

Interaction microbienne entre *Pseudomonas* sp. CMR12a et *Bacillus velezensis* GA1 au sein de biofilms synthétiques et in planta

Auteur : Braconnier, Oriane

Promoteur(s) : Delvigne, Frank; Meyer, Thibault

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences et technologies de l'environnement, à finalité spécialisée

Année académique : 2018-2019

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/8164>

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.

**Interaction microbienne entre *Pseudomonas sp.*
CMR12a et *Bacillus velezensis* GA1 au sein de
biofilms synthétiques et *in planta***

ORIANE BRACONNIER

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2018-2019

CO-PROMOTEURS: FRANK DELVIGNE & THIBAUT MEYER

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

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre(s) du personnel enseignant de GxABT

**Interaction microbienne entre *Pseudomonas sp.*
CMR12a et *Bacillus velezensis* GA1 au sein de
biofilms synthétiques et *in planta***

ORIANE BRACONNIER

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2018-2019

CO-PROMOTEURS: FRANK DELVIGNE & THIBAUT MEYER

Remerciements

J'aimerais adresser mes premiers remerciements à mes promoteurs. Tout d'abord, je remercie Frank Delvigne de m'avoir donné la possibilité de travailler sur un projet qui sortait de ma zone de confort, pour son aide, sa bonne humeur et pour les magnifiques fingerprints qui embellissent assez bien mon TFE. Un tout grand merci à Thibault Meyer pour ces encouragements, ses conseils, son aide, sa compréhension, ses relectures et aussi un peu pour ses blagues.

Ensuite, je souhaite remercier tous les membres du MiPI pour leur bonne humeur et l'ambiance toujours au top que ce soit dans le labo ou autour d'une petite bière après le boulot. Je remercie particulièrement Cathy qui fait les plus belles tomates du labo et Seb pour son aide sur la RT-qPCR. J'en profite aussi pour saluer mes compagnons mipi-fistes : Farah, Augustin, Clémence, Gilles, François, Damien et Germain. Sans vous l'ambiance au Terra n'aurait pas été la même.

Un immense merci à ma famille pour m'avoir soutenue durant toutes mes années d'études. Merci maman pour les gestions des crises, le soutien à toute épreuve, la compréhension, les trajets et j'en passe. Merci Timothé de toujours être venu me chercher jusqu'à Gembloux quand ça n'allait pas. Merci à mes grands-parents pour leur foi inconditionnelle en moi. Une pensée toute particulière à ma Mamy Marcelle qui, j'en suis sûr, était assise à côté de moi à chaque examen et qui rêvait de me voir un jour diplômée.

Une merci tout particulier à Baptiste pour son soutien de tous les jours. Grâce à toi je me levais motivée tous les matins. Merci aussi de croire en moi, pour le miou et pour les patates. Maintenant les rôles s'inversent et c'est à moi de te soutenir pour ton TFE. Après tout ça, on aura encore de quoi faire pour se soutenir mutuellement dans nos projets de vie.

Un grand merci à mes amis sans qui ces années dans les vieux murs de Gembloux n'auraient pas été aussi belles et sans doute pas aussi bibitives et pour tous les bons moments, j'en passe et des meilleures, Lolita, Lucie, Jo, Maxence, Laurie, Lilly, Justine, Cyril, Amandine, Lallie et tous les autres. Petit clin d'œil à ma marraine qui a été la de ma première guindaille jusqu'à la relecture de mon TFE. Big up KDR le meilleur kot de Gembloux.

Je ne pouvais pas quitter la fac sans une grosse pensée à mes lapines, petites lapines, petites-petites lapines. Enfin en tout cas que des mijoles (baveuses). Je leur laisse le soin de perpétuer la famille, je sais qu'elles feront ça à merveille. Je repasserai quand même pour vérifier.

Chaque **Bonne** fin de remerciements comprend des salutations distinguées aux **Courageux Brigands** qui auront fait de mes années dans notre Alma Mater les meilleures de toutes. Je ne vais pas m'épandre vous savez déjà tout ! Vous êtes moches, continuez à l'être. Le CB est grand, il continuera à l'être. Le folklore est entre de bonnes mains. A plus tard autour d'un platalsss.

Résumé

Bacillus velezensis GA1 est une souche d'intérêt pour la recherche agronomique d'agents de biocontrôle. De plus, la récente découverte de l'amylocyclicine, une nouvelle bactériocine produite par *B. velezensis* GA1, ouvre la perspective de son utilisation en tant que molécule bioactive. Dans ce contexte, le profil de production de l'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1 a été étudié grâce à l'association de la cytométrie en flux et d'un système rapporteur GFPmut3. Les résultats ont montré une différence entre les profils de production de l'amylocyclicine en fonction du mode de culture de *B. velezensis* GA1. Ensuite, l'utilisation des agents de biocontrôle en conditions réelles montrent encore des limites notamment à cause des facteurs biotiques de la niche écologique. C'est pourquoi, l'impact de l'interaction entre *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la production d'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1 est également investiguée. Cette étude a montré une surexpression de l'amylocyclicine dû à un ajout surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a en culture liquide. Ainsi qu'une meilleure fitness de *Pseudomonas* sp. CMR12a par rapport à *B. velezensis* GA1 dans la colonisation racinaire simple ou en compétition.

Mots-clés : *B. velezensis* GA1, Amylocyclicine, *Pseudomonas* sp. CMR12a, Biofilm, GFPmut3, Cytométrie en flux

Abstract

Bacillus velezensis GA1 is a strain of interest for agronomic research on biocontrol agents. In addition, the recent discovery of amylocyclicin, a new bacteriocin produced by *B. velezensis* GA1, opens the prospect of its use as a bioactive molecule. In this context, the production profile of amylocyclicin by *B. velezensis* GA1 was studied using a combination of a reporter system based on GFPmut3 and flow cytometry. The results showed a difference between amylocyclicin production profiles according to the culture mode of *B. velezensis* GA1. Secondly, the use of bio-control agents in real conditions still shows limitations, particularly because of biotic factors of the ecological niche. Therefore, the impact of the interaction between *B. velezensis* GA1 and *Pseudomonas* sp. CMR12a on amylocyclicin production by *B. velezensis* GA1 is also investigated. This study showed an overexpression of amylocyclicin due to a supernatant addition of *Pseudomonas* sp. CMR12a in liquid culture. As well as a better fitness of *Pseudomonas* sp. CMR12a compared to *B. velezensis* GA1 in simple root colonization or in competition.

Keywords : *B.velezensis* GA1, Amylocyclicin, *Pseudomonas* sp. CMR12a, Biofilm, GFPmut3, flux cytometry

Table des matières

0. Liste des abréviations	- 7 -
1. Introduction	- 8 -
2. Revue bibliographique	- 11 -
2.1 La rhizosphère, zone dynamique de développement et d'interactions	- 11 -
2.1.1 Les interactions plantes-bactéries dans la rhizosphère	- 13 -
2.1.2 Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes	- 15 -
2.1.3 La rhizosphère : zone d'interactions entre bactéries	- 17 -
2.2 Le biofilm, un environnement complexe	- 18 -
2.3 <i>Bacillus</i> un genre ubiquitaire à grand potentiel agronomique	- 19 -
2.3.1 <i>Bacillus velezensis</i> et production de molécules bioactives	- 21 -
2.3.2 L'amylocycline	- 22 -
2.3.3 La surfactine	- 23 -
2.4 <i>Pseudomonas</i> un autre modèle de rhizobactéries promotrice de la croissance des plantes - 24 -	
2.5 Analyse au niveau « Single cell »	- 25 -
2.5.1 Cytométrie en flux	- 26 -
2.5.2 La protéine fluorescente verte	- 29 -
3. Objectifs et stratégies du projet	- 31 -
4. Matériel et méthode	- 33 -
4.1 Souches, milieux et conditions de culture	- 33 -
4.1.1 Souches	- 33 -
4.1.2 Milieux de culture	- 34 -
4.1.3 Conditions de culture	- 34 -
4.2 Expérimentations	- 35 -
4.2.1 Suivis de la fluorescence de <i>B. velezensis</i> GA1 en fiole	- 35 -
4.2.2 Suivi de la croissance de <i>B. velezensis</i> GA1 en fiole avec ou sans surnageant	- 35 -
4.2.3 Mise en interactions sur milieu solide de <i>B. velezensis</i> GA1 et de <i>Pseudomonas sp. CMR12a</i>	- 36 -
4.2.4 Culture et mise en interactions <i>in planta</i>	- 37 -
4.3 Cytométrie en flux	- 40 -
4.3.2 Traitement des données	- 40 -
4.4 Analyse de la transcription du gene <i>acnA</i> par RT-qPCR	- 42 -
4.5 Analyses statistiques	- 43 -
5. Résultats	- 44 -
5.1 Validation du système rapporteur GFP comme outil d'investigation de la production d'amylocycline	- 44 -
5.2 Le type de culture influence la structure et la différenciation de la population de <i>Bacillus velezensis</i> GA1	- 46 -
5.2.1 Le mode de culture influence l'empreinte de la population de <i>B. velezensis</i> GA1	- 48 -
5.3 Le surnageant de <i>Pseudomonas sp. CMR12a</i> induit la transcription du gène <i>acnA</i> ... - 53 -	
5.4 L'interaction microbienne entre les colonies de <i>B. velezensis</i> GA1 et <i>Pseudomonas sp. CMR12a</i> sur agar n'affecte pas la structure de la population de <i>B. velezensis</i> GA1	- 56 -
5.4.1 Le temps de culture affecte la structure des empreintes des populations	- 56 -

5.4.2	Aucune influence des composés volatils de <i>Pseudomonas</i> sp. CMR12a n'est observé sur les empreintes des populations de <i>B. velezensis</i> GA1	- 58 -
5.4.3	Aucune différence n'est observée entre les empreintes de <i>B. velezensis</i> GA1 avec et sans interaction avec <i>Pseudomonas</i> sp. CMR12a	- 59 -
5.4.4	La distance d'interaction avec <i>Pseudomonas</i> sp. CMR12a n'a pas d'impact sur les empreintes des population de <i>B. velezensis</i> GA1	- 59 -
5.4.5	La délétion de la sessiline, de l'orfamide et de la phénazine n'a pas d'impact sur le profil des empreintes de <i>B. velezensis</i> GA1.....	- 60 -
5.5	<i>Pseudomonas</i> sp. CMR12a a une meilleure fitness que <i>B. velezensis</i> GA1 <i>in planta</i> . .	- 60 -
6.	<i>Discussion et perspectives</i>.....	- 66 -
7.	<i>Conclusion</i>	- 73 -
8.	<i>Bibliographie</i>.....	- 75 -
9.	<i>Annexes</i>	- 82 -

0. Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
AV1 : Analyse de la variance à 1 critère de classification
AV2 : Analyse de la variance à 2 critères de classification
Bp : Pair de base
CLPs : Cyclic Lipopeptides
COV : Composés organiques volatiles
Da : Dalton
DO : Densité Optique
EPS : Extracellular polymeric substance
FL1 : Canal de fluorescence N°1
FSC : Forward Scattered
GFP : Green fluorescent protein
GFPmut3 : Green fluorescent protein mut3
GFPwt : Green fluorescent protein wild type
HPLC : High-performance liquid chromatography
ISR : Induce systemic resistance
LPs : Lipopeptides
NRPs : Nonribosomal Peptides
NRPSs : Nonribosomal Peptide synthetase
PBS : Phosphate buffered saline
PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PI : Propidium Iodide
PKs : Polyketides
RBS : Ribosome binding site
RE : Root Exudate medium
RPM : Rotation Par Minute
RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
SSC : Side Scattered

1. Introduction

Depuis les années 1960 la population mondiale a doublé pour atteindre 7,5 milliards en 2017 (FAO, 2018). De nos jours, la population mondiale est encore en augmentation et induit une croissance de la demande en nourriture (Godfray et al., 2010). Pour subvenir à cette demande croissante l'agriculture a subi un changement catégorique pour tendre vers des pratiques agricoles intensives à hauts rendements. Les zones agraires se sont multipliées et l'application de pesticides et de fertilisants sur les cultures est devenue essentielle pour assurer une production suffisante (Oerke, 2006). Si bien qu'entre 2005 et 2016, les superficies de cultures récoltées ont augmenté de 8% et que l'utilisation mondiale en fertilisants a augmenté de 26% (FAO, 2018). Dans le même temps, les agriculteurs sont confrontés à une augmentation de la concurrence pour la terre, l'eau et l'énergie (Godfray et al., 2010). Dans ce contexte, les effets de la production alimentaire sur l'environnement sont de plus en plus évidents. Le challenge des années à venir va donc être de répondre à cette évolution rapide de la demande en denrées alimentaires mais également de le faire d'une façon écologiquement et socialement durable (Godfray et al., 2010).

