. Ainsi, si les amorces sont peu spécifiques, la courbe de fusion affichera plusieurs pics. L'expression relative de chaque gène d'intérêt est évaluée via la méthode de Pfaffl.

## 2.5 EVALUATION DE L'ACTIVITE TOTALE DES PECTATE LYASES

Le protocole décrit ci-dessous est adapté de Al Balaa *et al.*, (2014). L'activité totale des pectate lyases présentes dans les surnageants de culture est évaluée par dosage des oligogalacturonates insaturés libérés par  $\beta$ -élimination, clivage caractéristique de ces enzymes. Les surnageants de culture sont filtrés au moyen d'un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  (Hydrophilic PTFE Syringe Filters, ROCC) afin de s'assurer que le substrat soit uniquement consommé par l'enzyme durant la manipulation. 437,5  $\mu\text{l}$  de solution de substrat (GLM/GHM) à 5 g/l préparée dans du tampon phosphate (0,057 M, pH 8) sont ajoutés à 62,5  $\mu\text{l}$  de surnageant de culture préchauffés à 25°C. Le mélange est mis sous agitation (Termomixer compact, eppendorf) à 200 rpm durant 5 min avant d'être incubé à 50°C durant 3h. Un prélèvement est réalisé après 10, 30, 60, 120 et 180 min. La réaction enzymatique est stoppée en plaçant les échantillons dans de la glace durant 10 min. 20  $\mu\text{l}$  d'échantillon, auquel sont ajoutés 280  $\mu\text{l}$  d'eau distillée sont disposés dans une microplaque de 96 puits (UV-Star®, Greiner bio-one) avant de mesurer l'absorbance à 232 nm au spectramax (SpectraMax M2, Molecular Devices).

Les différents blancs réalisés dans le cadre de cette manipulation sont (i) un blanc d'eau distillée, (ii) un blanc de tampon phosphate et (iii) un blanc du surnageant de culture, afin de s'affranchir de l'absorbance des oligogalacturonates insaturés qui y sont déjà présents. Le blanc de surnageant est réalisé de la même manière que décrite ci-dessus, hormis le fait que la solution de substrat est remplacée par 437,5  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate à 0,057M.

L'activité enzymatique est déterminée grâce à la relation suivante, en considérant une unité d'activité enzymatique (U) équivalant à 1  $\mu\text{mol}$  de substrat consommé/min :

$$\text{activité (U l}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \times l} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{enz}}} \times 10^6$$

Avec :  $\frac{\Delta A}{\Delta t}$  = pente de la zone linéaire de la cinétique enzymatique ( $\text{min}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  = coefficient d'extinction molaire des oligogalacturonates insaturés ( $4600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Collmer *et al.*, 1988),  $l$  = longueur du trajet optique (cm),  $V_{\text{tot}}$  = volume total du milieu réactionnel après addition de l'enzyme (ml),  $V_{\text{enz}}$  = volume de solution contenant l'enzyme (ml).

### 3 TEST DE COLONISATION *in planta*

#### 3.1 PREPARATION DES PLANTULES DE TOMATE

Les graines de tomates sont stérilisées de la manière suivante : désinfection avec 1 ml d'éthanol (75%) sous agitation durant 2 min, remplacés ensuite par 1 ml de mélange d'eau de javel (10%) + tween (0,1%) sous agitation durant 10 min. Les graines sont ensuite lavées avec de l'eau distillée stérile (3x) puis disposées stérilement dans des boîtes de Pétri carrées contenant du milieu Hoagland solide. Les boîtes sont mises à incuber à température ambiante sous lumière artificielle durant 5 jours.

#### 3.2 INOCULATION DES PLANTULES DE TOMATE

Les souches d'intérêt sont cultivées dans 10 ml de milieu RE ½ sous agitation (200 rpm) à 26°C durant une nuit. Les cellules sont ensuite lavées à l'eau peptonée (2x) avant d'être re-suspendues à une DO<sub>600nm</sub> finale de 0,5. Pour les test de compétition, 5 µl du mélange des deux souches (sauvage et *ΔpelAΔpelB*) en proportion 1:1 ou 1:4 sont inoculés sur les plantules de tomates, au niveau de l'intersection entre la racine et le début de la tige. Pour les tests de colonisation individuelle, chaque souche est inoculée sur les racines de tomates séparément à raison de 5 µl, également à une DO<sub>600nm</sub> de 0,5. Les boîtes de plantules inoculées sont incubées à température ambiante, sous lumière artificielle.

#### 3.3 EVALUATION DE LA COLONISATION

La colonisation est suivie durant une semaine, en récoltant les racines après 1, 3 et 7 jours. Les racines colonisées sont récoltées stérilement sur 5 cm et lavées dans 5 ml d'eau peptonée + 0,1% Tween afin d'en détacher les cellules bactériennes. La solution est diluée de 10 en 10 et les dilutions sont étalées sur milieu LB solide et sur milieu LB solide supplémenté de 5 µg/ml de chloramphénicol. Ces derniers sont incubés à 37°C durant une nuit. La population bactérienne est déterminée par comptage.

#### 3.4 DOSAGE DE LA SURFACTINE SUR MILIEU SOLIDE

Pour le test de colonisation individuel, la production de surfactine est également suivie *in planta* après 1 et 7 jours de colonisation. Après que la racine ait été décollée du milieu solide, la surfactine est extraite avec 2 fois 100 ml d'acétonitrile 100%. La solution est récupérée et centrifugée à 13.000 rpm durant 3 min. Le surnageant est analysé par UPLC-MS suivant la même méthode que décrit au point 2.3.

# CHAPITRE III : RESULTATS & DISCUSSION

## 1 EFFET DE LA PECTINE SUR L'APTITUDE A LA COLONISATION DES RACINES

### 1.1 VALIDATION DES MUTANTS $\Delta pelA$ , $\Delta pelB$ , $\Delta pelA\Delta pelB$

Comme cela a été évoqué précédemment, *B. velezensis* GA1 possède deux gènes (*pelA* et *pelB*) qui pourraient être impliqués dans la dégradation de la pectine. Afin d'investiguer leur rôle et leur éventuelle implication dans colonisation des racines par la bactérie, trois mutants de *B. velezensis* GA1 n'exprimant plus ces gènes codant pour les putatives pectate lyases ( $\Delta pelA$ ,  $\Delta pelB$ ,  $\Delta pelA\Delta pelB$ ) ont été construits. Le mutant  $\Delta pelA$  a été construit en insérant, à la place du gène, une cassette de remplacement contenant un gène de résistance au chloramphénicol. La même procédure a été réalisée pour construire le mutant  $\Delta pelB$ , mais en insérant cette fois-ci un gène de résistance à la phléomycine. Par conséquent, le double mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$  possède à la fois un gène de résistance au chloramphénicol et un gène de résistance à la phléomycine. Les différents mutants ont été validés par amplification PCR sur leurs ADN respectifs afin de vérifier si ces derniers ont correctement intégré la ou les cassettes de remplacement. Les résultats de cette dernière ont été confirmés via la réalisation d'une électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 14).

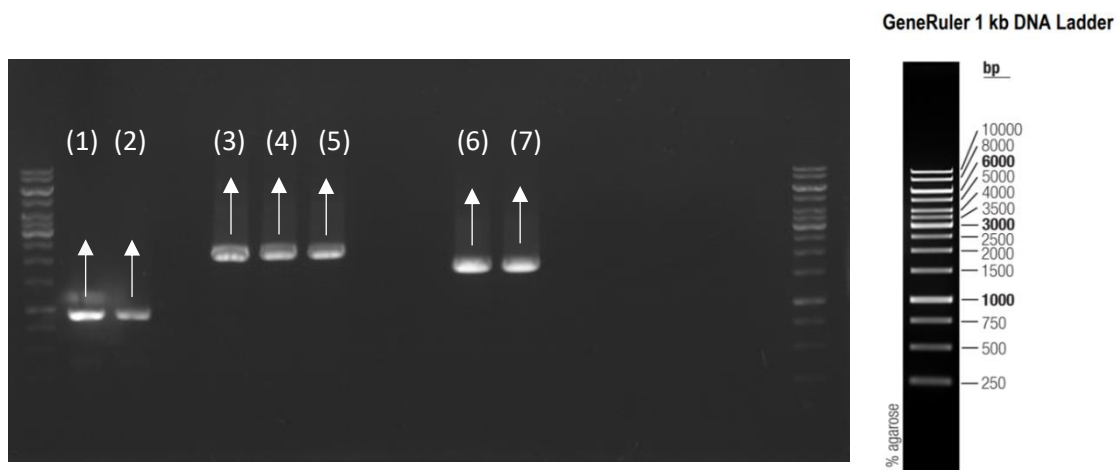


Figure 14. Migration par électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR amplifiés à partir de l'ADN de *B. velezensis* GA1 WT,  $\Delta pelA$ ,  $\Delta pelB$ ,  $\Delta pelA\Delta pelB$ . Les bandes (1) et (2) à 750 bp correspondent au gène de résistance au chloramphénicol chez  $\Delta pelA$  et  $\Delta pelA\Delta pelB$  respectivement, la bande (3) à 2185 bp correspond au gène *pelB* de la souche WT, les bandes (4) et (5) à 2237 bp correspondent à la cassette de remplacement du gène *pelB* comprenant le gène de résistance à la phléomycine chez  $\Delta pelB$  et  $\Delta pelA\Delta pelB$  respectivement tandis que les bandes (6) et (7) à 1785 bp correspondent à l'amplification de la cassette de remplacement de *pelB* chez  $\Delta pelB$  et  $\Delta pelA\Delta pelB$  respectivement.

Comme le montre la figure ci-dessus, le gène de résistance au chloramphénicol est bien présent dans le génome des mutants  $\Delta pelA$  et  $\Delta pelA\Delta pelB$  étant donné que les produits PCR affichent une taille de 750 bp, correspondant au poids moléculaire de ce dernier.

Pour ce qui est de la validation des mutants  $\Delta pelB$  et  $\Delta pelA\Delta pelB$ , le gel d'électrophorèse montre que la taille de la cassette de remplacement contenant le gène de résistance à la phléomycine (2237 bp) est sensiblement identique à la taille du gène  $pelB$  (2185 bp). Bien qu'il soit possible de constater que la bande (3) correspondant au gène  $pelB$  a migré légèrement plus loin que les bandes (4) et (5) correspondant à la cassette de remplacement du gène  $pelB$ , ces deux mutants ne peuvent pas être validés avec certitude en se basant sur cette unique observation. Par conséquent, une seconde PCR a été réalisée en utilisant cette fois-ci, une amorce sens située en amont du gène  $pelB$  et une amorce anti-sens située sur le gène de résistance à la phléomycine. En procédant de la sorte, il est possible à la fois de confirmer la présence de la cassette dans le génome des deux mutants mais également de s'assurer qu'elle y est insérée au bon *locus*. Etant donné que les bandes (6) et (7) affichent une taille d'amplification de 1785 bp et qu'aucune bande n'a migré lorsque ces amorces ont été mises en présence de l'ADN de la souche sauvage, il est possible de constater que les mutants  $\Delta pelB$  et  $\Delta pelA\Delta pelB$  ont correctement intégré la cassette de remplacement contenant le gène de résistance à la phléomycine au *locus* souhaité. Ainsi, les mutants  $\Delta pelB$  et  $\Delta pelA\Delta pelB$  construits dans le cadre de ce travail peuvent être considérés comme valides et utilisés pour la suite des expériences.

## 1.2 TEST DE COLONISATION *in planta*

### 1.2.1 Test de colonisation individuelle

Afin de mettre en évidence la façon dont la souche sauvage et la souche mutante  $\Delta pelA\Delta pelB$  se comportent *in planta*, des tests de colonisation ont été réalisés en inoculant chacune d'elle séparément sur des racines de tomates s'étant développées durant 5 jours sur milieu Hoagland gélosé. L'évolution de la colonisation a été évaluée à 1, 3 et 7 jours après inoculation (**Figure 15**).

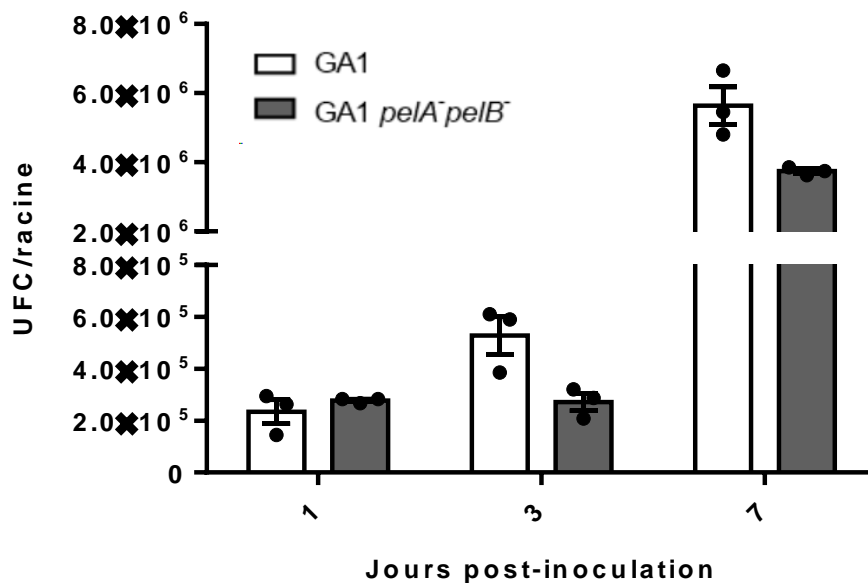


Figure 15. Evolution de la population bactérienne de *B. velezensis* GA1 et  $\Delta pelA\Delta pelB$  colonisant les racines de tomate en fonction du temps (moyennes  $\pm$  erreur standard, n=3). La population bactérienne présente sur les racines après 1, 3 et 7 jours a été évaluée via comptage sur boîtes de milieu LB.

La colonisation des racines de tomate par les deux souches est sensiblement identique après les premières 24h. Par contre, après trois jours, la souche sauvage présente une population bactérienne deux fois supérieure à celle retrouvée sur les racines inoculées avec le mutant. Cette différence de colonisation des racines est encore visible après sept jours, la population de la souche sauvage étant 1,5 fois plus élevée que celle du double mutant. Bien que le double mutant présente une augmentation de sa population bactérienne entre 1 et 7 jours, celle-ci se fait de façon moins rapide que pour la souche sauvage.

Lors de la colonisation des racines, les deux souches peuvent métaboliser les exsudats racinaires relargués de façon continue par la plante pour augmenter leur biomasse (Dennis *et al.*, 2010). Cependant, la souche sauvage peut potentiellement faire usage d'une source de carbone dont ne pourra pas bénéficier la souche mutante, étant donné que cette dernière n'exprime plus les gènes codant pour les deux enzymes de dégradation de la pectine initialement présents dans son génome. Il en ressort que la faculté de pouvoir dégrader la pectine de la paroi de cellules végétales semble conférer un avantage à la souche sauvage dans son aptitude à la colonisation des racines.



### 1.2.2 Test de colonisation en compétition

Dans le but de vérifier l'hypothèse émise au point précédent, la souche sauvage et le double mutant *ΔpelAΔpelB* ont été mis en compétition pour la colonisation des racines. Pour ce faire, ils ont été inoculés sur des plantules de tomates, à une même concentration et en des proportions identiques (1:1). L'évolution de la proportion de chaque souche sur les racines a été évaluée à 1, 3 et 7 jours après inoculation (**Figure 16**).

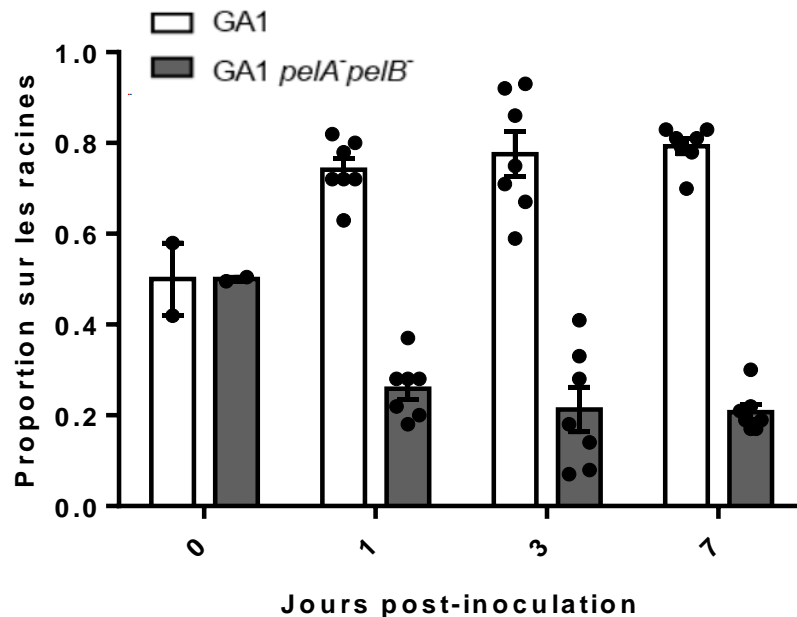


Figure 16. Evolution de la proportion de *B. velezensis* GA1 et *ΔpelAΔpelB* colonisant les racines de tomate en fonction du temps (moyenne  $\pm$  erreur standard,  $n=7$ , 2 expériences indépendantes). Les populations bactériennes présentes sur les racines après 1, 3 et 7 jours ont été évaluées par comptage. La population bactérienne totale est obtenue par comptage sur boîte de milieu LB tandis que la population du mutant *ΔpelAΔpelB* est obtenue par comptage sur boîtes de milieu LB supplémenté de chloramphénicol.

Au cours des premières 24h de colonisation des racines, la population du génotype *ΔpelAΔpelB* chute drastiquement comparée à celle du génotype sauvage qui augmente de façon notable. En effet, le double mutant voit sa population passer de 46% à 26% alors que celle de la souche sauvage passe de 54% à 74%.

Pour les jours suivants, les populations bactériennes présentes sur les racines se maintiennent au même niveau que celles rencontrées après un jour, la souche sauvage étant toujours majoritaire. Ce test de compétition semble indiquer également que le fait de pouvoir dégrader la pectine confère un avantage non négligeable à la bactérie dans sa faculté à coloniser les racines des végétaux. En effet, lorsque les deux souches ont été inoculés séparément, la colonisation racinaire observée après les premières 24h ne présentait pas de différence notable en fonction de la souche (**Figure 15**). Par contre, la figure présentée

ci-dessus montre que le double mutant est nettement désavantagé dans son fitness en situation de compétition comparé au génotype sauvage et que ce désavantage lui est préjudiciable dès les premières 24h de compétition.

Néanmoins, une question persiste quant à la disponibilité de ces fragments de pectine pour le double mutant lorsque les deux souches sont inoculées simultanément sur une même racine. En effet, les potentielles pectate lyases synthétisées par la souche sauvage sont probablement secrétées dans le milieu extracellulaire (Pedrolli *et al.*, 2009 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014). Par conséquent, la dégradation de la pectine se fait hors de la bactérie, ce qui implique que les fragments relargués par la souche sauvage devraient également être disponibles pour le mutant. Etant donné la vitesse avec laquelle la proportion de mutant chute après les premières 24h, il semblerait que ces derniers ne puissent pas tirer avantage des produits de dégradation de la pectine générés par la souche sauvage. Une possible explication à ce phénomène serait qu'une certaine ségrégation entre les souches prendrait place au niveau des racines. Ces dernières se regrouperaient alors sous forme d'amas cellulaires distincts au niveau des racines, ce qui impliquerait que les enzymes et métabolites relargués par chaque souche resteraient confinés dans leur matrice de biofilm respective. De la sorte, la zone de migration des fragments de pectine serait restreinte aux amas cellulaires formés par la souche sauvage.

A l'issue de ces deux tests de colonisation, il semblerait que les produits de dégradation de la pectine générés par les potentielles pectate lyases PelA et PelB puissent être utilisés par la bactérie pour augmenter sa biomasse et donc améliorer sa faculté de colonisation des racines. Par conséquent, il s'avère nécessaire de comparer le comportement de ces deux souches en culture liquide, en présence de différents fragments de pectine, afin de constater si les polymères, les oligomères ou encore les monomères issus de la dégradation de cette dernière peuvent être éventuellement utilisés comme source de carbone par la bactérie.

### 1.3 EVOLUTION DE LA CROISSANCE DE *B. VELEZENSIS* GA1 EN PRESENCE DE FRAGMENTS DE PECTINE

Afin d'évaluer la manière dont la souche sauvage se comporte en présence de fragments de pectine, des cultures liquides en milieu RE ½ supplémenté de 0,1% de pectines hautement et faiblement méthylées extraites de racines de tabac (PEC et POX respectivement, générées en collaboration avec le laboratoire BIOPI de l'Université d'Amiens) ou de galacturonate faiblement et hautement méthylé, d'acides polygalacturoniques et d'acide galacturonique purs issus du commerce (GLM, GHM, PGA, AG respectivement) ont été réalisées. La croissance bactérienne a été suivie durant 48h par mesure de densité optique.

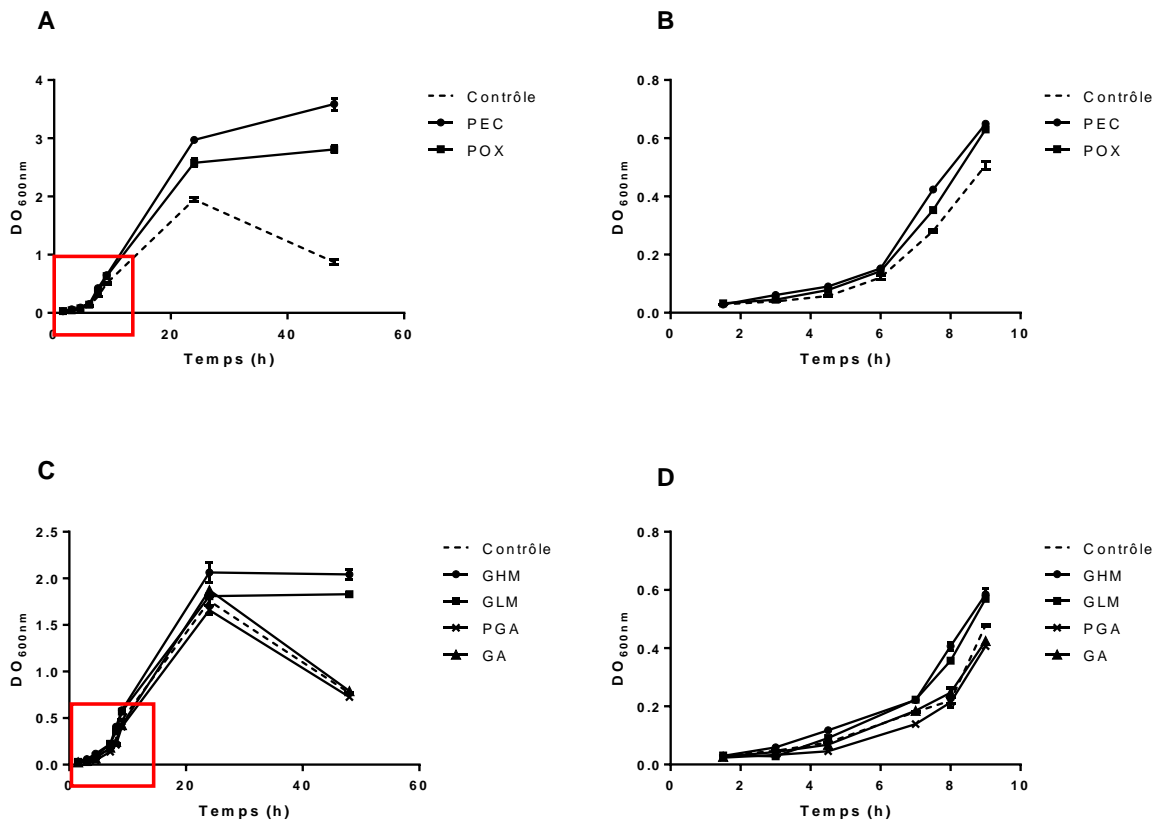


Figure 17. Suivis de croissance de *B. velezensis* GA1 sur milieu RE ½ supplémenté de 0,1% de fragments de pectine (moyenne  $\pm$  erreur standard, n=3). (A) Suivi de croissance sur milieu supplémenté de 0,1% de pectines hautement et faiblement méthylées (PEC et POX respectivement) issues de fraction de racines de tabac. (B) Zoom sur les premiers temps de culture du graphique (A). (C) Suivi de croissance sur milieu supplémenté de 0,1% de pectines hautement et faiblement méthylées (GHM et GLM respectivement), d'acide polygalacturonique (PGA), d'acide galacturonique (GA). (D) Zoom sur les premiers temps de culture du graphique (C).

Comme le montre la **Figure 17B**, la présence de PEC et POX dans le milieu de culture engendre une légère augmentation de la croissance de *B.velezensis* GA1 entre 6h et 9,5h. Le même phénomène est également observé en présence des polymères purs de pectines faiblement et hautement méthylés (**Figure 17D**). Cependant, entre 24h et 48h, les courbes de croissance obtenues en présence des pectines faiblement et hautement méthylées (aussi bien PEC et POX que GLM et GHM) se différencient d'autant plus de celle obtenue sur le milieu contrôle. En effet, durant cet intervalle de temps, la croissance de la souche sauvage est soit légèrement augmentée (**Figure 17A**), soit stabilisée (**Figure 17C**) en présence de ces polymères dans le milieu de culture tandis que dans le milieu de culture témoin, la densité optique chute significativement. Pour ce qui est des acides galacturonique et polygalacturoniques, leur présence dans le milieu de culture n'engendre aucune différence de croissance notable comparée à celle observée sur milieu témoin (**Figure 17C**). De plus, tout comme sur le milieu témoin, la croissance de la bactérie chute brutalement après 24h. Ceci laisse donc sous-entendre que les PGA et les monomères GA ne sont pas utilisés comme source de carbone par la bactérie dans ces conditions.

Etant donné qu'en présence de GLM et de GHM la densité optique n'augmente pas entre 24h et 48h (**Figure 17C**), il paraît peu probable que les produits de dégradation de ces homogalacturonanes soient utilisés par la bactérie comme source de carbone supplémentaire pour générer de la biomasse à ce stade-là. Cependant, en présence de PEC et POX, la croissance bactérienne est augmentée de façon notable entre 9h et 24h de culture (**Figure 17A**). De plus, toujours en présence de ces deux extraits, la densité optique augmente encore légèrement après 24h de culture. Par conséquent, une hypothèse peut être émise : les pectines faiblement et hautement méthylées extraites des racines de tabac contiennent d'autres poly/monosaccharides métabolisables par la bactérie. En effet, contrairement aux composés purs qui sont constitués majoritairement de poly/monomères d'acide galacturonique, les pectines contenues dans les deux fractions de racine sont plus hétérogènes et diversifiées (présence de rhamnogalacturonanes I et II), ces dernières pouvant présenter des chaînes latérales de divers sucres simples greffées au niveau du squelette de polymère d'acide galacturonique (Voragen *et al.*, 2009 ; Srivastava *et al.*, 2017). Les compositions en monosaccharides obtenues après hydrolyse acide totale des deux extraits montrent en effet des proportions relativement importantes de rhamnose, d'arabinose ou de xylose composant typiquement les RGI et RGII (**Figure 18**).