La majeure partie de la production agricole dépend de l'utilisation de produits chimiques pour maintenir des productivités élevées (Margni, Rossier, Crettaz, & Jolliet, 2002). En effet, les pathogènes, les adventices, les animaux et les insectes sont responsables de la perte de 20 à 40% de la production agricole mondiale (Savary, Ficke, Aubertot, & Hollier, 2012). L'utilisation de plantes résistantes et de produits chimiques est couramment réalisée pour pallier aux maladies affectant les cultures. Néanmoins, la résistance n'existe pas contre toutes les maladies et l'utilisation de produits phytosanitaires est de plus en plus décriée par les consommateurs (Lugtenberg & Kamilova, 2009a). De plus, l'application de pesticides en milieu agricole peut impacter des organismes non-ciblés et contaminer le sol et le milieu aquatique (Margni et al., 2002). L'application de pesticides sur le long terme peut également avoir des effets indésirables sur l'équilibre biochimique du sol et par la même, réduire la fertilité et la productivité des sols (Hussain, Siddique, Saleem, Arshad, & Khalid, 2009).

De nos jours, l'agriculture se diversifie pour tendre vers des solutions plus durables et plus respectueuses de l'environnement. En tant que porte d'entrée permettant aux plantes d'absorber l'eau et les nutriments et d'interagir avec le sol, la rhizosphère peut potentiellement être gérée de manière à augmenter le rendement des cultures tout en diminuant l'apport des produits

agrochimiques (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012). En effet, la rhizosphère est un point chaud pour les interactions microbe-racine-sol (Berendsen et al., 2012) et la concentration en bactéries peut y atteindre jusque 10^{11} cellules par gramme de racine (Egamberdieva et al., 2008). Les approches biotechnologiques respectueuses de l'environnement telles que les biopesticides microbiens offrent des solutions de rechange à la lutte chimique contre les insectes, les champignons et les maladies des plantes. Parmi ces alternatives, le développement de bioformulations fabriquées à partir de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Borriss, 2011).

En effet certains microorganismes participent au bon maintien de l'écologie du sol. Tout d'abord, ceux-ci ont un rôle important dans de nombreux processus du sol comme la décomposition de résidus organiques, la minéralisation, le processus de turnover et le maintien de la structure du sol (Nihorimbere, Ongena, Smargiassi, & Thonart, 2011). D'autres microorganismes soutiennent également la croissance des cultures par la mise à disposition de nutriments ou la mise en place d'une protection contre les pathogènes (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012). Ces derniers présentent des genres d'intérêt potentiellement valorisables en tant que biopesticides ou biofertilisants (Bhattacharyya & Jha, 2012). L'ingénierie des sphères rhizoïdales pourrait dès lors réduire notre dépendance à l'égard des produits agrochimiques en remplaçant leurs fonctions par des microbes bénéfiques. Toutefois cette stratégie repose en grande partie sur la compréhension en profondeur des interactions racine-sol-microbe de la rhizosphère (Zhang, Vivanco, & Shen, 2017). L'efficacité de tels agents ne sera optimale que si l'application de ces produits sur le sol mène à une colonisation performante du milieu par les souches utilisées (Mcspadden Gardener, 2004).

La recherche sur les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes a augmenté depuis quelques années et se tourne vers les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* qui sont des PGPR² bien connus et très présents dans les sols (Santoyo, del Orozco-Mosqueda, & Govindappa, 2012). Bien que de grandes avancées aient été réalisées dans la recherche sur *Bacillus* et *Pseudomonas*, l'utilisation commerciale de ces bactéries en agriculture est limitée par des difficultés à préparer des produits stables à grande durée de vie qui puissent être compétitifs avec les produits phytosanitaires (Borriss, 2011). Les bactéries du genre *Bacillus* qui sont formatrices de spores pourraient constituer une solution intéressante grâce à leur potentiel de

² Plant growth promoting rhizobacteria

conservation (Borriss, 2011). Un autre moyen pour améliorer les bioformulations serait de réaliser des combinaisons d'agents de biocontrôles (Whipps, 2001).

L'utilisation de bioformulations comme alternative aux intrants chimiques est une solution attrayante à haut potentiel, néanmoins cette technique a aussi certaines limites. En effet, bien que de nombreuses souches affichent de bons résultats lors des essais, cela ne se traduit souvent pas par un biocontrôle efficace en situation de terrain (Kiely et al., 2006). La rhizosphère est un environnement hostile dans laquelle les microorganismes de l'inoculant n'arrive pas toujours à s'intégrer efficacement, ce qui mène à un échec de l'inoculation sur les cultures. Les facteurs abiotiques (T°, pH, disponibilité en oxygène) peuvent être la cause de cet échec mais également les facteurs biotiques comme la présence d'une communauté microbienne avec laquelle les microorganismes inoculés vont entrer en interaction. (Arora, Verma, & Mishra, 2017) ou encore la spécificité du contexte nutritionnel de la plante hôte (Ongena & Jacques, 2008). Dans ce contexte, il est essentiel de mener des investigations sur les interactions auxquelles vont faire face les PGPR dans le sol. Ces investigations pourront permettre d'identifier les interactions négatives pouvant mettre en échec les inoculations ou les interactions synergiques qui pourraient être mises à profit.

Parmi le genre *Bacillus*, les bactéries du complexe d'espèce « *Bacillus subtili* » sont connues pour leur impact sur la croissance des plantes dans la rhizosphère. *B. velezensis* qui fait partie de ce complexe (Fan, Blom, Klenk, & Borriss, 2017) s'est montrée être une espèce efficace dans la production de molécules bioactives (Rabbee et al., 2019). De plus, une nouvelle bactériocine avec un pouvoir antibactérien, l'amylocyclicine, a été identifiée comme produite par *B. velezensis* (Scholz et al., 2014) et pourrait donc constituer une nouvelle molécule bioactive d'intérêt.

2. Revue bibliographique

2.1 La rhizosphère, zone dynamique de développement et d'interactions

La rhizosphère correspond littéralement à la zone (« sphère ») du sol influencée par les racines (« rhizo ») des plantes (Prashar, Kapoor, & Sachdeva, 2014). Cette zone du sol est riche en nutriments notamment grâce au relargage d'exsudats réalisé par les racines (Morgan, Bending, & White, 2005). Les exsudats sont des composés organiques, par exemple des acides aminés et des sucres représentant une source d'énergie et de nutriments pour la microflore du sol (Lugtenberg & Kamilova, 2009b). De plus, ces exsudats fournis par les plantes agissent comme un moteur de la croissance microbienne dans la rhizosphère induisant l'établissement d'une microflore riche dans la zone autour de la plante. Cet effet est appelé « l'effet de la rhizosphère » et implique une densité microbienne plus importante dans la rhizosphère que dans le sol alentour (Lugtenberg & Kamilova, 2009a). Ces caractéristiques font de la rhizosphère une zone dynamique de développement et d'interactions (Nihorimbere et al., 2011). Cette zone peut être séparée en différents niveaux en fonction de la proximité de la plante avec le sol (figure 1). Une large gamme de macro et microorganismes, comme des bactéries, des algues, des nématodes et des champignons coexistent (Figure 1) dans la rhizosphère et montrent une variété d'interactions entre eux ainsi qu'avec la plante (Harsh P. Bais, Weir, Perry, Gilroy, & Vivanco, 2006).

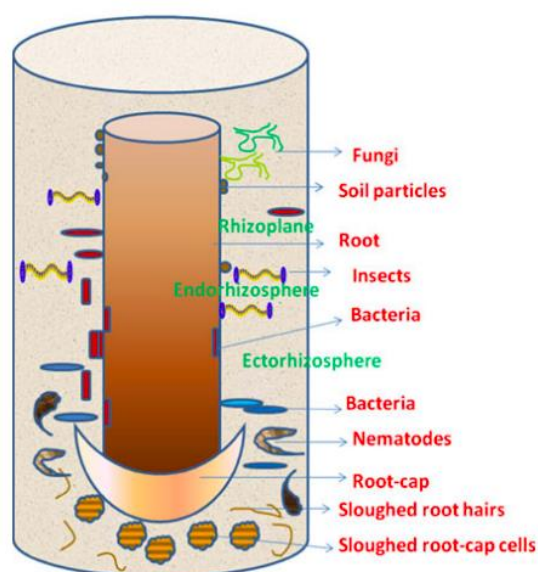


Figure 1. **Zones et acteurs de la rhizosphère.** Diagramme simplifié de la rhizosphère présentant différentes zones et composantes d'après Prashar et al., 2014. Représentation de la séparation de la rhizosphère en différents niveaux selon la proximité avec la plante (L'endorhizosphère, la rhizoplane et l'ectorhizoplane), ainsi que de la diversité d'organismes présents autour de la racine.

La rhizosphère représente donc une zone complexe et dynamique dans laquelle les interactions et les mécanismes sont nombreux et souvent encore inconnus. De ce fait, bien qu'il soit important de chercher à appliquer de nouvelles technologies, il peut s'avérer intéressant de tout d'abord comprendre les principes de base de l'écologie microbienne du sol (Berg & Smalla, 2009). En effet, l'application de nouvelles technologies microbiennes ou de n'importe quelle pratique agricole pourraient perturber l'écologie déjà en place ou avoir des effets néfastes sur le milieu dans lequel elles sont appliquées (Zhang et al., 2017).

La communauté microbienne du sol est influencée par différents facteurs biotiques et abiotiques (Figure 2). En ce qui concerne les facteurs abiotiques, le sol qui agit comme support de la croissance des plantes mais aussi des microorganismes, a un impact sur la population microbienne (Zhang et al., 2017). La communauté microbienne va être influencée par le type de sol (Fierer & Jackson, 2006) ainsi que par les caractéristiques du sol comme le pH, la salinité, la texture, la teneur en matières organiques et la concentration en nutriments (Marschner, Yang, Lieberei, & Crowley, 2001). D'autres facteurs abiotique tels que l'irrigation, le labour, et l'utilisation d'intrants ont également un impact significatif sur la composition bactérienne de la rhizosphère (Berg & Smalla, 2009; Prashar et al., 2014). Parmi les facteurs biotiques influençant la communauté bactérienne, le facteur biotique le plus important correspond à la plante de par l'impact du type d'exsudats sur la population microbienne. En plus du type d'exsudats, le stade de croissance de la plante, la variété ainsi que le type de racine impactent également la population microbienne (Berg & Smalla, 2009; Prashar et al., 2014). En effet, lors d'expérimentations sous des conditions environnementales et de types de sol identiques, la plante a été identifiée comme le principal facteur affectant la structure et la fonction du rhizomicrobiote. Par conséquent, la plante agit comme un filtre pour son propre rhizomicrobiote (Zhang et al., 2017). Néanmoins, les caractéristiques microbiotiques spécifiques comme la formation d'un biofilm et l'adhésion superficielle peuvent également déterminer quels microorganismes sont à même de coloniser la rhizosphère. En définitive, la structure du rhizomicrobiome est le résultat d'interactions complexes entre les racines, le sol et les microbes (Zhang et al., 2017).