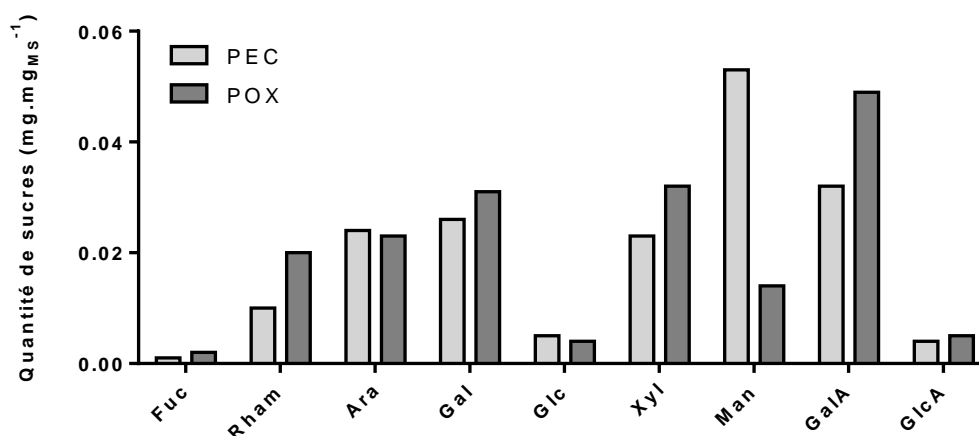


Figure 18. Analyse séquentielle des sucres présents dans les fractions de racines de tabac PEC et POX (réalisée par le Laboratoire BIOPI de l'Université de Picardie Jules Verne d'Amiens). Fuc = fucose, Rham = rhamnose, Ara = arabinose, Gal = galactose, Glc = glucose, Xyl = xylose, Man = mannose, GalA = acide galacturonique, GlcA = acide glucuronique.

Il est cependant possible que divers monosaccharides soient présents dans les deux fractions à l'issue de leur préparation et ce en des quantités variables selon la fraction racinaire considérée. Par conséquent, l'ajout des fractions de racines de tabac au milieu de culture est susceptible d'apporter une source de sucres simples additionnelle à ceux déjà présents dans le milieu de culture de base, que la bactérie est capable de métaboliser. Ceux-ci pourraient donc contribuer à l'augmentation de croissance observée entre 9h et 24h en présence de PEC et POX. Une analyse en sucres simples avant hydrolyse totale sera réalisée sur les fractions PEC et POX nouvellement générées afin de pouvoir répéter l'expérience.

Concernant la chute de densité optique apparaissant après 24h, elle pourrait potentiellement être causée par une mort cellulaire importante étant donné que le milieu de culture n'est pas renouvelé au cours de l'expérience. Vu que cette chute n'est pas observée en présence de pectines faiblement et hautement méthylées (GLM, GHM, PEC, POX), cela peut signifier que ces molécules auraient potentiellement un impact sur la viabilité des cellules, mais qu'elles ne contribueraient pas nécessairement à la formation de biomasse à ce stade tardif de croissance.

### **1.3.1 Evaluation de la viabilité des cellules et de leur activité métabolique entre 24h et 48h**

Afin de tenter de comprendre quel est le phénomène susceptible d'expliquer cette différence de densité optique observable après 24h de culture entre le milieu contrôle et les milieux supplémentés en polymères, la viabilité des cellules ainsi que leur activité métabolique après 24h et 48h de culture en présence et en absence de GLM a été évaluée via cytométrie en flux grâce au test PI (marquage à l'iode de propidium) et au test RSG (marquage au Redox Sensor Green) respectivement.

#### **1.3.1.1 Viabilité des cellules**

La viabilité des cellules a été évaluée par marquage à l'iode de propidium. En effet, cette molécule lipophile a la capacité de se lier à l'ADN double brin en s'intercalant entre les paires de bases. Par conséquent, les cellules viables présentant une membrane intègre empêchent le marqueur de se lier à l'ADN contrairement aux cellules mortes ou endommagées présentant une membrane fragilisée. En se liant à l'ADN, le PI émet une fluorescence, mesurable via cytométrie en flux à 617 nm.

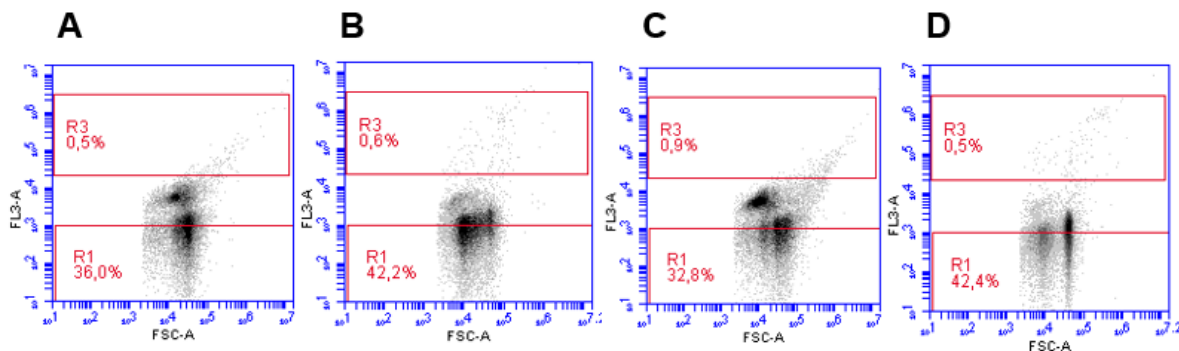


Figure 19. Test PI sur les cultures de *B. velezensis* GAI en présence et en absence de GLM après 24h et 48h. La fluorescence est mesurée à 617nm (FL3-A) en fonction de la taille des cellules (FSC-A). Ces deux variables sont exprimées en unité arbitraires. (A) Milieu RE ½ à 24h de culture, (B) Milieu RE ½ à 48h de culture, (C) Milieu RE ½ + 0,1% GLM à 24h de culture, (D) Milieu RE ½ + 0,1% GLM à 48h de culture.

Les cytogrammes A et B montrent qu'en absence de GLM, la mortalité cellulaire est pratiquement négligeable que ce soit après 24h (0,5%) ou 48h (0,6%) de culture. Le même constat peut être dressé pour les cultures réalisées en présence de GLM (**Figures 19C et D**) qui affichent également une mortalité cellulaire négligeable après 24h (0,9%) et 48h (0,5%). Par conséquent, ce n'est pas le phénomène de lyse cellulaire qui peut expliquer la chute de densité optique observée à partir de 24h (**Figure 17**). Néanmoins, un autre phénomène a pu être mis en évidence via la réalisation de ce test. En effet, selon les cytogrammes obtenus, il s'avère que les quatre populations présentent une sous-population affichant une perméabilité membranaire relativement importante. Cette dernière se situe entre les deux zones qui ont été délimitées sur chacun des cytogrammes, la zone supérieure indiquant les cellules lysées (Test PI positif) tandis que la zone inférieure indique les cellules complètement intègres (Test PI négatif). Ces cellules présentent donc une fluorescence au test PI, mais l'intensité de cette dernière ne dépasse pas le seuil défini que pour considérer les cellules comme étant mortes. Ce phénomène, encore peu compris à l'heure actuelle, a déjà été mis en évidence chez les bactéries Gram négatives telles que *Escherichia coli* et *Pseudomonas putida* et apparaît notamment lorsque ces dernières se trouvent dans un état de stress nutritionnel (Sassi *et al.*, 2019). Ainsi, cela laisse sous-entendre que la présence de GLM dans le milieu de culture ne semble pas conférer une source de carbone supplémentaire à la bactérie, étant donné que plus de la moitié de la population présente une perméabilité membranaire tout comme la population cultivée en l'absence de polymère.

### 1.3.1.2 *Activité métabolique*

L'activité métabolique des cellules a été évaluée par marquage au Redox Sensor Green (Test RSG). Le RSG est un indicateur de l'activité réductase des bactéries. Ce dernier pénètre dans les cellules et est réduit par les réductases impliquées dans la chaîne de transport des électrons liée à la respiration cellulaire. Lorsqu'il est réduit, le RSG émet une fluorescence mesurable au cytomètre en flux à 520 nm.

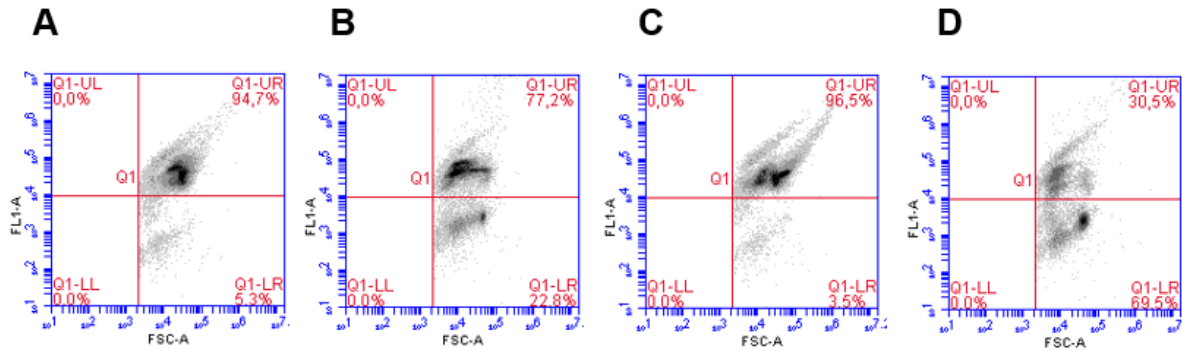


Figure 20. Test RSG sur les cultures de *B. velezensis* GA1 en présence et en absence de GLM après 24h et 48h. La fluorescence est mesurée à 520nm (FL1-A) en fonction de la taille des cellules (FSC-A). Ces deux variables sont exprimées en unité arbitraires. (A) Milieu RE ½ à 24h de culture, (B) Milieu RE ½ à 48h de culture, (C) Milieu RE ½ + 0,1% GLM à 24h de culture, (D) Milieu RE ½ + 0,1% GLM à 48h de culture

Les cytogrammes ci-dessus présentent l'activité métabolique de la population de *B.velezensis* GA1 en présence et en absence de GLM après 24h et 48h de culture. Dans les quatre cas, la majorité des cellules sont bien métaboliquement actives (valeurs de fluorescences supérieures au seuil de  $10^3$ ). Par contre, deux sous-populations se distinguent à la fois de par leur taille et de par leur activité métabolique. Sur milieu RE ½ et en présence de GLM, après 24h de culture, respectivement 95% et 97% de la population présente une activité métabolique élevée tandis que 5% et 3% de cette dernière affiche une activité métabolique moins importante (**Figure 20 A et C**). A 48h, la population présentant une forte activité métabolique a chuté à 77% et 30% respectivement, alors que la population moins métaboliquement active est passée à 23% et 69% (**Figure 20B et D**). Etonnement, sur milieu supplémenté de GLM, une plus grande partie de la population est moins métaboliquement active que sur le milieu contrôle. De plus, le **Figure 20D** montre clairement que les cellules présentant une activité métabolique moins importante sont celles qui affichent une taille cellulaire plus importante. En effet, la densité de population observée aux valeurs de FSC supérieures au seuil de  $2.10^4$  est beaucoup plus marquée que celle observée à des valeurs inférieures à ce même seuil. Par conséquent, il s'avère pertinent de s'intéresser plus en détail à la répartition de taille de la population de *B.velezensis* GA1 dans ces conditions de culture.

### 1.3.1.3 Taille des cellules

Selon les cytogrammes de viabilité cellulaire et d'activité métabolique, la nette diminution de densité optique observée sur milieu contrôle n'est pas la conséquence d'une mortalité cellulaire élevée comparé au milieu supplémenté de GLM. Cependant, une différence de taille cellulaire a été mise en évidence au cours des tests PI et RSG selon que le GLM était présent ou non dans le milieu de culture. Afin d'obtenir un cytogramme mettant en évidence uniquement le paramètre taille, aucun fluorochrome n'a été ajouté à l'échantillon de culture bactérienne. Ainsi, la fluorescence FL1 mesurée par le cytomètre est uniquement due à la fluorescence naturelle des cellules.

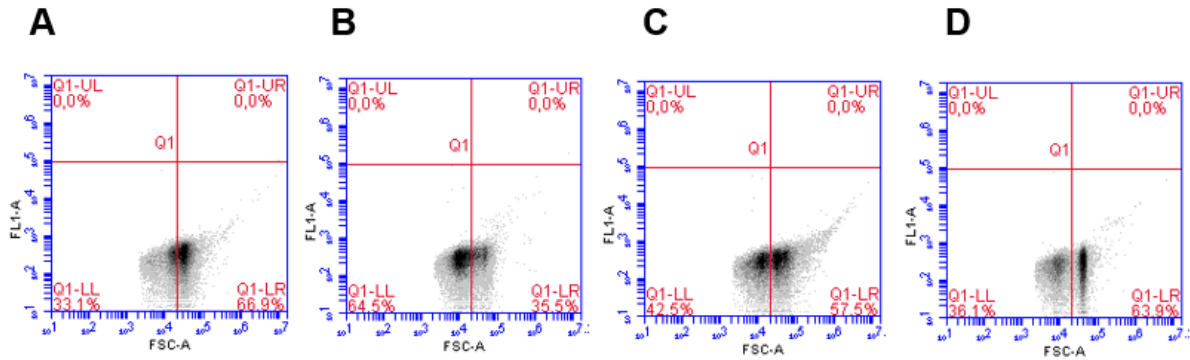


Figure 21. Cytogrammes affichant la fluorescence naturelle des cellules (FL1-A) en fonction de la taille des cellules (FSC-A). (A) Milieu RE  $\frac{1}{2}$  à 24h de culture, (B) Milieu RE  $\frac{1}{2}$  à 48h de culture, (C) Milieu RE  $\frac{1}{2}$  + 0,1% GLM à 24h de culture, (D) Milieu RE  $\frac{1}{2}$  + 0,1% GLM à 48h de culture.

Les cytogrammes ci-dessus présentent la répartition de taille de la population bactérienne de *B.velezensis* GA1 en présence et en absence de GLM après 24h et 48h de culture. En présence et en absence de GLM, respectivement 58% et 67% de la population bactérienne totale présente une taille supérieure au seuil fixé tandis que 43% et 33% de cette même population présente une taille inférieure à ce même seuil après 24h (**Figures 21A** et **C**). Ce phénomène de différenciation cellulaire est d'autant plus marqué après 48h de culture. En absence de GLM, la population bactérienne présentant une taille supérieure au seuil fixé a chuté à 36% (**Figure 21B**) alors qu'en présence de GLM elle est passée à 64% (**Figure 21D**). Ceci indique qu'en l'absence de GLM, la majorité de la population bactérienne totale présente une taille inférieure à celle qu'elle affichait après 24h de culture alors qu'en présence de GLM, cette dernière est maintenue relativement constante. Cette observation est donc susceptible d'expliquer le maintien de densité optique observé au niveau des courbes de croissances en présence de galacturonate faiblement et hautement méthylé, comparé à la nette diminution observée dans le milieu contrôle (**Figure 17**). Comme explicité aux points précédents, cette chute n'est vraisemblablement pas causée par une mort cellulaire étant donné que les fluorescences mesurées au PI au niveau de la zone de mortalité cellulaire est négligeable. De plus, le test RSG indique que la grande majorité des cellules présentent une activité métabolique importante en présence et en absence de GLM. Par conséquent, ces cellules de petite taille seraient majoritairement des cellules végétatives et pas des spores. Le GLM pourrait donc potentiellement agir tant que molécule signal capable d'induire des changements physiologiques sur les cellules de *Bacillus*.

### 1.3.2 Evaluation du niveau d'expression des gènes *pelA* et *pleB*

Selon les courbes de croissance présentées à la **Figure 17**, la pectine pourrait éventuellement être dégradée et métabolisée par la bactérie entre 6h et 24h de culture étant donné que sur cet intervalle de temps, un écart de densité optique est déjà notable entre le milieu témoin et les milieux supplémentés



de pectines faiblement et hautement méthylées pures ainsi que pour celles issues des fractions de racines de tabac. Afin de vérifier cette hypothèse, les niveaux d'expression des gènes *pelA* et *pelB* de *B.velezensis* GA1 ayant été mis en culture sur milieu RE ½ liquide en présence de 0,1% de GLM, PEC, POX ont été évalués par RT-qPCR (**Figure 21**).

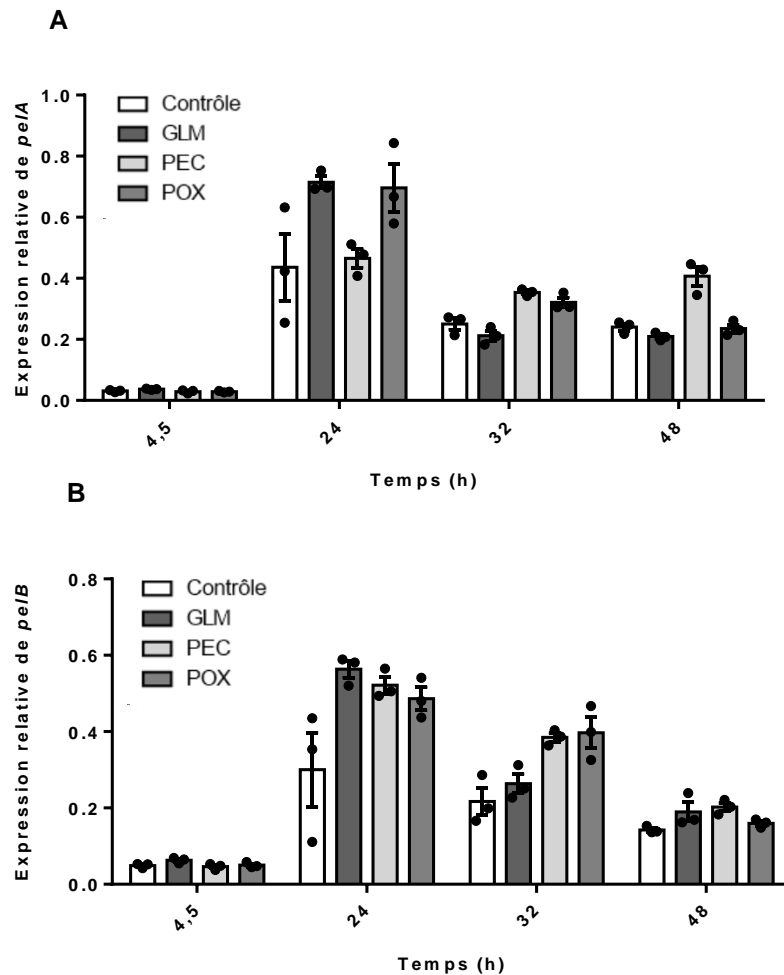


Figure 22. Quantification relative du niveau d'expression des gènes *pelA* (A) et *pelB* (B) (moyenne  $\pm$  erreur standard, n=3). Les niveaux d'expression des deux gènes sont exprimés par rapport au niveau d'expression du gène de la gyrase (*gyrA*) utilisé tant que gène de référence, son expression étant considérée comme stable au cours du temps dans les conditions testées.

Que ce soit pour les gènes *pelA* ou *pelB* leur niveau d'expression est maximal après 24h de culture lorsque le milieu est supplémenté de pectines faiblement ou hautement méthylées. A ce moment précis, l'expression de *pelA* est majoritairement stimulée par les pectines faiblement méthylées (GLM et POX) alors que l'expression de *pelB* est à la fois stimulée par les pectines faiblement et hautement méthylées. Avant 9h, le niveau d'expression des gènes codant pour les deux potentielles pectate lyases est relativement faible. Par conséquent, ces résultats laissent sous-entendre que les polymères de pectine seraient dégradés de manière plus accrue entre 24h et 32h étant donné que la transcription des gènes et

la traduction des protéines sont deux phénomènes qui ne se déroulent pas simultanément. Ces résultats doivent donc être mis en relation avec une évaluation de l'activité de ces enzymes synthétisées.

### 1.3.3 Evaluation de l'activité totale des pectate lyases

Au vu des résultats obtenus concernant les niveaux d'expression des gènes *pelA* et *pelB*, l'activité enzymatique totale des potentielles pectate lyases présentes dans les surnageants de culture de *B. velezensis* GA1 a été évaluée à différents temps de la culture (**Figure 23**).

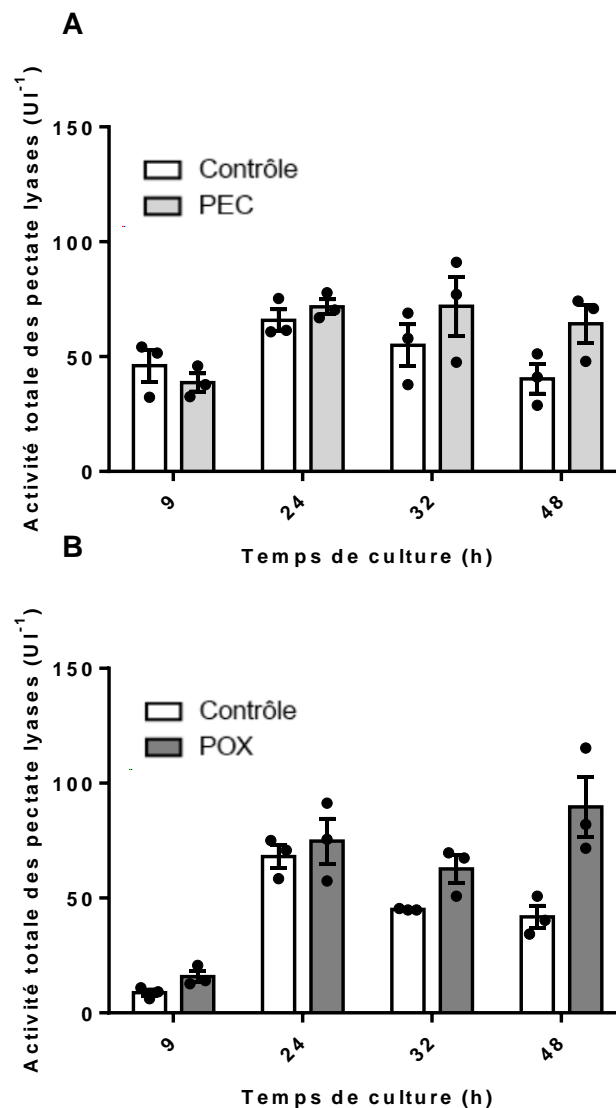


Figure 23. Evolution de l'activité enzymatique totale des pectate lyases présentes dans les surnageants de culture supplémentés de PEC (A) et POX (B) en fonction du temps de la culture (moyenne  $\pm$  erreur standard,  $n=3$ ). L'activité enzymatique des pectate lyases est évaluée en dosant la quantité d'oligogalacturonates insaturés libérés au cours du temps. Pour les surnageants PEC et POX, les substrats utilisés pour suivre les réactions enzymatiques sont le GHM et le GLM respectivement.

La fonction supposée des enzymes codées par les gènes *pelA* et *pelB* est le fruit d'une prédiction bio-informatique. Par conséquent, cette dernière se doit d'être confirmée via expérimentation. Le dosage des oligogalacturonates insaturés est fréquemment utilisé dans la littérature pour mettre en évidence l'activité des pectate lyases (Collmer *et al.*, 1988 ; Combo *et al.*, 2011). En effet, contrairement aux autres pectinases, ces dernières clivent les polymères d'acide galacturonique via un mécanisme de  $\beta$ -élimination, générant ainsi des oligogalacturonates insaturés qui peuvent être dosés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 232 nm. Sur cette base, les graphiques A et B de la **Figure 23** révèlent bien une activité enzymatique qui évolue au cours du temps en dosant les oligogalacturonates insaturés. Cela signifie que les gènes *pelA* et *pelB* codent effectivement bien pour des pectate lyases fonctionnelles.

La **Figure 23** montre également que les pectate lyases présentes dans les surnageants de culture sont particulièrement actives dans la deuxième phase de la culture, entre 24h et 48h. Ces résultats sont en accord avec ce qui a pu être observé au niveau transcriptionnel dans le sens où les gènes *pelA* et *pelB* sont hautement exprimés après 24h de culture. Etant donné que la transcription des ARNm et la traduction des protéines sont deux phénomènes qui ne se produisent pas de façon simultanée, il faut s'attendre à ce que l'activité maximale des enzymes soit observée avec un décalage dans le temps par rapport au moment où le gène est hautement exprimé. C'est ce qui est observé dans le cas présent, à savoir les gènes *pelA* et *pelB* sont hautement exprimés après 24h tandis que les activités enzymatiques maximales sont détectées entre 32h et 48h. Cette activité maximale détectée à des temps de culture avancés peut également être dû à une certaine activation des enzymes par le changement de pH du milieu se produisant au cours de la culture bactérienne. En effet, le pH final de toutes les cultures bactériennes réalisées (aussi bien sur le milieu contrôle que sur les milieux supplémentés de 0,1% de PEC, POX, GLM, GHM, PGA, AG), se situait aux alentours de 8,5 alors que le pH initial était de 6,5. Selon la littérature, les bactéries du genre *Bacillus* sont connues comme étant productrices de pectate lyases alcalines (Hoondal *et al.*, 2002 ; Pedrolli *et al.*, 2009 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014). Par conséquent, ce pH alcalin retrouvé en fin de culture pourrait contribuer à l'activation des deux pectate lyases de *B.velezensis* GA1. Notons qu'avant 24h, l'activité enzymatique affichée est relativement faible. De plus, les pentes des droites ajustées à la partie linéaire des cinétiques enzymatiques obtenues pour les surnageants de 9h en présence de PEC (**Figure 23A**) présentaient de faibles coefficients de régression. Par conséquent, ces pentes peuvent être surestimées, ce qui en conséquence surestime l'activité enzymatique calculée.

Ensuite, les pectines faiblement et hautement méthylées ajoutées au milieu de culture semblent stimuler ces enzymes. En effet, dans ces conditions, leur activité est maintenue relativement constante après 24h alors que cette dernière diminue dans le milieu de culture témoin. Ce résultat suggère que les pectate lyases de *B.velezensis* ont une affinité pour les pectines méthylées. Cela peut être appuyé par le fait qu'aucune pectine méthyle estérase n'a été identifiée dans le génome de *B.velezensis* (**Tableau 3**).

Par conséquent, les produits de dégradation de ces enzymes seraient essentiellement des oligomères d'acide galacturonique méthylés. Ces derniers pourraient potentiellement agir comme signal impliqué dans la stagnation de croissance observée entre 24h et 48h en présence de pectines hautement et faiblement méthylées étant donné que ce phénomène n'est pas observé lorsque les acides (poly)galacturoniques non méthylés (PGA et GA) sont ajoutés au milieu de culture de la bactérie. Le fait que l'activité enzymatique après 24h en présence de PEC et POX soit plus importante que sur le milieu contrôle peut également s'expliquer par les niveaux d'expression des gènes *pelA* et *pelB* observés au cours du temps. En effet, ces derniers sont la plupart du temps supérieurs à ceux observés sur le milieu contrôle. Ainsi, la stimulation du gène entraîne logiquement une synthèse plus importante de protéines. Par conséquent, un nombre plus important d'enzymes seraient excrétées par la bactérie dans le milieu de culture, ce qui en retour contribuerait à l'augmentation d'activité observée.