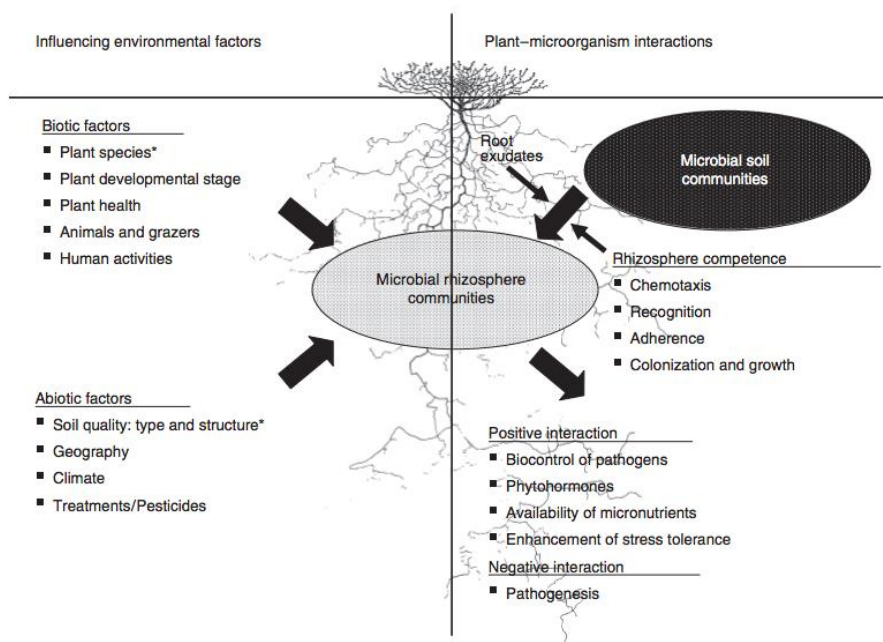


Figure 2. **Facteurs influençant la rhizomicrobiote.** Cette figure représente les facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques) et les interactions entre les plantes et les microorganismes pouvant influencer le rhizomicrobiote d'après Berg & Smalla, 2009.

2.1.1 Les interactions plantes-bactéries dans la rhizosphère

L'ensemble des microbes associés à la rhizosphère constitue le microbiote racinaire. Les plantes vivent en étroite association avec ces microorganismes qui vont jouer un rôle important dans le maintien de la santé des plantes (Berendsen et al., 2012).

Le relargage de matières organiques par la plante sous forme d'exsudats donne lieu à l'effet rhizosphère qui va induire une croissance microbienne dans la zone autour de la plante (Grayston, Vaughan, & Jones, 1997). L'effet de la rhizosphère est caractérisé par une perte en carbone pour la plante qui est compensée par les avantages conférés par le microbiote racinaire. Ces avantages sont le maintien du recyclage en nutriments, la production d'hormones, l'aide à la résistance contre les maladies, la protection contre les composés toxiques ou encore la mise en place d'associations symbiotiques permettant l'approvisionnement en éléments minéraux (Morgan et al., 2005). Des effets indésirables sont également présents comme la croissance de pathogènes autour des racines. La présence de ces différents microorganismes mène à une diversité d'interactions plantes-bactéries dans la rhizosphère.

Les exsudats produits par la plante et émis dans la rhizosphère sont majoritairement des composés organiques comme des sucres et des acides organiques. On retrouve également des

d'acides aminés, des acides gras, des hormones, des vitamines et des facteurs de croissances (Bertin, Yang, & Weston, 2003). En plus de promouvoir la production de ressources trophiques pour les microbes de la rhizosphère les plantes leur fournissent une structure sur laquelle s'attacher, la racine (Turner, James, & Poole, 2014).

Il existe différents types d'interactions entre les bactéries rhizosphériques et les plantes au sein de la rhizosphère. Le type d'interactions que vont entretenir une plante et un microorganisme va dépendre de différents facteurs comme le statut nutritif de la plante, l'environnement du sol, le mécanisme de défense des plantes et le type de micro-organismes qui prolifèrent dans la zone. (Parmar & Dufresne, 2011) En fonction de ces facteurs les relations plantes-bactéries pourront être bénéfiques, commensales ou pathogéniques (Figure 3).

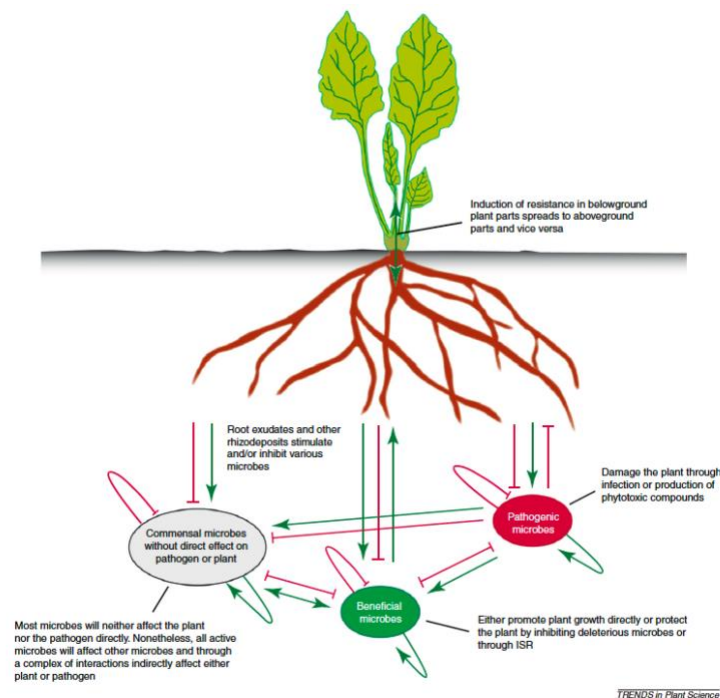


Figure 3. **Les interactions plantes-microbes dans la Rhizosphère.** Représentation des types d'interactions plantes-bactéries pouvant survenir dans la rhizosphère d'après Berendsen et al., 2012. Les trois types de microbes en fonction de leur relation avec la plante sont représentés (Commensal, bénéfique et pathogène). Les relations de stimulation (vert) et d'inhibition (rouge) entre la plante et les microbes sont également représentées.

Les bactéries entretenant une interaction bénéfique avec la plante sont communément désignées comme des PGPR (Beneduzi et al., 2012). Ces bactéries stimulent la croissance des plantes selon différents mécanismes incluant la mobilisation des nutriments du sol, la production de régulateurs de croissance, le contrôle des pathogènes et la séquestration des métaux lourds (Ahemad & Kibret, 2014).

2.1.2 Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont des bactéries du sol qui, quand elles sont cultivées avec une plante, améliorent sa croissance (Vessey, 2003). Il en existe différentes sortes dont certaines ont été répertoriées par Ahemad et Kibret en 2014.

Les recherches sur ces bactéries se développant autour ou dans les tissus des plantes sont en augmentation croissante depuis la citation du terme PGPR pour la première fois en 1978 par Kloepper et Schroth (Bhattacharyya & Jha, 2012). Le but des recherches est de booster l'action positive des PGPR sur les plantes dans le but de les utiliser comme biofertilisants, comme agents de bio-contrôles ou comme phytostimulateurs (Vessey, 2003) (Figure 4). Ces recherches sont essentielles pour l'agriculture d'aujourd'hui. En effet, de nouvelles méthodes doivent être développées pour assurer l'évolution de l'agriculture vers un système plus durable. L'utilisation de PGPR pour soutenir les activités de production pourrait constituer une alternative attrayante de lutte biologique. De par leurs aspects respectueux de l'environnement et leur rentabilité, les PGPR représentent une possibilité intéressante pour remplacer les fertilisants chimiques et les pesticides dans le futur (Ahemad & Kibret, 2014).

PGPR forms	Definition	Mechanism of action
Biofertilizer	A substance that contains live microorganisms which, when applied on the seed, plant surface or soil, colonizes the rhizosphere and promote plant growth through increased supply of primary nutrients for the host plant	Biological nitrogen fixation Utilization of insoluble phosphorus
Phytohormone	Microorganism, with the ability to produce phytohormones such as indole acetic acid, gibberellic acid, cytokinins and ethylene	Production of phytohormones
Biopesticide	Microorganisms that promote plant growth by controlling phytopathogenic agents	Production of antibiotics, siderophores, HCN Production of hydrolytic enzymes Acquired and Induced systemic resistance

Figure 4. **Utilisations courantes de PGPR.** Différentes utilisations des PGPRs et leurs mécanismes d'action d'après Bhattacharyya & Jha, 2012.

Les PGPR peuvent agir par voie nommée directe (Beneduzi et al., 2012) sur le développement de la plante avec laquelle ils interagissent. Certains de ces microorganismes vont améliorer le statut nutritif de la plante par différents mécanismes : aide à la fixation de l'azote (ex : *Rhizobium* (Lugtenberg & Kamilova, 2009a)), augmentation de la disponibilité en nutriments, augmentation de la surface d'échange des racines, ou solubilisation du phosphore et du fer (Bhattacharyya & Jha, 2012). D'autres auront un effet encore plus direct par la synthèse des composés directement utilisables par la plante. Par exemple des phytohormones (ex :

production d'auxine par *P. fluorescens*) ou de substances volatiles (ex : *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) (Lugtenberg & Kamilova, 2009a). Ces rhizobactéries seront valorisées en fonction de leur activité en biofertilisants ou en phyto-stimulateurs (figure 4).

Les PGPR sont également capables d'agir selon une voie indirecte sur la croissance des plantes (Beneduzi et al., 2012). En effet, la croissance des plantes sera améliorée indirectement par une réduction de l'impact négatif de pathogènes sur cette dernière. Ces microorganismes pourront être valorisés en tant que biopesticides. Certains PGPR, que l'on peut qualifier d'antagonistes auront un effet local sur les pathogènes du sol grâce à la production de composés antimicrobiens. Ces composés sont notamment représentés par les sidérophores, les bactériocines et les antibiotiques (Beneduzi et al., 2012). Des exemples d'antibiotiques sont la production de phenazine par *P. spp.* (Mavrodi, Blankenfeldt, & Thomashow, 2006) et la production de lipopeptides (LPS³) biosurfactants produit par *B. subtilis* (Ongena et al., 2007a). D'autres bactéries ont le pouvoir d'induire une résistance aux pathogènes chez la plante (L'ISR⁴) (Beneduzi et al., 2012). La résistance systémique induite (ISR) consiste en une capacité de résistance accrue de la plante contre un large spectre de pathogènes due à une stimulation par une souche de bactérie non pathogène. (De Vleeschauwer & Höfte, 2009) Il n'existe pas de voie de résistance définie pour la ISR mais de multiples voies dépendantes selon la rhizobactérie, la plante et le phytopathogène entrant en considération (De Vleeschauwer & Höfte, 2009). Des souches de *Bacillus* et *Pseudomonas* ont été identifiées comme induisant une résistance systémique induite chez les plantes (Kloepper, Ryu, & Zhang, 2004; Van Loon, 2007)

Les bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* auxquelles ce travail va s'intéresser plus particulièrement sont des PGPR reconnues pour leur production de composé bioactif aux propriétés antibactériennes (Perneel et al., 2007; Ruiz-García, Béjar, Martínez-Checa, Llamas, & Quesada, 2005). Ces bactéries font partie des genres les plus étudiés ce qui est notamment dû à leur prédominance dans de nombreux habitats, le fait qu'ils abritent des espèces pathogènes et bénéfiques, et présentent des modes de vie diversifiés (Raaijmakers, de Bruijn, Nybroe, & Ongena, 2010).

³ Lipopeptides

⁴ Induced systemic resistance

Les PGPR peuvent également être classées en sous éléments en fonction de leur lieu d'implantation. Ainsi on retrouvera les PGPR internes (endophytes) vivant dans les structures nodulaires des cellules racinaires, et les PGPR externes (épiphytes) vivant librement autour de la racine (Martínez-Viveros, Jorquera, Crowley, Gajardo, & Mora, 2010).

L'utilisation des PGPR comme agents de bio-contrôle en agriculture est une solution viable pour remplacer les produits chimiques existants. Néanmoins l'efficacité de tels produits va dépendre de certaines caractéristiques importantes. En effet, certains traits sont indispensables pour que les PGPR soient de bons candidats en tant qu'agents de bio-contrôle. Ces traits sont notamment, un taux de croissance rapide, une capacité de colonisation dans différents environnements, la compétitivité pour les nutriments du système, la survie sous un certain stress, la synthèse des composés antimicrobiens et bien évidemment l'habilité à promouvoir la croissance des plantes (Bhattacharyya & Jha, 2012 Santoyo, Del, Orozco-Mosqueda, & Govindappa, 2012)

2.1.3 La rhizosphère : zone d'interactions entre bactéries

En plus de l'impact des facteurs biotiques et abiotiques énoncés plus haut, la forte densité en microorganismes dans la rhizosphère, le temps de génération très court des microbes et leur origine ancienne sont autant d'arguments qui prètent à penser que les interactions microbiennes façonnent également le rhizomicrobiote (Hassani, Durán, & Hacquard, 2018). Les deux types d'interactions principales ayant lieu entre les bactéries qui composent le microbiote racinaire sont les interactions coopératives et les interactions compétitives (Hassani et al., 2018).

Les interactions coopératives comprennent tout d'abord les échanges métaboliques bénéfiques comme les interdépendances alimentaires et/ou le « cross feeding ». Ces interactions coopératives correspondent à l'échange de métabolites entre microbes et peuvent conférer un avantage certains dans les milieux carencés (Zelezniak et al., 2015). La formation d'un biofilm est aussi impliquée dans les interactions coopératives. En effet, en plus de protéger la bactérie productrice, il peut également protéger des bactéries alentour et permettre l'échange des métabolites (Hassani et al., 2018). Pour finir, des interactions coopératives sont également réalisées par communications moléculaires. Ces systèmes sont des stimuli et des réponses utilisés par les microbes pour détecter d'autres microbes, activer des processus biologiques spécifiques et/ou mesurer la densité de population (Hassani et al., 2018). L'un de ces mécanismes réalisés par beaucoup de bactéries est le « Quorum sensing ».

Le quorum sensing est un mécanisme d'échanges dépendant de la densité et pour lequel la communication est régulée par une concentration de seuil en molécules de signalisation appelées auto-inducteurs (Vadakkan, Choudhury, Gunasekaran, Hemapriya, & Vijayanand, 2018). D'autres composés microbiens ont également été signalés comme des molécules de signalisation comme les composés organiques volatils (COV⁵), l'acide oxalique ou le glucose (Hassani et al., 2018).

Les interactions compétitives entre bactéries sont de deux natures. Elles sont soit indirectes par la consommation de ressources ou la colonisation de l'espace, soit directes par dommages infligés (Ghoul & Mitri, 2016; Hassani et al., 2018). La consommation d'une ressource limitante par une souche va réduire sa disponibilité pour les espèces concurrentes environnantes (Ghoul & Mitri, 2016). Cette forme de compétition est reconnue comme un trait important des agents de biocontrôle pour neutraliser les pathogénies (Hassani et al., 2018). Un exemple d'une telle stratégie est la séquestration du fer grâce à la production de sidérophores (Ghoul & Mitri, 2016). La compétition directe quant à elle peut se réaliser par la production de composés antimicrobiens ou de composés volatils, par la prédation ou encore via des mécanismes nécessitant un contact entre les bactéries (Ghoul & Mitri, 2016; Hassani et al., 2018).

2.2 Le biofilm, un environnement complexe

Les bactéries qui résident dans les environnements relatifs aux plantes sont le plus souvent retrouvées sous la forme de systèmes biologiques complexes connus sous le nom de biofilms. Les biofilms sont des assemblages multicellulaires bactériens complexes, généralement encapsulés dans une matrice (aussi appelée la substance extra cellulaire polymérique ou EPS⁶) composée d'exo-polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN⁷ extracellulaire permettant aux colonies bactériennes de s'attacher à des surfaces solides biotiques ou abiotiques ou de former des agrégats (Flemming & Wingender, 2010; Flemming et al., 2016). La vie dans un biofilm offre plusieurs avantages aux bactéries (la coopération sociale, la saisie des ressources et la protection contre les composés antimicrobiens) (Danhorn & Fuqua, 2007) et permet un style de vie totalement différent du mode planctonique dans laquelle les cellules développent de nouvelles propriétés. (Flemming & Wingender, 2010).

⁵ composés organiques volatils

⁶ Extracellular polymeric substance

⁷ Acide désoxyribonucléique

Dans la rhizosphère, les molécules produites par les plantes fonctionnent comme un signal chimique qui attire les bactéries mobiles vers la surface des racines ce qui favorise la formation de biofilms (Ongena & Jacques, 2008).

Les bactéries liées aux plantes se fixent et forment des biofilms sur différents tissus, notamment les feuilles, les tiges, le système vasculaire, les graines et les racines. La formation d'un biofilm est une stratégie adaptative qui permet une résistance aux stress environnementaux, une protection contre la prédation et les composés antimicrobiens ainsi qu'une meilleure assimilation des nutriments (Castiblanco & Sundin, 2016; Danhorn & Fuqua, 2007). Pour les bactéries vivant en association avec les plantes, la formation d'un biofilm est également une stratégie adaptative qui permet la colonisation et des interactions avec la plante hôte (Castiblanco & Sundin, 2016). La formation d'un biofilm par des bactéries sur les racines d'une plante participe à la promotion de la croissance de la plante et à la protection de cette dernière contre les pathogènes via la sécrétion de composés antimicrobiens et l'ISR (Rabbee et al., 2019).

La densité cellulaire dans les biofilms est très importante et peut aller de 10^8 à 10^{11} cellules/g de matière sèche (Flemming et al., 2016). A l'intérieure d'un biofilm uni-espèce, des bactéries génétiquement identiques vont exprimer différents gènes et se répartir en sous-populations de cellules fonctionnellement différentes.

2.3 *Bacillus* un genre ubiquitaire à grand potentiel agronomique

Le genre *Bacillus* comprend plus de 60 espèces à gram-négatif en forme de bâtonnets et formatrices de spores. Elles sont le plus souvent aérobies mais également aérobies facultatives (Sansinenea & Ortiz, 2011). Les espèces du genre *Bacillus* présentent une grande diversité de phénotypes et leur rôle dans les écosystèmes sont très variables. On les retrouve dans de nombreux environnements comme le sol, la roche, la poussière, les milieux aquatiques, la végétation, la nourriture et les intestins de différents insectes et animaux d'où leur description en tant que genre ubiquitaire (Abriouel, Franz, Omar, & Galvez, 2011; Nicholson, 2002). Les bactéries du genre *Bacillus* montrent une diversité de phénotypes et de génotypes, et présentent donc des propriétés physiologiques très diverses.

Certains *Bacillus* sont capables de dégrader différents substrats, de précipiter le fer, de nitrifier, de dénitrifier ou d'oxyder certains métaux (Slepecky & Hemphill, 2006). C'est cette diversité de propriétés physiologiques et leur capacité à former des spores qui leur a permis de coloniser une grande diversité d'habitats (Abriouel et al., 2011).

Si certaines espèces de *Bacillus* sont des pathogènes, d'autres sont valorisables en tant qu'agents de biocontrôle et sont donc des espèces d'intérêt pour l'agriculture (Wulff et al., 2002). Les bactéries du genre *Bacillus* qui agissent comme des PGPR fournissent énormément de ressources pour le biocontrôle. Les souches appartenant à ce genre secrètent un spectre diversifié de métabolites secondaires à activité antimicrobienne et des composés favorisant la croissance des plantes (Liu et al., 2017). Les métabolites secondaires qui, contrairement aux métabolites primaires, ne sont pas essentiels pour le fonctionnement de la cellule sont nombreux à représenter un intérêt scientifique et économique (Heitefuss, 2009). Ces derniers vont avoir différentes applications, ils peuvent être impliqués dans la lutte contre d'autres bactéries, être des molécules impliquées dans la communication entre bactéries ou entre la bactérie et son hôte afin de favoriser l'implantation dans un milieu (Sansinenea & Ortiz, 2011). Cette production de métabolites secondaires fait de *Bacillus* un genre compétitif capable de s'implanter dans la rhizosphère et d'être concurrentiel par rapport aux autres organismes.

Les bactéries du genre *Bacillus* qui agissent comme PGPR peuvent soutenir le développement de la plante de différentes façons (Meena et al., 2017). Tout d'abord, en synthétisant des composés phytostimulants tels que la cytokinine ou l'auxine (Ahmad, Ahmad, & Khan, 2008; Santoyo, del Orozco-Mosqueda, et al., 2012), en produisant des COV (Santoyo, del Orozco-Mosqueda, et al., 2012) ou en facilitant l'accès aux minéraux du sol, par exemple en solubilisant le phosphore ou en fixant l'azote du sol (Meena et al., 2017). Ensuite, certaines bactéries du genre *Bacillus* ont la capacité d'induire une résistance systémique chez la plante (Santoyo, del Orozco-Mosqueda, et al., 2012). En effet, certains LPs comme la fengycine et la surfactine pourraient être impliqués dans ce processus d'élicitation (Ongena et al., 2007b). Les lipopeptides ont également été étudiés pour leur activité antagoniste contre les agents pathogènes des plantes. Les LPs des familles des surfactines, des fengycines, et des iturines ont été identifiés comme ayant un rôle dans la suppression de la croissance des pathogènes (Ongena et al., 2007b; Santoyo, del Orozco-Mosqueda, et al., 2012). D'autres métabolites secondaires

comme les polykétides (PKs⁸) (macrolactine, bacillaene et difficidine), les bactériocines dont l'amylocycline et les antibiotiques peuvent être produits par *Bacillus* sp. et avoir des effets anti-bactériens et/ou antifongiques (Borriss, 2015).

Les caractéristiques énoncées ci-avant, font de ces bactéries des espèces d'intérêt pour la recherche, l'ingénierie et l'agriculture (Sansinenea & Ortiz, 2011). Par ailleurs, plusieurs produits à base de *Bacillus* ont déjà été commercialisés, notamment des produits basés sur les espèces *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* (Pérez-García, Romero, & de Vicente, 2011). *B. velezensis* qui est une espèce faisant partie du complexe d'espèces de *B. subtilis* (Fan et al., 2017) s'est montré être une espèce efficace dans la production de molécules bioactives (Rabbee et al., 2019).