Au vu des niveaux d'expression des gènes *pelA* et *pelB* et de l'activité enzymatique mesurée avant 24h, il paraît peu probable que les polymères de GLM et GHM soient dégradés en oligomères métabolisables par la bactérie entre 6h et 24h et puissent expliquer le léger écart de densité optique observé par rapport au milieu témoin (**Figure 17**). De plus, bien que l'activité enzymatique soit maximale entre 24h et 48h dans les cultures ayant été supplémentées avec les extraits de pectine de racines de tabac PEC et POX, aucune augmentation de biomasse n'a été observée durant cet intervalle de temps au niveau des courbes de croissance. Par conséquent, les produits de dégradation ne seraient effectivement pas utilisés comme source de carbone métabolisable par *B. velezensis* GA1.

#### 1.4 EVOLUTION DE LA CROISSANCE DU DOUBLE MUTANT EN PRESENCE DE POLYMERS PURS DE PECTINE

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle les produits de dégradation des pectines hautement et faiblement méthylées ne sont pas utilisés comme source de carbone par *B. velezensis* GA1, la souche mutante  $\Delta pelA \Delta pelB$  a été mise en culture liquide sur milieu RE ½ en présence de GLM et de GHM et les croissances bactériennes ont été suivies durant 48h par mesure de densité optique (**Figure 24**).

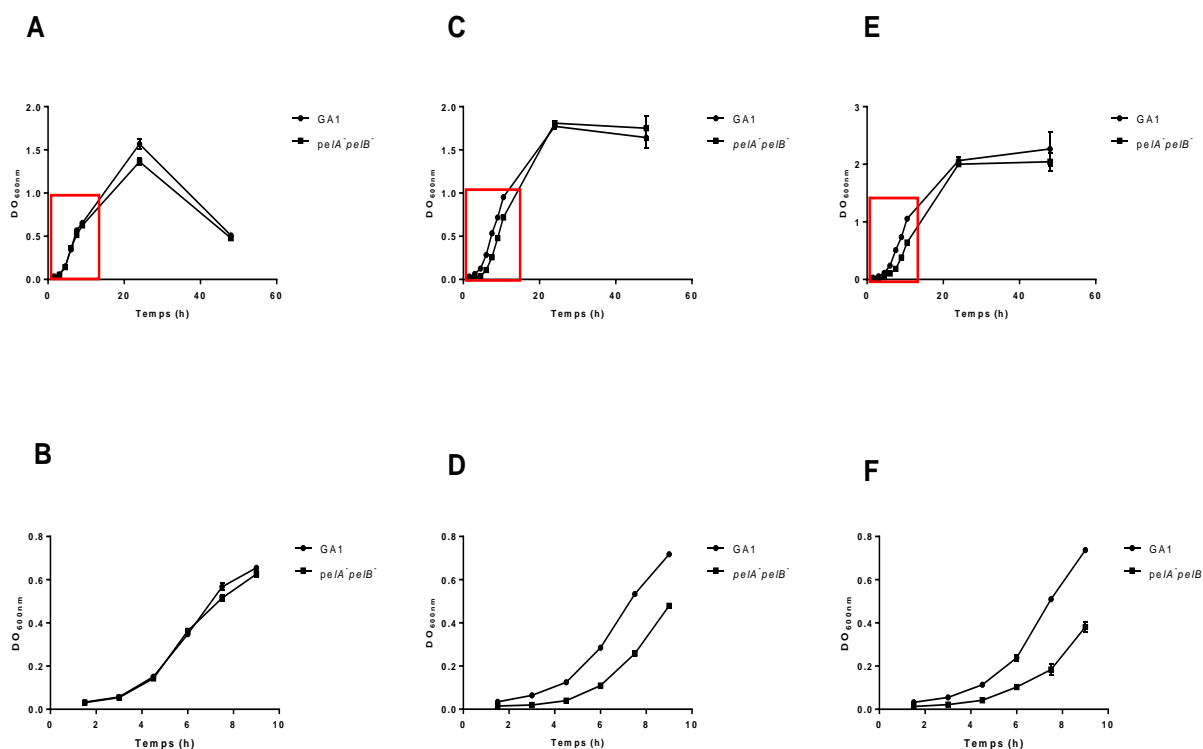


Figure 24. Suivis de croissance de *B. velezensis* GA1 et  $\Delta pelA\Delta pelB$  (moyenne  $\pm$  erreur standard,  $n=3$ ). (A) Suivis de croissance des deux souches sur milieu RE  $\frac{1}{2}$ . (B) Zoom sur les premiers temps de culture du graphique (A). (C) Suivis de croissance des deux souches sur milieu supplémenté de 0,1% GLM. (D) Zoom sur les premiers temps de culture du graphique (C). (E) Suivis de croissance des deux souches sur milieu supplémenté de 0,1% GHM. (F) Zoom sur les premiers temps de culture du graphique (C).

En présence de GLM et de GHM, la croissance du mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$  est considérablement ralentie comparée à celle du génotype sauvage (**Figure 24 D et F**). Par contre, ce retard de croissance est rattrapé à partir de 24h où aucune différence notable ne subsiste entre les deux souches (**Figure 24 C et E**). En parallèle de cela, la croissance du mutant sur milieu non supplémenté en polymère est similaire à celle de la souche sauvage (**Figure 24 A et B**). Par conséquent, la présence de pectines faiblement et hautement méthylées dans le milieu de culture semble impacter négativement la croissance de la bactérie lorsque cette dernière n'est plus capable de les dégrader. Étonnamment, entre 24h et 48h, la croissance cellulaire du double mutant reste constante tout comme ce qui avait été observé précédemment lorsque la souche sauvage avait été mise en présence de GLM et de GHM. Ainsi, il paraît donc peu probable que ce maintien apparent du niveau de biomasse soit dû au fait que la bactérie puisse utiliser les produits de dégradation de la pectine comme source de carbone. En effet, si cela avait été le cas, l'allure de la courbe de croissance du double mutant  $pelA\Delta pelB$  aurait dû se rapprocher de celle observée sur milieu RE  $\frac{1}{2}$  entre 24h et 48h (i.e. présence d'une chute brutale de DO). Il en ressort que ce maintien du niveau de biomasse est indépendant de l'activité des pectate lyases (i.e. de la dégradation de la pectine en oligomères ou monomères métabolisables). Étant donné que ce plateau est observé en présence de GLM et de GHM à la fois chez la souche sauvage capable de dégrader la pectine et chez la souche mutante

qui ne peut plus la dégrader en oligomères, ce phénomène est indépendant du degré de polymérisation des deux molécules. Les pectines faiblement et hautement méthylées (dégradées ou non) agiraient donc plutôt comme un signal permettant à la bactérie de maintenir constante sa taille cellulaire dans les stades avancés de culture (entre 24h et 48h). Cependant, le phénomène de ralentissement de croissance en présence de GLM ou de GHM observé pour les mutants reste pour l'instant difficile à interpréter.

## 2 UTILISATION DE LA PECTINE EN TANT QU'INDUCTEUR DE LA PRODUCTION DE SURFACTINE

### 2.1 EVALUATION DE LA PRODUCTION DE SURFACTINE *in planta*

En parallèle à l'évolution de la colonisation racinaire par la souche sauvage et le mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$  présentée au point 1.2.1, la production de surfactine *in planta* a également été mesurée à 1 et 7 jours après inoculation (**Figure 25**). Préalablement à la réalisation de cette expérience, la production de surfactine par le double mutant en culture liquide sur milieu RE ½ a été comparée à celle de la souche sauvage afin d'évaluer si ce dernier a potentiellement été impacté par l'inactivation des gènes *pelA* et *pelB*. Il s'est avéré que le mutant affiche une production de surfactine comparable à celle de la souche sauvage sur milieu RE ½ en l'absence de polymère (**Annexe 7**). Ceci indique donc que sa faculté à synthétiser de la surfactine n'a pas été altérée.

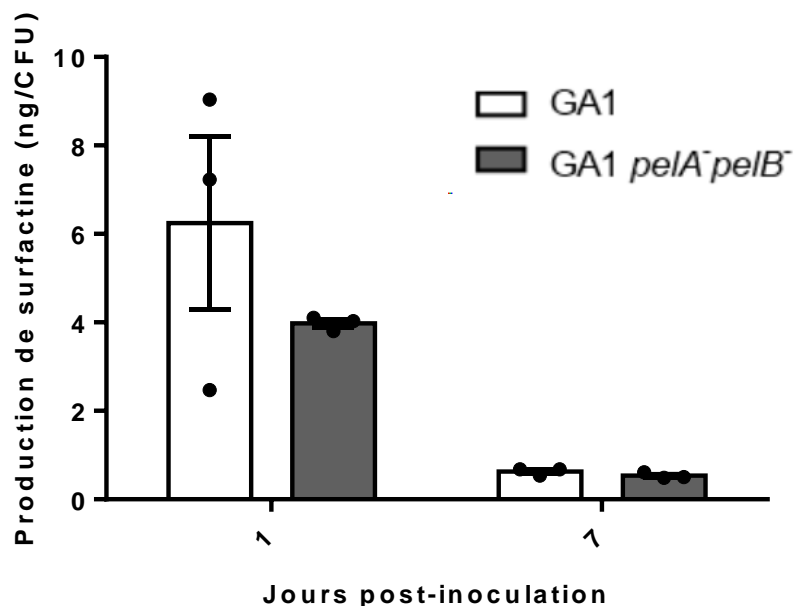


Figure 25. Evolution de la production de surfactine par *B. velezensis* GA1 et  $\Delta pelA\Delta pelB$  à 1 et 7 jours après inoculation sur plants de tomate (moyenne  $\pm$  erreur standard,  $n=3$ ). La surfactine a été récupérée directement du milieu de culture gélosé au moyen d'acétonitrile 100% avant d'être dosée par UPLC-MS.

Comme la montre la figure ci-dessus, la surfactine est majoritairement accumulée suivant les premières 24h post-inoculation aussi bien pour la souche sauvage que pour le double mutant. En effet, elle est 10 fois et 7,5 fois plus élevée que la production de surfactine observée après 7 jours respectivement pour la souche sauvage et pour le mutant. De plus, la souche sauvage, encore capable de dégrader les pectines, présente une production de surfactine 1,6 plus importante que celle présentée par le génotype  $\Delta pelA\Delta pelB$  à 24h. Notons que cette dernière est certainement sous-estimée car parmi les trois répétitions, une valeur significativement plus faible que les deux autres a été tenue en compte pour calculer la production moyenne de surfactine. Par conséquent, une hypothèse peut être émise au regard de ces premiers résultats, à savoir que les produits de dégradation des pectines par les pectate lyases *pelA* et *pelB* seraient capables d'être perçus par *B. velezensis* et d'agir entant que signaux inducteurs de la production de surfactine.

Cette observation peut être mise en lien avec l'avantage que présente la souche sauvage en terme d'aptitude à la colonisation des racines lorsqu'elle est mise en compétition avec le double mutant (**Figure 16**). En effet, après les premières 24h de compétition, la souche sauvage était majoritairement présente sur les racines de tomates, ce qui peut être dû à cette différence de production de surfactine entre les deux souches observable à la **Figure 25**. En effet, de nombreuses recherches ont mis en évidence l'implication de la surfactine dans la faculté de colonisation des racines par les PGPRs (Raaijmakers *et al.*, 2010 ; Pandin *et al.*, 2017 ; Fan *et al.*, 2018). De plus, il s'est avéré que les pectines sont capables d'induire la formation de biofilm chez *B. subtilis* NCIB 3610 en agissant en tant que signal transmis via les récepteurs kinases régulant la phosphorylation du gène *spo0A* impliqué dans la synthèse de biofilm (Beauregard *et al.*, 2013). Cette même souche est également capable de métaboliser les polysaccharides de la paroi végétale (dont les pectines) en vue d'utiliser les oligosaccharides générés pour contribuer à la formation de la matrice extracellulaire du biofilm. Ainsi, le mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$  pourrait donc potentiellement être impacté dans son aptitude à former des biofilms, ce qui aurait un impact négatif direct sur son aptitude à la colonisation. Les résultats présentés à la **Figure 25** laissent donc sous-entendre qu'il y aurait un lien entre le potentiel de dégradation de la pectine et le potentiel de production de surfactine *in planta* par *B. velezensis*.

## 2.2 EVALUATION DE L'INDUCTION DE PRODUCTION DE SURFACTINE PAR *B. VELEZENSIS* GA1 EN PRESENCE DE FRGMENTS DE PECTINE

Le fait que la souche sauvage colonise les racines de façon plus efficace que le mutant ne synthétisant plus les enzymes *PelA* et *PelB* (**Figure 16**) laisse sous-entendre que ces enzymes contribuent au fitness de la bactérie en modifiant les polymères de pectine. Par conséquent, les résultats présentés à la présente section visent à évaluer si les polymères intègres ou leurs possibles fragments résultants de l'activité enzymatique des deux pectate lyases sont impliqués dans la synthèse de surfactine.

Pour vérifier cette hypothèse, des cultures liquides de *B. velezensis* GA1 en milieu RE ½ supplémenté de 0,1% de pectines issues de fractions de racines de tabac (PEC et POX) ou de polymères/monomères purs de pectine (GLM, GHM, PGA, AG) ont été réalisées. La production de surfactine par rapport au milieu témoin (RE ½) a été évalué par UPLC-MS (**Figure 26**).