A l'intérieure d'un biofilm, une hétérogénéité environnementale et cellulaire peut se produire. En effet, la création d'un gradient de nutriments ou d'oxygène à l'intérieure du biofilm peut induire une différenciation des cellules en divers phénotypes (van Gestel, Vlamakis, & Kolter, 2015). D'autres raisons vont mener à la différenciation phénotypiques entre les cellules d'un biofilm comme la mise en place d'un gradient chimique (par activité métabolique bactérienne et diffusion de solutés) ou la variation génotypique des cellules due à des mutations (Stewart & Franklin, 2008).

2.3.1 *Bacillus velezensis* et production de molécules bioactives

B. velezensis est une espèce de bactérie aérobie à Gram-positif, formatrice d'endospores qui favorise la croissance des plantes (Rabbee et al., 2019). Cette espèce fait partie du complexe d'espèces de *B. subtilis* (Fan et al., 2017), et plus particulièrement du groupe opérationnel *B. amyloliquefaciens* comprenant *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis*, et *B. velezensis* (Fan et al., 2017). Ce groupe opérationnel comprend les plus importants bacilles de biocontrôle et de promotion de la croissance des plantes. Ils sont utilisés avec succès dans l'agriculture notamment grâce à leur capacité à coloniser les végétaux et à résister à de fortes réactions des plantes (Borriss, 2011).

⁸ Polykétides

En 2015, une souche isolée à partir d'échantillons environnementaux prélevés à l'embouchure de la rivière Vélez à Torredelmar, dans la province de Malaga en Espagne a été nommée pour la première fois comme appartenant à l'espèce *B. velezensis* (Ruiz-García et al., 2005). Depuis, plusieurs espèces de *Bacillus* ont été reclassées comme *B. velezensis* (Rabbee et al., 2019) et certaines souches de *B. velezensis* ont déjà été commercialisées comme bio-inoculant pour le contrôle de plusieurs maladies présentes dans le sol (Cawoy, Bettioli, Fickers, & Onge, 2012). Les molécules bioactives produites par *B. velezensis* ont été répertoriées par Rabbee et al. en 2019 et sont présentées dans le tableau 1.

Genes and gene clusters encoding for the secondary metabolites in *B. velezensis*.

Metabolite	Genes and gene clusters	Enzyme	Size (kb)	Functions	Controlling Effects
Nonribosomal synthesis of lipopeptides (LP)					
★ Surfactin	<i>srfABCD</i>	NRPS	32.0	Biofilm, Induction of ISR	Fungi
★ Fengycin	<i>fenABCDE</i>	NRPS	38.2	Induction of ISR	Fungi
Bacillomycin-D	<i>bmyCBAD</i>	NRPS/PKS	39.7	Induction of ISR	Fungi
★ Bacillibactin	<i>dhbABCDEF</i>	NRPS	12.8	Siderophore production	Microbial competitors
Nonribosomal synthesis of polyketides (PK)					
★ Difficidin	<i>dfnAYBCDEFGHIJKLM</i>	NRPS	71.1	Direct suppression	Bacteria
★ Bacillaene	<i>baeBCDE, acpK, baeGHIJLMNRS</i>	PKS/NRPS	74.3	Direct suppression	Bacteria
★ Macrolactin	<i>mlnABCDEFGHI</i>	NRPS	53.9	Direct suppression	Bacteria
Nonribosomal synthesis of dipeptide antibiotics					
★ Bacilysin	<i>bacABCDE, ywfG</i>	NRPS	6.9	Direct suppression	Bacteria, Cyanobacteria
Ribosomal synthesis of bacteriocins					
Plantazolicin	<i>pznFKGHIAJC DBEL</i>	-	9.96	Direct suppression	Bacteria, Nematodes
★ Amylocyclicin	<i>ac n BACDEF</i>	-	4.49	Direct suppression	Bacteria
Synthesis of VOCs					
Acetoin and 2,3-butanediol	<i>alsSD; bdhA</i>	Acetolactate synthase/decarboxylase and 2,3-butanediol dehydrogenase	3.6	Induction of ISR	Bacteria, Fungi

NRPS = nonribosomal peptide synthetases; PKS = polyketide synthases; ISR = induced systemic resistance; VOCs: volatile organic compounds.

Tableau 1. Molécules bioactives produites par *B. velezensis* d'après Rabbee et al., 2019. Les étoiles vertes représentent les molécules bioactives produites par *B. velezensis* GA1

2.3.2 L'amylocyclicine

Parmi les métabolites secondaires produits par *B. velezensis*, se retrouve l'amylocyclicine. Cette molécule bioactive est une bactériocine. Les bactériocines sont des peptides⁹ antimicrobiens produits par synthèse ribosomique (Abriouel et al., 2011). Ces molécules bioactives se distinguent des antibiotiques traditionnels par leur spectre d'action qui est relativement étroit et leurs cibles qui sont souvent des bactéries étroitement liées à la souche productrice. Les bactériocines permettent à la souche de s'établir dans une communauté microbienne, de se défendre contre l'invasion de leur niche par de nouvelles espèces ou de limiter l'avancée des cellules voisines (Riley & Wertz, 2002).

⁹ Polymère d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques

L'amylocycline est un peptide circulaire, hautement hydrophobe d'une masse de 6,381 Da¹⁰ avec une activité antimicrobienne à l'encontre des bactéries à gram-positif (Scholz et al., 2014). Elle a été découverte en 2014 par Scholz et al., et identifiée dans les métabolites secondaires produits par *B. amyloliquifaciens* FZB42 qui a maintenant été déclassifié comme une souche de *B. velezensis* (Rabbee et al., 2019). Un opéron de 6 gènes (Figure 5) qui représente 4490 bp¹¹ est responsable de la production, de la modification, de l'immunité et de l'exportation de ce composé antimicrobien (Scholz et al., 2014).

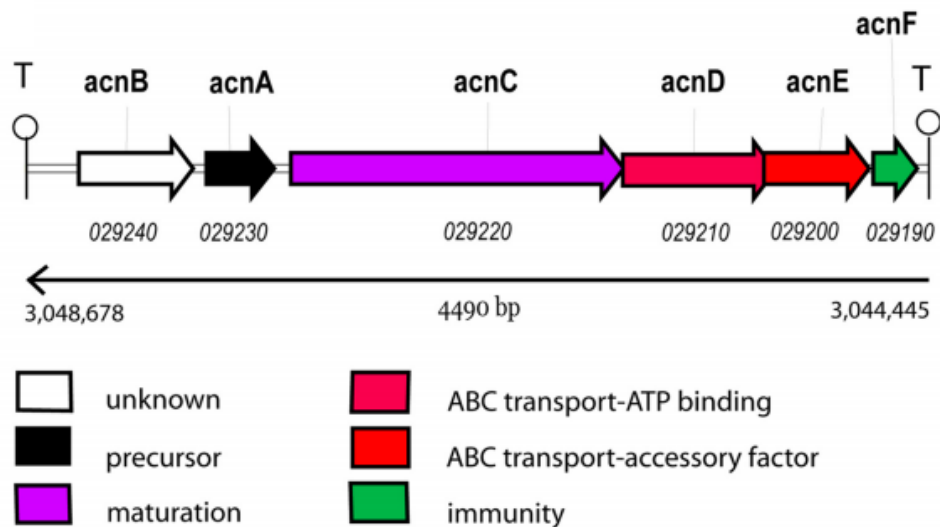


Figure 5. Ensemble des gènes codant pour la production de l'amylocycline d'après Scholz et al., 2014

Scholz et al. ont démontré une activité inhibitrice de FZB42 sur la croissance de souches bactériennes à Gram-positif étroitement apparentées (Scholz et al., 2014). Cette bactériocine pourrait donc avoir une fonction dans la compétition avec d'autres souches de *Bacillus* (Chowdhury, Hartmann, Gao, & Borriss, 2015).

2.3.3 La surfactine

Un autre métabolite secondaire produit par *B. velezensis* est intéressant dans le cas de cette étude : la surfactine. Cette molécule bioactive est un lipopeptide cyclique produit par voie non ribosomique (NRPs¹²) (F. Peypoux, 1999) via l'intermédiaire des enzymes de synthèses peptidiques non ribosomiques (NRPS qui sont des multi-enzymes les Non-ribosomal peptides synthases (NRPSs¹³) (Finking & Marahiel, 2004). Elle fait partie de la famille de LPs des

¹⁰ Dalton

¹¹ Paire de base

¹² Nonribosomal Peptide

¹³ Nonribosomal Peptide synthetases

surfactines qui montrent des activités hémolytiques, antivirales et antibactériennes (Ongena & Jacques, 2008). La surfactine a tout d'abord été reconnue pour sa caractéristique de biosurfactant aux propriétés émulsifiantes et moussantes (F. Peypoux, 1999). Elle a également été identifiée comme jouant un rôle dans l'attachement et l'agrégation de cellules en biofilm chez *B. subtilis* (Hofemeister et al., 2004) ainsi que comme ayant des propriétés antibactériennes (Hofemeister et al., 2004). Pour finir, l'interaction de la surfactine avec les cellules des plantes agit comme un déclencheur immunitaire par la stimulation du phénomène de l'ISR (Ongena et al., 2007b). La surfactine joue également un rôle dans le « quorum sensing » (Raaijmakers et al., 2010)

2.4 *Pseudomonas* un autre modèle de rhizobactéries promotrice de la croissance des plantes

Le genre *Pseudomonas* comprend des bactéries gram-négatives, non formatrice de spores et prenant la forme de bâtonnets (Santoyo, del Orozco-Mosqueda, et al., 2012). C'est un genre ubiquitaire dans les sols agricoles et bien adapté à la vie dans la rhizosphère (Harsh Pal Bais, Fall, & Vivanco, 2004). Les espèces de *Pseudomonas* du sol ont un grand potentiel en tant que PGPR. En effet, elles produisent un large spectre de molécules bioactives comme des antibiotiques, des polysaccharides, des sidérophores, des LPs et des COV. Ce sont également de bons compétiteurs adaptés aux stress environnementaux et qui colonisent facilement et rapidement les milieux (Harsh Pal Bais et al., 2004). Comme *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. induit aussi une ISR chez la plante (Santoyo, del Orozco-Mosqueda, et al., 2012). *Pseudomonas* sp. fait partie des microorganismes les plus étudiés pour leur utilisation en tant qu'agent de biocontrôle (Raaijmakers et al., 2010).

La souche de CMR12a de *Pseudomonas* sp. utilisée dans cette étude a été isolée de la rhizosphère d'une culture de taro au Cameroun et identifiée en 2007 par Perneel et al. Elle a été sélectionnée pour sa production combinée de phénazines et de biosurfactans (Perneel et al., 2007). Cette espèce est classée dans le groupe des *Pseudomonas fluorescents* (Flury et al., 2016). En plus de la production de composés bioactifs, *Pseudomonas* sp. CMR12a s'est montré efficace pour coloniser le riz (Ma, Hoang Hua, Ongena, & Höfte, 2016).

Pseudomonas sp. CMR12 a produit deux classes de polypeptides cycliques (CLPs¹⁴), à savoir les sessilines et les orfamides qui sont synthétisées par voie non ribosomique (Ma et al., 2016). Cette bactérie produit également des phenazines qui sont des composés hétérocycliques azotés. L'importance de ces composés en tant que molécules bioactives a été démontrée notamment par leur activité antimicrobienne, antifongique et leur rôle dans l'activation de l'ISR chez la plante (D'aes et al., 2014; Ma et al., 2016; Olorunleke et al., 2017). Les CLPs présentent des activités biologiques contre les bactéries, les champignons, les virus et les protistes (Raaijmakers et al., 2010). En plus de leur rôle antimicrobien, les CLPs vont jouer un rôle dans la mobilité de *Pseudomonas* sp. (Raaijmakers et al., 2010) et dans l'induction d'une réponse systémique induite chez les plantes (ISR) (Ma et al., 2016). Des études ont démontré l'importance des orfamides dans le processus de swarming de *Pseudomonas* sp. CMR12a. Les sessilines présentent également un rôle dans la formation de biofilms. Finalement, l'interaction des sessilines et des orfamides mène à l'apparition de « white line » (D'aes et al., 2014). Les phenazines sont importantes dans les antibiooses et dans la formation de biofilms. En plus de ces propriétés antimicrobiennes, les phenazines jouent un rôle dans l'induction d'une ISR chez les plantes (Ma et al., 2016).

2.5 Analyse au niveau « Single cell »

Lors de l'étude des caractéristiques d'une population microbienne, l'hétérogénéité et les différenciations qui peuvent exister au sein de cette population d'intérêt ne doivent pas être négligées. Il est donc nécessaire d'étudier la population au moins d'une technique permettant de prendre en compte ces hétérogénéités. L'analyse au niveau « single cell » permet d'identifier et d'étudier ces hétérogénéités (Kaganovitch et al., 2018).

Différentes techniques ont été mises en place pour analyser les populations à l'échelle d'une cellule, au lieu de les considérer comme une entité indissociable. Il existe des systèmes dynamiques (figure 3.B), comme la microfluidique qui étudie l'évolution dans le temps d'une ou de plusieurs cellules. D'autres systèmes, tels que la cytométrie en flux, permettent des analyses instantanées (figure 3.A) et l'étude d'un nombre important de cellules à différents moments dans le temps.

¹⁴ Cyclic Lipopeptides

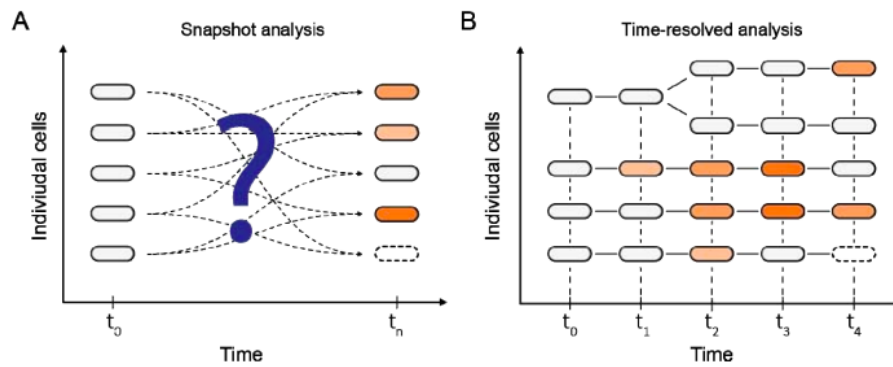


Figure 6. Comparaison d'informations données par une analyse instantanée en **A** et une analyse résolue dans le temps **B** (Grünberger, 2015)

2.5.1 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse quantitative qui permet de caractériser des populations cellulaires complexes au niveau unicellulaire. Elle permet notamment d'analyser de façon quantitative la distribution d'une propriété (par exemple la mortalité cellulaire ou la production d'une protéine d'intérêt) dans une population (Davey, 2002). Lors d'une analyse par cytométrie en flux, les cellules sont tout d'abord éclairées par un faisceau laser. L'analyse de la diffusion de la lumière par la cellule ou de l'émission de signaux fluorescents va alors donner des informations sur les paramètres structuraux et/ou fonctionnels de la cellule (Díaz, Herrero, García, & Quirós, 2010). Cette technologie va donc permettre d'acquérir rapidement des informations sur une population complexe et hétérogène.

La puissance de cette méthode réside à la fois dans la possibilité de déterminer un large éventail de paramètres cellulaires au niveau d'une seule cellule et dans la capacité d'obtenir des informations sur leur distribution au sein des populations cellulaires. Cette technologie permet notamment d'identifier des sous-ensembles fonctionnellement homogènes dans de grandes populations complexes (Díaz et al., 2010). Un autre point fort de la cytométrie en flux est sa capacité à analyser un grand nombre de particules (events) en un temps réduit, de 1000 event/s à 25000 event/s dans les technologies les plus avancées, et de représenter de 10000 à 500000 particules pour une population (Davey, 2002).

Le système d'analyse du cytomètre en flux est basé sur l'utilisation d'une source lumineuse (laser), d'un système hydraulique permettant de générer un flux unicellulaire ainsi que de filtres optiques de sélection des longueurs d'onde et d'un système de détection des signaux d'intérêt. Les données récoltées sont analysées par unité de traitement intégrée au système.

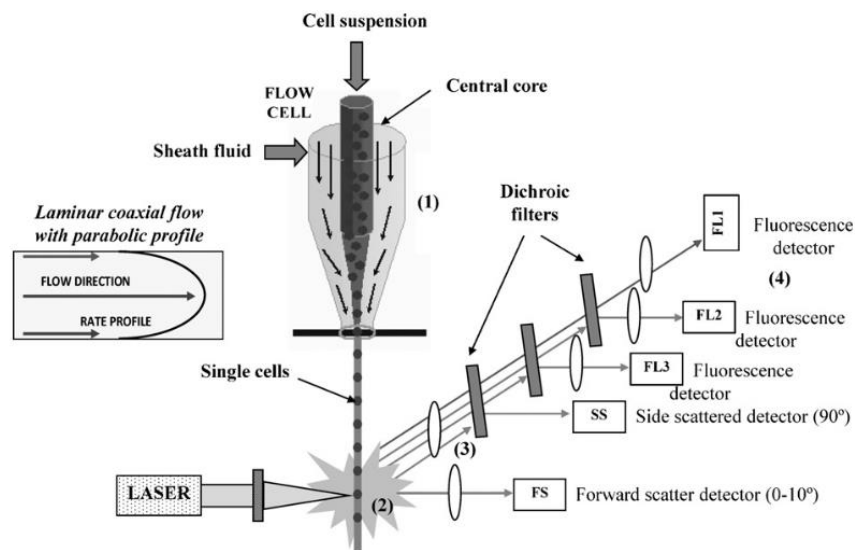


Figure 7. Schéma du système général d'un cytomètre en flux (Díaz et al., 2010)

Comme expliqué dans la figure 7, le système hydraulique donne lieu à un flux de particule unique dans la cellule d'écoulement. Le passage d'une particule par le faisceau du laser résulte en l'émission de différents signaux lumineux correspondant à différentes caractéristiques des particules. Les signaux sont séparés en fonction de leur longueur d'onde grâce à différents filtres. Ils sont alors collectés par un système de détection qui mesurera l'amplitude de l'impulsion lumineuse reçue. Il existe cinq systèmes de détection différents, deux systèmes de détection de signaux de diffusion et trois systèmes de détection de signaux fluorescents. Finalement les signaux sont envoyés à l'ordinateur qui mettra en place une représentation de la population en fonction des informations récoltées. Le nombre de signaux fluorescents pouvant être analysés augmente avec l'ajout d'autres lasers et détecteurs dans le système (Díaz et al., 2010).

Les signaux de diffusion sont liés aux paramètres intrinsèques des cellules puisqu'ils sont obtenus sans avoir à colorer l'échantillon. Le premier signal diffus est le « Forward SCatter » ou FSC il est collecté dans le sens de la lumière incidente et donne des informations sur la taille de la cellule. La quantité de lumière diffusée augmente avec la taille de la cellule. Le FSC sera donc d'autant plus important que la taille de la cellule sera importante. Quant au deuxième signal diffus, le « Side SCatter » ou SSC, il donne des informations sur la complexité cellulaire comme la taille du noyau ou le nombre d'organelles présents dans la cellule (Díaz et al., 2010).

En ce qui concerne les signaux fluorescents, l'utilisation de la fluorescence en cytométrie en flux permet d'obtenir des informations complémentaires sur la structure et la fonctionnalité des

cellules. Une possibilité est l'utilisation de colorants fluorescents qui se lient à des composants cellulaires comme les acides nucléiques ou des protéines. Par exemple, l'iodure de propidium (PI¹⁵) pénètre dans les cellules ayant une membrane endommagée et les colore en rouge. Ce dernier agira comme un indicateur de la mortalité cellulaire. Une autre possibilité est l'utilisation de protéines fluorescentes provenant d'organismes bioluminescents, comme les protéines fluorescentes vertes (GFP¹⁶). Ces dernières peuvent par exemple être utilisées comme système rapporteur d'un gène codant pour une protéine d'intérêt (Díaz et al., 2010). Etant donné que le cytomètre en flux possède plusieurs détecteurs de signaux fluorescents (Davey, 2002), il est possible d'analyser plusieurs caractéristiques des cellules en même temps. Il faut néanmoins prêter attention à ce que les spectres d'émission ne se superposent pas pour ne pas induire des erreurs d'analyse (Díaz et al., 2010).

Les données acquises lors de l'analyse de l'échantillon sont identifiées comme des « événements ». Elles peuvent être représentées de différentes façons comme des histogrammes mono- ou bi-paramétriques. La représentation d'une population la plus utilisée correspond au graphique en points (figure 8) permettant de visualiser l'entière population puisque chaque point représente une cellule unique. Il permet notamment d'identifier et d'analyser les sous-populations.

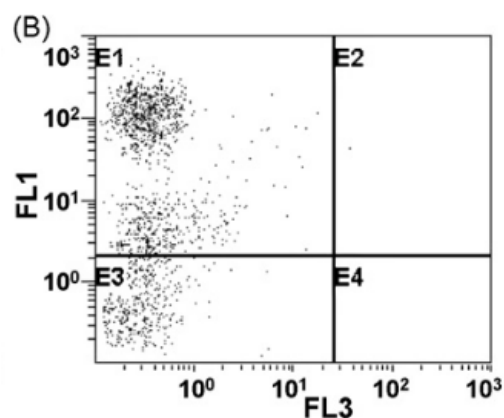


Figure 8. Graphique en points obtenu par cytométrie en flux permettant une représentation de la population totale analysée. (Díaz et al., 2010)

La cytométrie en flux possède de nombreuses applications industrielles notamment pharmaceutique, en médecine, en production laitière et en production d'alcool. Néanmoins cette technique possède également une grande utilité dans l'évaluation des populations bactériennes au sein des systèmes de gestion de l'eau et en microbiologie environnementale.

¹⁵ propidium iodide

¹⁶ Green fluorescent protein

En effet, elle pourrait permettre de réaliser une surveillance de l'écologie microbienne dans des conditions pertinentes pour l'environnement afin d'améliorer les connaissances sur les processus microbiens dans les milieux naturels.