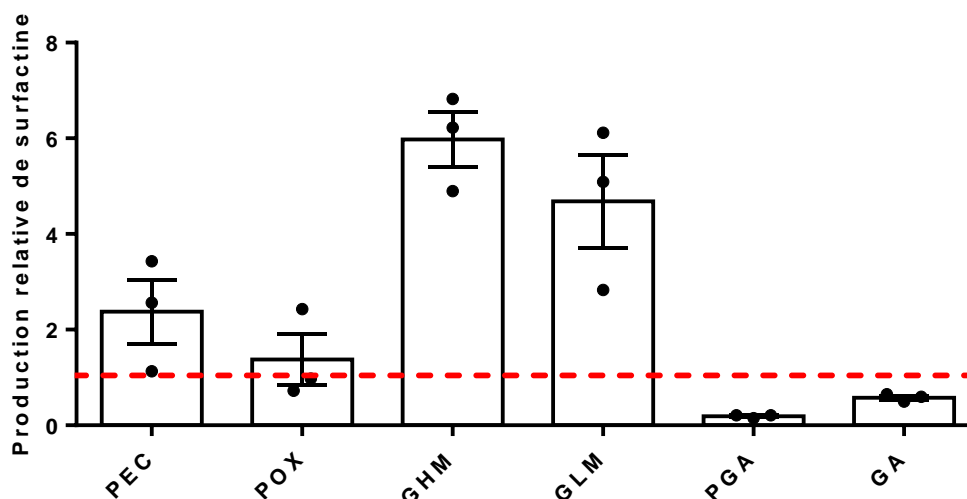


Figure 26. Production relative de surfactine par *B.velezensis* GA1 en présence de 0,1% de PEC/POX/GHM/GLM/PGA/GA G (moyenne  $\pm$  erreur standard, n = 3).

La **Figure 26** permet d’avoir une idée à la fois de l’effet du degré de polymérisation du fragment de pectine mais également de l’effet de son degré de méthylation sur l’anticipation de la production de surfactine. En présence des fractions racinaires enrichies en pectines hautement méthylées (PEC), la production de surfactine est amplifiée d’un facteur deux comparé au milieu témoin. Cette amplification de production est un peu moins visible pour les pectines faiblement méthylées issues des racines de tabac (POX) au vu de leur l’écart-type. Cependant, PEC et POX s’ils ont l’avantage d’être représentatifs de matériel pectique des racines de tabac, sont des extraits hétérogènes contenant un mélange de polymères, mal caractérisés par rapport à la taille et à la structure de ces derniers. Par conséquent, il s’est avéré nécessaire de comparer les productions relatives de surfactine en présence de polymères/monomères d’acide galacturonique purs (commerciallement disponibles) faiblement ou hautement méthylés afin de mettre en évidence uniquement l’effet du paramètre degré de polymérisation/méthylestérfication de la pectine sur l’induction de la production de surfactine.

Afin de constater si le niveau de méthylestérfication du polymère de pectine a une influence sur l’anticipation de production de surfactine, le milieu de culture témoin a été supplémenté de 0,1% de galacturonate hautement et faiblement méthylé (GHM et GLM). La **Figure 26** montre qu’en présence de ces deux polymères, la production de surfactine est notablement anticipée par rapport au milieu de culture témoin. En effet, cette dernière est respectivement 6 fois et 5 fois plus importante en présence



de GHM et de GLM. Par contre, aucune différence significative ne peut être mise en évidence entre la production observée en présence de GLM et de GHM. Par conséquent, le degré de méthylestérification du polymère ne semble pas avoir d'influence sur l'anticipation de production de surfactine.

Ensuite, l'effet du degré de polymérisation de la partie homogalacturonane de la pectine sur la production de surfactine par *B. velezensis* GA1 a été étudié. Pour ce faire, 0,1 % d'acides polygalacturoniques (i.e. fragments de faible degré de polymérisation par rapport au GLM et au GHM) et d'acide galacturonique ont été ajoutés au milieu de culture RE ½. Comme le montre la **Figure 26**, la présence des acides polygalacturoniques dans le milieu de culture n'induit pas d'anticipation de la production de surfactine comparé au milieu témoin. Il en est de même pour l'acide galacturonique. Ce résultat suggère que la production de surfactine ne serait pas anticipée par la reconnaissance d'oligo/monomères d'acide galacturonique.

Afin de confirmer les résultats obtenus en terme de production de surfactine, le niveau d'expression du gène *surfAA* intervenant dans la biosynthèse de cette dernière, a été évalué. En présence de GLM et de GHM, le gène *surfAA* est respectivement 3 fois et 2 fois plus exprimé que sur le milieu témoin. Pour ce qui est des acides polygalacturoniques et de l'acide galacturonique, leur présence dans le milieu de culture ne présente pas d'effet significativement notable sur l'induction de l'expression du gène *surfAA* (**Annexe 6**). Ces observations sont donc en accord avec ce qui a pu être observé au niveau de la production de surfactine. Cependant le niveau d'augmentation de l'expression du gène *surfAA* en présence de GLM et de GHM est relativement faible par rapport à l'augmentation de la production de surfactine observée sur base du dosage par UPLC-MS (**Figure 26**). Cette observation suggère que des mécanismes post-transcriptionnels interviennent dans l'augmentation de production de surfactine observée en présence de ces deux polymères de pectine.

Lorsque les résultats sont considérés dans leur ensemble, il est possible de constater que le degré de polymérisation du fragment de pectine semble être impliqué dans l'anticipation de la production de surfactine, ce qui ne semble pas être le cas pour le degré de méthylation. En effet, le GLM et le GHM sont des polymères caractérisés par un degré de polymérisation plus important que ceux des acides polygalacturoniques. De plus, l'anticipation de la production de surfactine se produit généralement après 4,5h – 6h de culture (généralement lorsque la densité optique de la culture est d'environ 0,1), moment où les gènes *pelA* et *pelB* sont très faiblement exprimés, tout comme les activités enzymatiques associées (**Figure 22** et **Figure 23**). Ceci laisse donc sous-entendre que ce sont des polymères qui sont probablement reconnus entant que signal induisant une anticipation de production de surfactine, ce qui pourrait expliquer que ce phénomène n'est pas observé en présence d'oligomère (PGA) et de monomères (GA) d'acide galacturonique, leur degré de polymérisation étant probablement trop faible que pour être reconnu comme signal.

# CONCLUSION & PERSPECTIVES

---

Le dialogue moléculaire qui s'installe entre la plante hôte et les bactéries PGPRs reste aujourd'hui encore peu connu. Pourtant, au cours de ces dernières années, quelques études semblent indiquer qu'une succession d'échanges de molécules signales entre les deux partenaires permettrait à la fois un meilleur établissement de la bactérie au sein de la rhizosphère mais également une meilleure protection de la plante contre les pathogènes. Il a notamment été montré que des polysaccharides de la paroi végétale incluant la pectine peuvent être perçus par la bactérie qui en réponse, induit une production précoce de surfactine, un lipopeptide impliqué entre autres dans la colonisation des racines. En amont de ce travail, des analyses *in silico* ont permis de mettre en évidence la présence de gènes de dégradation de la paroi végétale fortement conservés au sein des génomes de *B. velezensis*, et notamment deux potentielles pectate lyases *pelA* et *pelB*, capables de cliver le squelette de la molécule de pectine. D'un point de vue écologique, la présence dans le génome de PGPR de tels gènes habituellement retrouvés chez des phytopathogènes, voir des saprophytes, pose question. Ainsi, le présent travail avait pour vocation d'évaluer d'une part si ces gènes interviennent dans la colonisation racinaire et d'autre part si ces derniers sont impliqués dans la perception des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale par le PGPR.

A la suite des tests de compétition pour la colonisation racinaire entre la souche sauvage et le double mutant  $\Delta pelA\Delta pelB$ , il en est ressorti que la présence des putatives pectate lyases pourrait contribuer au fitness de *B. Velezensis* au sein de la rhizosphère. Ainsi, l'instauration d'une compétition à la fois pour les nutriments relargués par les racines et pour l'espace disponible au sein de la rhizosphère pourrait permettre de limiter l'implantation des agents phytopathogènes. Les produits de dégradation de ces pectate lyases pourraient également contribuer à l'élaboration de la matrice du biofilm du PGPR, comme cela a été démontré par Beauregard *et al.* (2013) ce qui en retour permet en retour d'améliorer la colonisation des racines par le PGPR. Les oligomères issus du clivage des pectines pourraient également être reconnus entant que DAMPs par la plante. Par conséquent, en plus de l'effet éliciteur direct de la surfactine, le PGPR serait capable de mettre la plante en alerte de manière indirecte, afin que sa réaction immunitaire lors d'une attaque pathogène ultérieure soit plus efficace. Tester les oligomères générés par les deux pectate lyases PelA et PelB pour leur effet éliciteur de réactions de défenses liées à l'immunité dans les tissus racinaires est une perspective très concrète à cet égard.

Etant donné le caractère phytobénéfique de *B. velezensis*, il est envisageable que les gènes codant pour les enzymes de dégradation de la paroi présents dans son génome soient contrôlés par un système de régulation différent des organismes ayant une niche écologique différente. Il serait donc intéressant de comparer les niveaux d'expression des gènes codants pour les pectate lyases en présence

de pectine à la fois chez *B. velezensis*, mais également chez une bactérie saprophyte (*B. subtilis*) et une bactérie phytopathogène (*Dyckea dadantii*). La fonction de ces enzymes se doit également d'être confirmée par une analyse fonctionnelle plus poussée. L'idéal serait de travailler sur des enzymes purifiées (production hétérologue chez *E. coli*) et d'analyser leurs produits de dégradation via UPLC-DAD-qTOF-MS, ainsi la présence de produits de dégradation insaturés, caractéristiques des pectate lyases, ainsi que leur degré de polymérisation pourront être confirmés avec certitude. En travaillant avec ces enzymes pures, il sera également possible de déterminer le type de substrat pour lequel elles ont chacune le plus d'affinité (faiblement ou hautement méthylé), leur pH et leur température optimale d'activité. Dans le même esprit que pour les aspects régulationnels, comparer ces propriétés fonctionnelles avec celles de pectinases d'autres bactéries pathogènes ou saprophytes permettrait d'évaluer à quel point les produits de dégradation de PelA et PelB sont spécifiques et donc en déduire leur impact écologique.

Les résultats montrent que les gènes *pelA* et *pelB* sont bien exprimés et que les enzymes correspondantes sont fonctionnelles. Cependant, les cinétiques de culture effectuées au cours de ce travail semblent indiquer que *B. velezensis* ne soit pas en mesure d'utiliser les oligomères et monomères de pectines comme source de carbone dans les conditions expérimentales mises en place. Néanmoins, la présence de pectines hautement et faiblement méthylées issues de racines de tabac (PEC et POX) et de produit purs commerciaux (GLM/GHM) a permis un maintien de la biomasse de *B. velezensis* GA1, comparé au milieu non supplémenté. Les analyses de cytométrie en flux ont permis de montrer que les cellules cultivées en absence de GLM présentent une taille significativement inférieure à celles cultivées en présence de GLM. Ainsi, les polymères de pectine agiraient plutôt comme molécule signal, responsable de l'activation ou de l'inactivation de certains gènes impliqués dans la physiologie de la bactérie. Pour en avoir la confirmation, un séquençage des ARNs de *B. velezensis* ayant été mises en présence et en absence du polysaccharide pourrait être réalisé, afin d'avoir une vision globale de son transcriptome.

Les résultats des tests de colonisation racinaire individuels réalisés avec la souche sauvage et le double mutant  $\Delta pelA \Delta pelB$ , suggèrent que les potentiels produits de dégradation des pectines peuvent également induire une augmentation de la production de surfactine après 24h. Cependant, au vu de la variabilité des résultats obtenus pour la souche sauvage après 24h, l'expérience se doit d'être répétée. Cette potentielle augmentation de production de surfactine par la souche sauvage pourrait également être impliquée dans la meilleure aptitude à la colonisation affichée par cette dernière comparée au double mutant. L'hypothèse émise dans la discussion des résultats, selon laquelle les deux souches formeraient des amas cellulaires distincts à la surface des racines pourrait être vérifiée en marquant chacune des deux souches avec un fluorochrome distinct (par exemple GFP pour l'une et CFP pour l'autre). Ainsi, il sera possible de suivre l'évolution de la colonisation et la structure que prennent les deux populations bactériennes au niveau des racines via microscopie à fluorescence.

Enfin, à la suite de ce travail, il est possible d'apporter des informations supplémentaires quant à l'induction de production de surfactine par les fragments issus de la paroi de cellules racinaires. En effet, les résultats semblent indiquer que les fragments induisant une production de surfactine plus précoce sont ceux présentant un important degré de polymérisation, indépendamment de leur niveau de méthylation. Ce phénomène d'induction a également été observé au niveau transcriptionnel (expression du gène *urfAA*). Les homogalacturonanes agiraient donc en tant que molécule signal.

En conclusion, il est possible de constater que les interactions entre les PGPRs et les racines des végétaux impliquent des mécanismes complexes qui restent encore à élucider. La compréhension de ces derniers revêt une importance primordiale afin de mettre en place des agents de biocontrôle efficaces.