2.5.2 La protéine fluorescente verte

La protéine fluorescente verte bien connue sous le nom de GFP, est une protéine fluorescente verte impliquée dans la bioluminescence de la méduse *Aequorea victoria* (Cosson & Mary, 2003) qui peut être utilisée comme un système rapporteur dans d'autres organismes vivants et ce sans l'ajout d'autres réactifs (Shapiro, 2000). Un rapporteur est un gène dont le produit (protéine) possède une caractéristique facilement détectable (fluorescence, activité enzymatique) permettant d'étudier l'évolution (transcription, traduction, localisation) d'un(e) gène/protéine d'intérêt. En effet, le gène possède toutes les informations nécessaires pour la synthèse du chromophore sans que des enzymes spécifiques à la méduse soient nécessaires (Tsien, 1998). Les protéines fluorescentes sont utilisées comme des outils d'investigation des dynamiques présentes dans les cellules vivantes (Mio R. et al., 2016). La GFP peut être utilisée comme un rapporteur permettant de quantifier l'activité transcriptionnelle d'un gène d'intérêt (Franke et al., 2007) ou comme un tag qui va permettre d'étudier la localisation des protéines dans un organisme (Cosson & Mary, 2003).

La protéine fluorescente verte (GFP) de *Aequorea victoria* est une protéine composée de 238 acides aminés qui possèdent une résistance aux conditions physico-chimiques dénaturantes assez impressionnante. Elle résiste à des températures allant jusqu'à 65°C et à un pH de 11. (Cosson & Mary, 2003). Elle doit sa fluorescence à un chromophore dont la formation nécessite deux modifications post-traductionnelles : une cyclisation et une oxydation (Cosson & Mary, 2003). Lorsque la protéine arrive à maturation, le chromophore est protégé à l'intérieur du repliement protéique. Bien que son repliement la protège des forces extérieures, la lumière peut affecter la fluorescence de la protéine en induisant la photolyse du chromophore ou des changements conformationnels de la protéine.

Le protéine GFPwt¹⁷ extraite de *Aequorea* absorbe la lumière avec une longueur d'onde d'excitation de 395 nm et de 475 nm (Heim, R; Cubitt, AB; Tsien, 1995). L'émission de fluorescence est maximale à 510 nm (Cormack, Valdivia, & Falkow, 1996). De nombreuses

¹⁷ Green Fluorescent protein Wild Type

mutations ont été réalisées sur la GFP pour essayer d'augmenter la fluorescence et la vitesse d'oxydation ou de diminuer l'isomérisation et la photolyse pour tenter de faire de la GFP un rapporteur efficace (Heim, R; Cubitt, AB; Tsien, 1995). Nous pouvons notamment citer le mutant GFPmut3¹⁸ qui a été optimisé en 1996 par Cormack & al. sur *E. coli*. Ce mutant de la protéine GFP montre un repliement de la protéine plus efficace et un changement dans sa longueur d'onde d'absorption (entre 480 et 501 nm). Ces mutations mènent à une expression de la fluorescence jusqu'à 100 fois plus intense par rapport à la GFPwt. (Cormack et al., 1996) De plus, en conditions de croissance la GFPwt n'est détectable qu'une ou deux heures après son induction alors que dans les mêmes conditions la protéine mutée GFPmut3 est détectable dans les 7-8 minutes après son induction (Mio R. et al., 2016).

Lors de l'utilisation d'une protéine fluorescente comme indicateur de la transcription d'un gène comme cela va être le cas dans ce projet, les caractéristiques dynamiques des protéines doivent être prises en compte lors de l'analyse des résultats. En effet, certaines de ces dynamiques pourraient impacter sensiblement l'interprétation des résultats. Tout d'abord, un délai entre la synthèse de la protéine et l'expression de la fluorescence peut exister. Ce délai correspond au temps de maturation des protéines qui, une fois synthétisées doivent passer par différents stades avant d'exprimer leur fluorescence (Mio R. et al., 2016). Le temps de maturation de la protéine fluorescente utilisée doit être mis en parallèle avec le temps de vie de la protéine d'intérêt pour que la fluorescence exprime au mieux la production de la protéine.

Comme brièvement énoncé plus haut, la GFP peut être utilisée comme un rapporteur qui va donner des informations quant à l'expression d'un gène d'intérêt et donc permettre de suivre la production d'une protéine ou d'un polypeptide. Par exemple, cet outil a notamment déjà été utilisé pour des investigations sur l'écologie microbienne dans les boues activées (Eberl et al., 2006), lors de l'étude de l'implantation d'une symbiose entre *Rhizobium* et sa plante hôte (Gage, Bobo, & Long, 1996), ou encore pour étudier l'expression de certains gènes lors d'une interaction plante-bactérie (Egener, Hurek, & Reinhold-Hurek, 1998).

¹⁸ Green Fluorescent Protein mut3

3. Objectifs et stratégies du projet

Ce travail sur l'interaction entre *Bacillus velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. au sein de biofilms synthétiques et *in planta* s'articule autour de deux grands axes.

Le premier axe de cette étude vise à étudier l'écologie de *B. velezensis* GA1 en vue d'optimiser ses capacités de biocontrôle. En effet, cette souche est capable de produire des composés bioactifs et représente donc un haut potentiel pour la recherche agronomique d'alternatives aux produits phytosanitaires. De plus, la découverte de l'amylocyclicine produite par *B. velezensis* ouvre la perspective de l'utilisation de cette dernière en qualité d'agent de protection des plantes. Cependant, la régulation et les conditions de production de ce composé sont actuellement inconnues. Le premier objectif de ce travail consiste donc à étudier et évaluer le profil de production de l'amylocyclicine par *B.velezensis* GA1 dans des conditions proches de la niche écologique.

Le second axe de cette recherche portera sur l'interaction entre les bactéries *Pseudomonas* sp. CMR12A et *B. velezensis* GA1 et plus précisément sur l'effet de cette interaction sur le profil de production de l'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1. En effet, lors de l'inoculation sur le sol d'une souche de biocontrôle, les interactions avec les bactéries indigènes à la niche écologique peuvent avoir des effets préjudiciables sur l'efficacité de l'agent inoculé. C'est pourquoi, il est intéressant de connaître la réponse physiologique de *B. velezensis* GA1 lors de son interaction avec *Pseudomonas* sp., une autre bactérie PGPR. Le second objectif de ce travail consiste donc à évaluer l'impact de l'interaction entre *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la production d'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1 et ce, dans des conditions proches de leur niche écologique. Dans ce contexte, différents mutants des souches seront utilisés pour évaluer l'impact de différents métabolites secondaires dans l'interaction.

Deux stratégies ont été mises en œuvre pour atteindre les objectifs.

La première stratégie utilisée vise à évaluer la production d'amylocyclicine de la population de *B. velezensis* de façon exhaustive en combinant l'utilisation de la cytométrie en flux et d'un système rapporteur basé sur la protéine GFPmut3. L'amylocyclicine étant difficilement détectable et sa détection par HPLC¹⁹ n'ayant été réalisée que dans une publication, l'utilisation d'un tel système de détection est nécessaire. De plus, il consiste également en une solution

¹⁹ High-performance liquid chromatography

moins onéreuse en comparaison à L'HPLC. Une fusion transcriptionnelle entre la GFPmut3 et le promoteur (*acnB*) codant pour la production de la bactériocine a été construite au préalable de cette étude et constitue un système rapporteur de l'activité transcriptionnelle des gènes codant pour la synthèse de l'amylocyclicine. La fluorescence émise par les cellules est évaluée par cytométrie en flux, qui est une méthode d'analyse au niveau « single cell », ce qui permettra de caractériser à un niveau unicellulaire les populations complexes étudiées dans ce projet.

La deuxième stratégie consiste en l'utilisation d'un « modèle plante » afin de réaliser une caractérisation de la production d'amylocyclicine dans des conditions proches de celles de la rhizosphère. L'utilisation d'un tel modèle se justifie par la complexité de l'écologie bactérienne sur les plantes et dans le sol. Le modèle plante correspond à des plantules de tomates cultivées en boîte de pétri. Avant d'étudier la croissance et les interactions de *B. velezensis in planta*, des étapes intermédiaires en milieux liquide et solide seront réalisées et permettront d'évaluer l'écologie de *B. velezensis* GA1 en conditions simplifiées.

4. Matériel et méthode

4.1 Souches, milieux et conditions de culture

4.1.1 Souches

Les souches bactériennes qui ont été utilisées lors des manipulations en laboratoire sont listées dans le tableau 2.

Tableau 2. Liste des souches utilisées lors des manipulations

Taxon	Souche	Référence
<i>Bacillus</i>		
<i>B. velezensis</i> <i>GA1</i>	$\Delta amyE::cat-pacnB/GFPmut3$ $\Delta srfaA$	MiPI
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Pseudomonas</i> sp. CMR12a	Sauvage $\Delta sess$ $\Delta sess-\Delta orf$ $\Delta sess-\Delta orf-\Delta phz$	(D'aes et al., 2011, 2014; Perneel et al., 2007)

La souche ***B. velezensis* GA1 $\Delta amyE::cat-pacnB/GFPmut3$** est une souche avec délétion du gène amyE remplacé par un système rapporteur (fusion transcriptionnelle pacnB-GFPmut3) de l'expression de l'opéron *acn* codant pour l'amylocycline.

La souche ***B. velezensis* GA1 $\Delta srfaA$** est une souche délétée du gène srfaA. Suppression de la capacité à produire de la surfactine.

La souche ***Pseudomonas* sp CMR12A $\Delta sess$** est une souche dont les gènes permettant la production de la sessiline ont été délétés. Elle sera nommée « sess » dans les résultats.

La souche ***Pseudomonas* sp CMR12A $\Delta sess-\Delta orf$** est une souche dont les gènes permettant la production de la sessiline et de l'orfamide ont été délétés. Elle sera nommée « DM » pour Double Mutant dans les résultats.

La souche ***Pseudomonas* sp CMR12A $\Delta sess-\Delta orf-\Delta phz$** est une souche dont les gènes permettant la production de la sessiline, de l'orfamide et de la phenazine ont été délétés. Elle sera nommée « TM » pour Triple Mutant dans les résultats.

Les quatre souches de *Pseudomonas* sp. CMR12a possèdent le plasmide pME6010-pTac/eforRed TetR qui permet la production constitutive de la protéine fluorescente eforRed de couleur rouge (Données personnelles T. MEYER).

4.1.2 Milieux de culture

Les milieux de culture qui ont été utilisés lors des manipulations en laboratoire sont listées dans le tableau 3.

Tableau 3. Milieux utilisés lors des manipulations

Milieu	Composition pour 1L
LB²⁰ (liq./sol.)	10 g de tryptone, 10 g de NaCl, 5 g d'extrait de levures (+ 15 g d'agar pour LB solide) + 1L H ₂ O
RE²¹ 1/2 (liq.)	Solution A (250ml) : glucose 2 g/L, fructose 3.4 g/L, maltose 0.4 g/L, ribose 0.6 g/L, citrate 4 g/L, oxalate 4 g/L, succinate 3 g/L, malate 1 g/L, fumarate 1 g/L, casamino acids 1 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g/L. Solution B (250ml) : KH ₃ PO ₄ 0,685g/L, Mops 21g/L, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, extrait de levures 1 g/L, Fe ₂ (SO ₄) ₃ 1.2 mg/L, MnSO ₄ 0.4 mg/L, CuSO ₄ 1.6 mg/L, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 4 mg/L. H₂O (500ml)
RE^{1/4} (sol.)	Solution A (125ml) + Solution B (125ml)+ H₂O (750ml) (voir RE 1/2)
Hoagland (sol.)	1 ml de NH ₄ H ₂ PO ₄ (1 M), 6 ml de KNO ₃ (1 M), 4 ml de Ca(NO ₃) ₂ (1 M), 2 ml de MgSO ₄ (1 M), 1 ml de H ₃ BO ₃ (2.86 mg/l), 1 ml de MnCl ₂ ·4H ₂ O (1.81 mg/l), 1 ml de ZnSO ₄ ·7H ₂ O (0.22 mg/l), 1 ml de CuSO ₄ ·5H ₂ O (0.08 mg/l), 1 ml de H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O (0.02 mg/l) et 1 ml de FeSO ₄ ·7H ₂ O (24.9 mg/l), 22 g d'agar
PBS²²	8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1.44g de Na ₂ HPO ₄ , 0.24g de KH ₂ P04
Eau peptonée	10g de Peptone, 5g de NaCl

4.1.3 Conditions de culture

Les souches qui ont été utilisées durant les expérimentations ont été conservées à -80 sous forme de « seeds ». Une réactivation a été réalisée préalablement à chaque expérimentation. Les microorganismes qui ont été réactivés ont ensuite été cultivés en milieu LB (Tableau 3) à 30°C sous une agitation de 160 rpm²³. Cette étape correspond à l'étape de pré-culture. A la fin de la pré-culture, la densité optique (DO²⁴) de cette dernière a été calculée grâce à un spectrophotomètre (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) à 600 nm. La DO a été ajustée avant l'inoculation des milieux de culture.