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abramovitch, R. B., & Martin, G. B. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.002>
- Balaa, B. Al, Esmail, R., & Yazaji, S. (2017). Purification and characterization of an extracellular alkaline Pectate lyase from *Bacillus subtilis* BPlsy1. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 20(1):209-214. [https://www.researchgate.net/publication/286309245\\_Purification\\_and\\_characterization\\_of\\_an\\_extracellular\\_alkaline\\_pectate\\_lyase\\_from\\_Bacillus\\_subtilis\\_BPLSY\\_1](https://www.researchgate.net/publication/286309245_Purification_and_characterization_of_an_extracellular_alkaline_pectate_lyase_from_Bacillus_subtilis_BPLSY_1)
- Angers, D. A., & Caron, J. (1998). Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. In *Plant-induced soil changes: Processes and feedbacks* (pp. 55–72). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2691-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2691-7_3)
- 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. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Atalla, R. H., Hackney, J. M., Uhlin, I., & Thompson, N. S. (1993). Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(2), 109–112. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(93\)90007-9](https://doi.org/10.1016/0141-8130(93)90007-9)
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., & van Loon, L. C. (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239–243. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-2-0239>
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115(7), 1053–1074. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv046>
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), E1621–E1630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
- Béguin, P., & Aubert, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(1), 25–58. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)90099-X)
- Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O., & Tounsi, S. (2018). Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. *Biological Control*, 124, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.013>
- Bishnoi, U. (2015). PGPR Interaction: An Ecofriendly Approach Promoting the Sustainable Agriculture System. *Advances in Botanical Research*, 75, 81–113. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.09.006>

- Borriss, R., Chen, X.-H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., ... Klenk, H.-P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genom. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), 1786–1801. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.023267-0>
- Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>
- Brenda Pierucci, A. R. (2015). *Agriculture : l'alternative du biocontrôle*. Retrieved June 30, 2019, from <http://www.inra.fr/Grand-public/Sante-des-plantes/Tous-les-dossiers/Biocontrole>
- Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T., & Stubbs, M. T. (2002). Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (London, England: 1993)*, 10(3), 301–310. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005429>
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>
- Campbell, N.A *et al.*, *Biology 8th Edition*, California, Pearson Benjamin Cummings, 2008, 1464p
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., ... Ongena, M. (2013). Plant Defense Stimulation by Natural Isolates of *Bacillus* Depends on Efficient Surfactin Production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(2), 87–100. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-13-0262-r>
- Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., ... Borriss, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140(1–2), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>
- Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., ... Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>
- Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>
- Chormova, D., Messenger, D. J., & Fry, S. C. (2014). Rhamnogalacturonan-II cross-linking of plant pectins via boron bridges occurs during polysaccharide synthesis and/or secretion. *Plant Signaling and Behavior*, 9(3), e28169. <https://doi.org/10.4161/psb.28169>
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>

- Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., ... Hartmann, A. (2015). Cyclic Lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance Plant Defense Responses Toward the Bottom Rot Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 984–995. <https://doi.org/10.1094/mpmi-03-15-0066-r>
- Collmer, A., Ried, J. L., & Mount, M. S. (1988). Assay Methods for Pectic Enzymes. *Methods in Enzymology*, 161(C), 329–335. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61037-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61037-8)
- Combo A. M. M., Aguedo M., & Paquot M. (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *BASE*, 15(1), 153-164. <https://popups.uliege.be/443/1780-4507/index.php?id=7086>.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- De Boer Sietske, A., & Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF00164689>
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., ... Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental Microbiology Reports*, 7(3), 570–582. <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>
- Dennis, P. G., Miller, A. J., & Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x>
- de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 497–522. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.4.497-522.2001>
- Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Price, N. P., & Vaughn, S. F. (2011). Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. *The Journal of Microbiology*, 49(4), 603–609. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1044-y>
- Fageria, N., & Stone, L. (2006). Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition*, 29(7), 1327–1356. <https://doi.org/10.1080/01904160600767682>

- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., ... Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annual Review of Microbiology*, 58(1), 453–488. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123615>
- Foster, R. C. (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 6(3), 189–203. <https://doi.org/10.1007/BF00260816>
- Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., & Senesi, S. (2012). Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6540–6544. <https://doi.org/10.1128/AEM.01341-12>
- Greaves, M. P., & Darbyshire, J. F. (1972). The ultrastructure of the mucilaginous layer on plant roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(4), 443–449. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90059-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90059-4)
- Guerriero, G., Fugelstad, J., & Bulone, V. (2010). What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants? *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(2), 161–175. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00935.x>
- Yu, X., Feng, B., He, P., & Shan, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Harwood, C. R., Mouillon, J. M., Pohl, S., & Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
- Haynes, R. J. (1990). Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil*, 126(2), 247–264. <https://doi.org/10.1007/BF00012828>
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., & Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1023/A:1022371130939>
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., & Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61(6), 693–698. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00365-5)
- Hocq, L., Pelloux, J., & Lefebvre, V. (2017). Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.009>



- Holtzapfel, M. T. (2003). Hemicelluloses. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 3060–3071). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00589-7>
- Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N., & Beg, Q. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1061-1>
- Hossain, M. J., Ran, C., Liu, K., Ryu, C.-M., Rasmussen-Ivey, C. R., Williams, M. A., ... Liles, M. R. (2015). Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00631>
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H., & Wu, D. (2019). Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00646>
- Hu, F., Liu, Y., & Li, S. (2019). Rational strain improvement for surfactin production: Enhancing the yield and generating novel structures. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1089-x>
- Hu, L. B., Zhang, T., Yang, Z. M., Zhou, W., & Shi, Z. Q. (2009). Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B1 from *Fusarium verticillioides*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(1), 84–89. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02493.x>
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2016). Metabolism and Virulence Strategies in Dickeya–Host Interactions. *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 142, pp. 93–129). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.006>
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., & Shevchik, V. E. (2014). Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12166>
- Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S., & Saxild, H. H. (2002). Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 197–200. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00525-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00525-0)
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931–2944. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.03.026>
- Jones, D. L., Edwards, A. C., Donachie, K., & Darrah, P. R. (1994). Role of proteinaceous amino acids released in root exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. *Plant and Soil*, 158(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/BF00009493>
- Jones, D. L., Dennis, P. G., Owen, A. G., & van Hees, P. A. W. (2003). Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, 248(1/2), 31–41. <https://doi.org/10.1023/A:1022304332313>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4), 456–468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>

- Jourdan, E., Ongena, M., & Thonart, P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes, *BASE*, 12(4), 437-449. <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=3304>.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I. B., & Séror, S. J. (2005). Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: Critical effects of surfactin and the composition of the medium. *Journal of Bacteriology* (Vol. 187, pp. 65–76). <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.65-76.2005>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154(2), 483–486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Khan, N., Maymon, M., & Hirsch, A. (2017). Combating Fusarium Infection Using Bacillus-Based Antimicrobials. *Microorganisms*, 5(4), 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040075>
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259–1266. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>
- Knee, E. M., Gong, F.-C., Gao, M., Teplitski, M., Jones, A. R., Foxworthy, A., ... Bauer, W. D. (2001). Root Mucilage from Pea and Its Utilization by Rhizosphere Bacteria as a Sole Carbon Source. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 775–784. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.775>
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Liu, Z., Budiharjo, A., Wang, P., Shi, H., Fang, J., Borriss, R., ... Huang, X. (2013). The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 10081–10090. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5247-5>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lynch, J. M., & de Leij, F. (2012). Rhizosphere. In *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000403.pub2>
- Mariutto, M., & Ongena, M. (2015). Molecular Patterns of Rhizobacteria Involved in Plant Immunity Elicitation. *Advances in Botanical Research*, 75, 21–56. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.07.002>
- Marschner, P. (2011). *Rhizosphere Biology*. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (pp. 369–388). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00015-7>
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>

- McNear Jr., D. H. (2013) The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge* 4(3):1. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617>
- Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., & Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 622–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>
- Neumann, G., & Römheld, V. (2011). Rhizosphere Chemistry in Relation to Plant Nutrition. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (pp. 347–368). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00014-5>
- Nguyen, C. (2009). Rhizodeposition of organic C by plant: Mechanisms and controls. In *Sustainable Agriculture* (pp. 97–123). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_9)
- Nürnberger, T., & Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, 6(3), 335–345. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00279.x>
- O'Neill, M. A., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (2001). Pectic Substances. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000697>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 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). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S., & Briandet, R. (2017). Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12693>
- Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E., & Carmona, E. C. (2009). Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3(1), 9–18. <https://doi.org/10.2174/1874070700903010009>
- Pelloux, J., Rustérucchi, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001>
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- Pirri, G., Giuliani, A., Nicoletto, S., Pizzuto, L., & Rinaldi, A. (2009). Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. *Open Life Sciences*, 4(3), 258–273. <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0031-3>
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., & Berkeley, R. C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), 69–71. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-69>

- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1–2), 341–361. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9568-6>
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Renard, C. M. G. C., Crépeau, M.-J., & Thibault, J.-F. (1995). Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydrate Research*, 275(1), 155–165. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00140-O](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00140-O)
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., ... Pérez-García, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-4-0430>
- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2011). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms12010141>
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 30, pp. 279–291). <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Sassi, H., Nguyen, T. M., Telek, S., Gosset, G., Grünberger, A., & Delvigne, F. (2019). Segregostat: a novel concept to control phenotypic diversification dynamics on the example of Gram-negative bacteria. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13442>
- Schellenberger, R., Touchard, M., Clément, C., Baillieul, F., Cordelier, S., Crouzet, J., & Dorey, S. (2019). Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.12857>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Srivastava, V., McKee, L. S., & Bulone, V. (2017). Plant Cell Walls. In *eLS* (pp. 1–17). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001682.pub3>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160–167. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01032-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01032-9)
- Ton, J., Ent, S. Van der, Hulten, M. van, & Pozo, M. (2009). Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. *IOBC/Wprs Bull*, 44, 3–13. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/Priming-as-a-mechanism-behind-induced-resistance-Ton-Ent/71c98eb2a1bb829dbb7e8ab70ceab8f5c8937ad6>

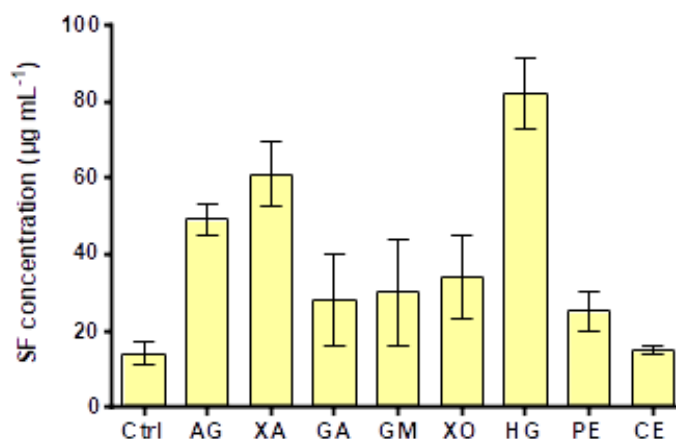
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1151–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Vergani, C., & Graf, F. (2016). Soil permeability, aggregate stability and root growth: a pot experiment from a soil bioengineering perspective. *Ecohydrology*, 9(5), 830–842. <https://doi.org/10.1002/eco.1686>
- Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Wertz, J. L. (2011, November 15). *Les Hémicelluloses*. Retrieved June 18, 2019, from <http://www.valbiom.be/files/library/Docs/Biopolymeres/leshemicelluloses1323437241.pdf>
- Willats, W. G. T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H. C., Van Alebeek, G. J. W. M., Voragen, A. G. J., ... Knox, J. P. (2001). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19404–19413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011242200>
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., ... Wang, Z. (2018). Characteristics and Application of a Novel Species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00874>
- Yu, X., Feng, B., He, P., & Shan, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
- Zandleven, J., Sørensen, S. O., Harholt, J., Beldman, G., Schols, H. A., Scheller, H. V., & Voragen, A. J. (2007). Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 68(8), 1219–1226. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.016>

# ANNEXE

## ANNEXE 1 : Enzymes de dégradation de la pectine présentes chez les souches modèles des principales espèces de *Bacillus* (Hoff, résultats non publiés)

			<i>Bacillus velezensis</i> S499/FZB42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7	<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC-14580	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR 032	<i>Bacillus cereus</i> ATCC-14579	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC-14581
Dégradation de la pectine	Polygalacturonases	GH28				1			
		GH78							
	Rhamno-galacturonan hydrolase	GH105			2	2	1		
	Polygalacturonate lyases	PL1	2	2	2	3	1		
		PL3			1	1			
		PL4							
		PL7							
		PL9	1	1	1	1	1		
		PL11			2	2			
		PL26			1	1			
Remodelage de la pectine	Pectine methyl-esterase	CE8				1	1		
	Pectine acetyl-esterase	CE12			3		1		

## ANNEXE 2 : Production de surfactine en présence de différents polymères constitutifs des pectines et des hémicelluloses (moyenne ± erreur standard, n=3). Ctrl=contrôle, AG =arabinogalactane, XA=xylane, GA= galactane, GM=galactomannane, XO=xylose, HG=homogalacturonane, PE=pectine, CE=cellulose. (Hoff, résultats non publiés)



**ANNEXE 3 : Conservation des gènes de dégradation de la pectine au sein du groupe *amyloliquefaciens* et dans les souches de référence des autres espèces principales de *Bacillus* (Hoff, résultats non publiés)**

	Taille du génome (Mb)	Dégradation de la pectine			
		Polygalacturonate lyases			
		PL1			
		Pectate lyase			
<i>Bacillus velezensis</i> S499	3.93593	AS588_00695		AS588_18195	
		<i>pelA</i>		<i>pelB</i>	
		Cov (%)	Id (%)	Cov (%)	Id (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7	3.9802	100	93,84	100	95,02
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HK1	4.00284	100	93,84	100	95,02
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LL3	4.00199	100	93,92	100	94,93
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MT45	3.89752	100	93,92	100	95,49
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RD7-7	3.68821	100	93,68	100	95,77
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM101267	4.08824	100	93,84	100	95,02
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TA208	3.93751	100	93,92	100	95,02
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XH7	3.9392	100	93,92	100	95,02
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> YP6	4.00962	100	94,23	100	95,21
<i>Bacillus siamensis</i> SCSIO 05746	4.28071	100	94,55	100	95,77
<i>Bacillus velezensis</i> 10075	4.33983	100	99,26	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> 131-4	3.89303	100	99,61	100	99,25
<i>Bacillus velezensis</i> 157	4.02069	100	97,95	100	97,75
<i>Bacillus velezensis</i> 1B-23	4.14106	100	97,95	100	97,46
<i>Bacillus velezensis</i> 8-2	3.89307	100	99,61	100	99,25
<i>Bacillus velezensis</i> 83	3.9979	99	98,18	100	97,56
<i>Bacillus velezensis</i> 9912D	4.24158	100	99,26	100	97,46
<i>Bacillus velezensis</i> 9D-6	3.96373	100	97,55	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> ALB65	4.04167	100	98,1	100	98,12
<i>Bacillus velezensis</i> ALB69	4.04661	100	98,1	100	98,5
<i>Bacillus velezensis</i> ALB79	3.98291	100	97,47	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> ANSB01E	3.92984	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> AS43.3	3.96137	100	97,47	100	97,46
<i>Bacillus velezensis</i> At1	3.88899	100	97,87	100	98,03
<i>Bacillus velezensis</i> ATR2	4.00675	100	99,26	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> B15	4.00675	100	97,71	100	98,03
<i>Bacillus velezensis</i> B25	3.86276	100	99,53	100	98,78
<i>Bacillus velezensis</i> B4	3.9198	100	99,37	100	98,78
<i>Bacillus velezensis</i> Bac57	4.2349	100	98,28	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> BCSol	3.71352	100	97,47	100	98,12
<i>Bacillus velezensis</i> BIM B-439D	3.97895	100	97,63	100	98,03
<i>Bacillus velezensis</i> BS-37	4.01389	100	97,24	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> CAU B946	4.01986	100	99,53	100	99,34
<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205	3.92975	100	97,95	100	97,18

<i>Bacillus velezensis</i> CC09	4.16715	100	96,84	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> CC178	3.91683	100	97,95	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> CGMCC 11640	4.38568	100	96,84	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> CMT-6	3.92849	100	99,84	100	98,69
<i>Bacillus velezensis</i> CN026	3.99581	99	98,1	100	97,46
<i>Bacillus velezensis</i> DKU_NT_04	4.32819	100	98,18	100	97,56
<i>Bacillus velezensis</i> DR-08	3.92979	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> DSYZ	4.32146	100	96,84	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> FS1092	4.24093	100	97,47	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	3.91859	100	97,95	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> G341	4.00975	100	97,95	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> GFP-2	3.97522	100	99,05	100	98,22
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13	4.14361	100	99,05	100	98,59
<i>Bacillus velezensis</i> GQJK49	3.92976	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> GYL4	3.97508	100	97,79	100	97,56
<i>Bacillus velezensis</i> Hx05	3.91387	100	99,76	100	99,15
<i>Bacillus velezensis</i> IT45	3.93687	100	100	100	100
<i>Bacillus velezensis</i> J7-1	3.89307	100	99,61	100	99,25
<i>Bacillus velezensis</i> JJ-D34	4.10595	100	99,37	100	99,34
<i>Bacillus velezensis</i> JS25R	4.01444	100	97,95	100	98,22
<i>Bacillus velezensis</i> JT3-1	3.9298	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> JTYP2	3.92979	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> K26	4.04735	100	98,18	100	97,56
<i>Bacillus velezensis</i> KD1	3.92197	100	99,21	100	98,97
<i>Bacillus velezensis</i> KHG19	3.95336	100	97,71	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> L1	4.09058	100	97,71	100	98,22
<i>Bacillus velezensis</i> LABIM40	3.97231	100	97,31	100	97,84
<i>Bacillus velezensis</i> LB002	4.07686	100	99,53	100	98,78
<i>Bacillus velezensis</i> LDO2	3.94727	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> LFB112	3.94275	100	99,53	100	100
<i>Bacillus velezensis</i> LG37	3.92	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> L-H15	3.93329	100	99,29	100	98,78
<i>Bacillus velezensis</i> LM2303	3.98939	100	99,45	100	99,53
<i>Bacillus velezensis</i> LPL-K103	3.90302	100	97,79	100	98,31
<i>Bacillus velezensis</i> L-S60	3.90597	100	99,29	100	98,78
<i>Bacillus velezensis</i> LS69	3.91776	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> Lzh-a42	4.2466	99	98,18	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> M75	4.00745	100	99,68	100	98,69
<i>Bacillus velezensis</i> MBE1283	3.97993	100	99,68	100	99,06
<i>Bacillus velezensis</i> MH25	4.11847	100	97,79	100	98,12
<i>Bacillus velezensis</i> NAU-B3	4.20461	100	97,95	100	98,22
<i>Bacillus velezensis</i> NJAU-Z9	3.87256	100	99,61	100	99,25
<i>Bacillus velezensis</i> NJN-6	4.05255	100	99,68	100	98,78
<i>Bacillus velezensis</i> NKG-1	4.19722	100	98,03	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> NY12-2	4.07491	100	98,18	100	97,75
<i>Bacillus velezensis</i> QST713	4.23376	100	97,47	100	97,84



<i>Bacillus velezensis</i> S141	3.97458	100	97,79	100	97,75
<i>Bacillus velezensis</i> S3-1	3.92977	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> SCDB 291	4.16257	100	98,34	100	98,97
<i>Bacillus velezensis</i> SCGB 1	4.08549	100	98,34	100	98,97
<i>Bacillus velezensis</i> SCGB 574	3.98915	100	97,95	100	98,22
<i>Bacillus velezensis</i> SH-B74	4.10382	100	97,87	100	98,03
<i>Bacillus velezensis</i> SQR9	4.11702	100	97,39	100	98,4
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM100072	4.00176	100	98,1	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM101413	4.20919	100	98,18	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM103616	4.23511	100	98,18	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM103691	4.13953	100	98,18	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM103788	4.1441	100	98,18	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> sx01604	3.92652	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> SYBC H47	3.88443	100	99,13	100	98,4
<i>Bacillus velezensis</i> T20E-257	3.90007	100	99,61	100	99,25
<i>Bacillus velezensis</i> TB1501	3.97938	100	97,79	100	98,22
<i>Bacillus velezensis</i> TJ02	4.06155	100	97,79	100	98,03
<i>Bacillus velezensis</i> TrigoCor1448	3.9579	100	97,71	100	97,65
<i>Bacillus velezensis</i> UCMB5007	3.98332	100	97,71	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> UCMB5033	4.07117	100	97,47	100	98,12
<i>Bacillus velezensis</i> UCMB5036	3.91032	100	97,87	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> UCMB5044	3.9833	100	97,87	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> UCMB5113	3.88953	100	97,87	100	98,03
<i>Bacillus velezensis</i> UFLA258	3.94721	100	97,95	100	98,4
<i>Bacillus velezensis</i> UMAF6614	4.00514	100	98,1	100	98,5
<i>Bacillus velezensis</i> UMAF6639	4.03464	100	97,79	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> W1	4.23743	99	98,18	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> WRN014	4.06354	100	99,84	100	98,69
<i>Bacillus velezensis</i> WS-8	3.92979	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> Y14	3.95716	100	99,76	100	99,15
<i>Bacillus velezensis</i> Y2	4.23862	99	98,18	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> YAU B9601-Y2	4.24277	99	98,18	100	97,93
<i>Bacillus velezensis</i> YJ11-1-4	4.00664	100	97,39	100	97,56
<i>Bacillus velezensis</i> ZF2	3.92977	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus velezensis</i> ZL918	3.92271	100	99,37	100	99,53
<i>Bacillus vallismortis</i> NBIF-001	3.92979	100	97,95	100	97,18
<i>Bacillus subtilis</i> 168	4.21561	95	72	47	65
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC-14580	4.2226	56	67	63	68
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	3.70464	/	/	/	/
<i>Bacillus cereus</i> ATCC-14579	5.42708	/	/	/	/
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC-14581	5.74664	/	/	/	/
<i>Bacillus atrophaeus</i> BA59	4.25815	98	71,58	92	79,44
<i>Bacillus atrophaeus</i> GQJK17	4.32582	93	72,22	93	79,28
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	4.16827	98	71,8	93	78,87

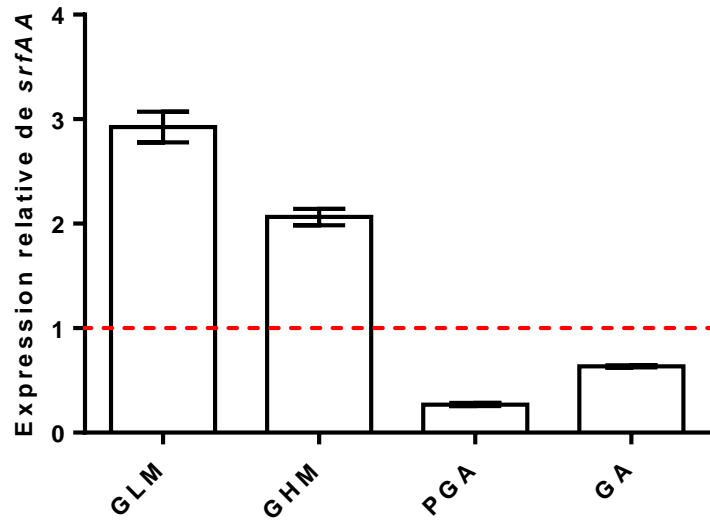
#### ANNEXE 4 : Séquences des amorces utilisées pour les différentes PCR

Amorce	Séquence (5' → 3')
UpPelBF	TGCAAGCTGAACAAACATCA
UpPelBM13R	CTTTTTCATGCCCTTCACTCC
pelB-KO-down-Fw	TATCCATAATACGAAAAACCG
pelB-KO-down-Rv	TCTAAACGTATCCTGTCTTGA
chl Fw	AAGCAGACAAGTAAGCCTCC
chl Rv	CTTCAACTAACGGGGCAGGT
phleoM13F	gtcatagctgtttcctgCCAAAAGGGGGTTTCATTTT
phleoM13R	actggccgtcgttttacTCCAATAAATGCGACACCAA
gyrA Fw	gagacgcactgaaatcgtga
gyrA Rv	gccgggagacgtttaacata
srfAA Fw	ATTGTTTACGGTGGCTCTGG
srfAA Rv	CGCTGCGATAGTCAAAATCA
pelA Fw	GACGGCAGACGTTAGGAACA
pelA Rv	ACGAGCTGCTGTCTGTTTGA
pelB Fw	ACCGGGCCTGATGAGATACG
pelB Rv	GGCTTTGAGCGACGGGAATG

## ANNEXE 5 : Composition des milieux de culture standards et solutions

Milieu/Solution	Composition
<p><b>LB liquide [solide]</b> = <i>Lysogeny Broth</i>, Milieu riche utilisé pour la croissance des bactéries</p>	<p>Tryptone caséine (10g/l), Extrait de levure (5g/l), NaCl (10g/l), [Agar (14 g/l)], porté à pH 7 avec NaOH (1M) avant stérilisation</p>
<p><b>RE ½ liquide</b> = Milieu <i>Recomposed Exsudates</i>, reconstituant les conditions nutritionnelles retrouvées dans la rhizosphère</p>	<p><i>Solutions traces</i> (réalisées séparément) : Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (12g/l), MnSO<sub>4</sub> (4g/l), CuSO<sub>4</sub> (16g/l), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (40g/l)</p> <p><i>Solution A</i> : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,685g/l), MOPS (21g/l), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g/l), KCl (0,5 g/l), Extrait de levure (1g/l), solutions traces (100µl de chaque)</p> <p><i>Solution B</i> (2x): Glucose (1g/l), Fructose (1,7g/l), Maltose (0,2 g/l), Ribose (0,3 g/l), Citrate (2g/l), Oxalate (2g/l), Succinate (1,5g/l), Malate (0,5 g/l), Fumarate (0,5g/l), Casamino acides (0,5 g/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1g/l)</p> <p>→ RE ½ (1l) = solution A (0,25l), Solution B (0,5l), H<sub>2</sub>O (0,25l), porté à pH 7 avec NaOH (1M) avant stérilisation</p>
<p><b>Hoagland solide</b> = Milieu nutritif utilisé pour les plantules de tomates</p>	<p><i>Solution A</i>: CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,05mg/l)</p> <p><i>Solution B</i>: NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,02mg/l)</p> <p><i>Solution C</i> : EDTA (5,2mg/l), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3,9mg/l), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1,4mg/l), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (513mg/l), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,9mg/l), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,10 mg/ml), solutions A et B (20ml de chaque)</p> <p><i>Solution D</i>: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (170mg/l)</p> <p><i>Solution E</i>: KNO<sub>3</sub> (316mg/l), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (825mg/l)</p> <p>→ Hoagland solide (1l) = Solution C (5ml), Solution D (5ml), Solution E (5ml), H<sub>2</sub>O distillée (985 ml), Agar (14g), porté à pH 6,5 avec NaOH (1M) avant stérilisation</p>
<p><b>MMG</b> = Milieu Minimum Glutamate utilisé pour les transformations bactériennes</p>	<p><i>Solution A</i>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (21,8g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (6,9g/l), Na<sub>3</sub>citrate (1,2g/l), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2g/l), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,3g/l), portée à pH 7 avec NaOH (1M) avant stérilisation</p> <p><i>Solution B</i> : FeCl<sub>3</sub> (16g/l), filtrée stérilement sur filtre 0,22µm</p> <p><i>Solution C</i> : MnSO<sub>4</sub> (15g/l), filtrée stérilement sur filtre 0,22µm</p> <p><i>Solution D</i> : Glutamate monopotassique (20g/l), filtrée stérilement sur filtre 0,22µm</p> <p><i>Solution E</i> : Glucose 20% (m/v)</p> <p>→ MMG = Solution A (870ml), Solution B (500µl), Solution C (20µl), Solution D (100ml), Solution E (20ml)</p>
<p><b>Eau peptone</b></p>	<p>Peptone (10g/l), NaCl (5g/l), [Tween (0,1%)]</p>
<p><b>PBS</b></p>	<p>NaCl (8g/l), KCl (0,2g/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,44 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,24g/l)</p>

**ANNEXE 6 : Expression relative du gène *srfAA* en présence de GLM/GHM/PGA/GA par rapport au milieu contrôle non supplémenté de poly/monomère de pectine (moyenne ± erreur standard, n=3)**



**ANNEXE 7 : Evaluation de la production de surfactine par la souche sauvage et par le mutant  $\Delta PelA\Delta PelB$  sur milieu RE  $1/2$  (moyenne ± erreur standard, n=3)**