Trois types de cultures ont été réalisées lors des expérimentations en laboratoire. Soit la culture liquide, la culture sur milieu solide et la culture *in planta*.

²⁰ Lysogeny broth medium

²¹ Root exudate medium

²² phosphate buffered saline

²³ Rotation par minute

²⁴ Densité optique

Les pré-cultures précédant les cultures en fiole ont été de 18 heures. Les cultures en fiole ont été réalisées à 30° C sous une agitation de 160 rpm avec du milieu liquide RE^{1/2} (Tableau 3). La souche de *B. velezensis* GA1 $\Delta amyE::cat-pacnB/GFPmut3$ a été utilisée dans cette culture.

Les cultures sur milieu solide ont été réalisées en boîte de pétri avec du milieu solide RE^{1/4} (Tableau 3) et la température d'incubation était de 30°C. La souche de *B. velezensis* GA1 $\Delta amyE::cat-pacnB/GFPmut3$ et les quatre souches de *Pseudomonas* sp. CMR12a ont été utilisées. Les souches ont été inoculées sur le milieu par goutte de 1 μ l à DO 0,5. Le temps de culture était de 42 heures.

Les cultures *in planta* ont été réalisées sur des plantules de tomates qui ont été disposées sur du milieu solide Hoagland (Tableau 3) dans des boîtes de pétri carrées (Annexe 1). Les deux souches de *B. velezensis* GA1 et les quatre souches de *Pseudomonas* sp. CMR12a ont été utilisées. Les souches ont été inoculées sur les plantules par goutte de 2 μ l à DO 0,2. Les plantules inoculées ont été cultivées 72 heures sous lampes.

4.2 Expérimentations

4.2.1 Suivis de la fluorescence de *B. velezensis* GA1 en fiole

La culture en fiole a été réalisée pendant 48 heures. Cette culture a été réalisée en triplicat. Un prélèvement de 1ml a été réalisé toutes les 12 heures pour l'analyse de la fluorescence par cytométrie en flux (section 4.3)

4.2.2 Suivi de la croissance de *B. velezensis* GA1 en fiole avec ou sans surnageant

La culture en fiole a été réalisée pendant 8 heures. Cette culture a été réalisée en triplicat. Deux modalités ont été réalisées et correspondent à l'ajout ou non de 1% surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a dans la culture.

Un prélèvement de 1 ml a été réalisé chaque heure pour analyser la DO de la culture au spectrophotomètre. Ce prélèvement a également servi à la réalisation de l'analyse par cytométrie en flux (section 4.3) de la fluorescence de la population. Un deuxième prélèvement de maximum 1 ml à DO de 1 a été réalisé. Il a été centrifugé pendant deux minutes à 10000 pm.

Le surnageant a été retiré et le culot a été placé à -80° pour être analysé en RT-qPCR²⁵ (section 4.5).

4.2.3 Mise en interactions sur milieu solide de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. CMR12a

Une pré-culture de 18h heures a été réalisée pour *B. velezensis* GA1 et une pré-culture de 6 heures a été réalisée pour *Pseudomonas* sp. CMR12a . La pré-culture a été centrifugée à 4000 rpm et le culot cellulaire a été lavé dans de l'eau peptonée (Tableau 3). Cette étape a été réalisée deux fois. La densité optique de la solution cellulaire après lavage a été ajustée à 0,5.

La culture de *B. velezensis* GA1 sur milieu solide sans interaction a été réalisée sur une boîte de pétri ronde remplie avec du milieu RE^{1/4} solide. La souche a été inoculée comme présenté dans la Figure 9.

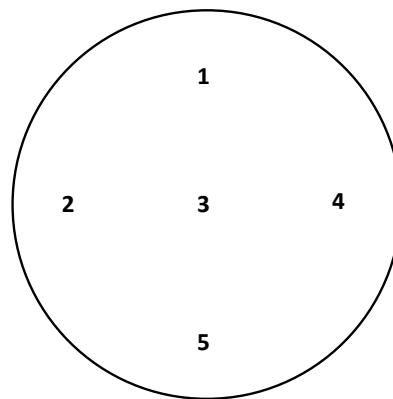


Figure 9. Schéma d'inoculation d'une boîte de pétri dans le cas de l'inoculation de *B. velezensis* GA1 seul sur milieu solide.

En ce qui concerne les tests d'interactions, deux types de timing ont été réalisés quant à l'inoculation de *Pseudomonas* sp. Dans le premier cas les inoculations de *Pseudomonas* sp. CMR12a ont été réalisées 18 heures avant les inoculations de *B. velezensis* GA1. Dans le deuxième cas, les deux souches microbiennes ont été inoculées sur la boîte au même moment. Les souches de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. ont été inoculées comme présenté dans la figure 10.

²⁵ Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

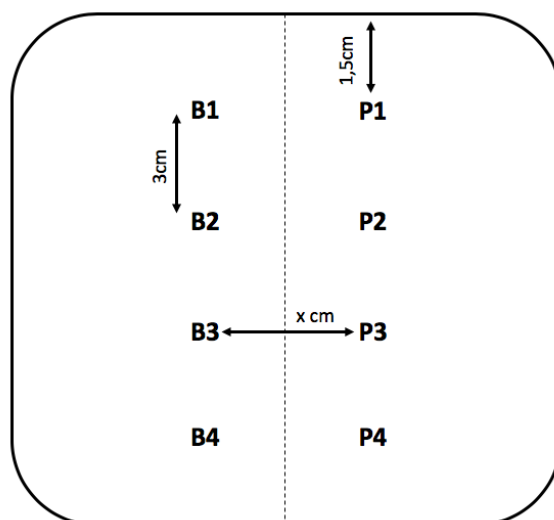


Figure 10. **Schéma d'inoculation d'une boîte de pétri pour les test d'interactions.** Les lettres **B** correspondent aux colonies de *B.velezensis*. Les lettres **P** correspondent aux colonies de *Pseudomonas* sp. Les colonies sont espacées de 1,5 cm avec les bords inférieures et supérieures. Les colonies des mêmes souches sont espacées de 3 cm entre elles. La distance X correspond au différentes distances d'interactions testées.

Les distances testées sont 0,5 cm, 1 cm, 1.5 cm, 2 cm et 3 cm.

Après incubation, les colonies de *B. velezensis* GAI ont été extraites du milieu solide à l'aide d'un scalpel stérile. L'agar a été découpé autour de la colonie, et la colonie d'intérêt a été extraite. La colonie a été placée dans un Falcon de 15 ml rempli avec 6 ml de PBS (Tableau 3). Le Falcon contient également des billes de verre (5-6). Le mélange a ensuite été vortexé pendant 1 minute à vitesse maximale. La solution microbienne qui en résulte a été prélevée à l'aide d'une seringue stérile de 5 ml, filtrée avec un filtre de 5 µm, et recueillie dans un Eppendorf de 1,5 ml. La solution est alors prête pour être analysée au cytomètre en flux (voir section 4.3).

4.2.4 Culture et mise en interactions *in planta*

4.2.4.1 Préparation des graines de tomates

Les graines de tomates ont été stockées au frigo à 4°C. Avant de placer les graines sur les boîtes de pétri, ces dernières ont été stérilisées. Les graines ont été placées dans un Eppendorf de 2 ml avec 1 ml d'éthanol 75% et ont été agitées durant 2 minutes. L'éthanol a été enlevé et 1 ml d'eau de javel a été ajouté dans l'Eppendorf. Les graines ont été agitées pendant 10 minutes avec l'eau de javel. Ensuite les graines ont été rincées 3x avec de l'eau stérile. Les graines stériles ont été déposées dans une boîte de pétri carrée avec du milieu Hoagland (section 4.1.2). Cinq graines ont été déposées dans chaque boîte. Les graines ont été stockées deux jours à l'abri de la lumière avant d'être inoculées.

4.2.4.2 Préparation des cultures sur les plants de tomates

Une pré-culture de 48 heures a été réalisée pour *B. velezensis* GA1 et une pré-culture de 6 heures a été réalisée pour *Pseudomonas* sp. CMR12a. La pré-culture a été centrifugée à 4000 rpm et le culot cellulaire a été lavé dans de l'eau peptonée (Tableau 3). Cette étape est réalisée deux fois. La densité optique de la solution cellulaire après lavage est ajustée à 0,2.

Deux types d'inoculation sont réalisés. Tout d'abord des inoculations simples où une seule souche est inoculée sur la graine. Deuxièmement, des mélanges (compétitions) de deux types de souches sont préparés puis inoculés sur la graine. Lors de cette expérimentation, les deux souches de *B. velezensis* GA1 sont étudiées ainsi que les quatre souches de *Pseudomonas* sp. Huit types de mélanges sont donc réalisés avec 95% de *B. velezensis* GA1 et 5% de *Pseudomonas* sp. CMR12a.

4.2.4.3 Préparation des racines pour l'analyse

Après 72 heures de culture, les plantes sont retirées doucement de l'agar à l'aide d'une pince stérile et les racines sont placées dans un Falcon de 15 ml contenant 5 ml d'eau peptonée (Tableau 3) et 5-6 billes de verre. La solution de bactéries rhizosphériques est ensuite vortexée pendant 1 minute à vitesse maximale. Et le poids des racines a été mesuré. Cette solution bactérienne est utilisée pour le comptage sur boîte ainsi que pour les analyses de cytométrie.

4.2.4.4 Étalement des suspensions cellulaires et comptage

Les inoculum simples et de compétitions sont dilués à 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} . La suspension cellulaire rhizosphérique préparée au point c de cette section est diluée à 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} .

Ensuite, 100 μ L de chaque dilution est étalé à l'aide de billes de verre sur une boîte de pétri avec du milieu LB (Tableau 3). Les boîtes de comptage sont mises à l'incubateur à 30°C pendant 24 heures.

Pour les inoculations simples, le nombre de colonies est simplement compté. Pour les mélanges bactériens, l'étalement des suspensions permet de connaître le pourcentage de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. CMR12a présent sur la racine et dans le mélange de départ. Les deux types de colonie sont différenciés par leur couleur grâce à l'ajout d'un plasmide dans les souches de *Pseudomonas* sp. CMR12a (section 4.1.1). De plus les colonies de *B. velezensis*

GA1 sont plus grosses que les colonies de *Pseudomonas* sp. CMR12a (Figure 11). Le résultat des comptages microbiens seront rapportés au poids des racines.

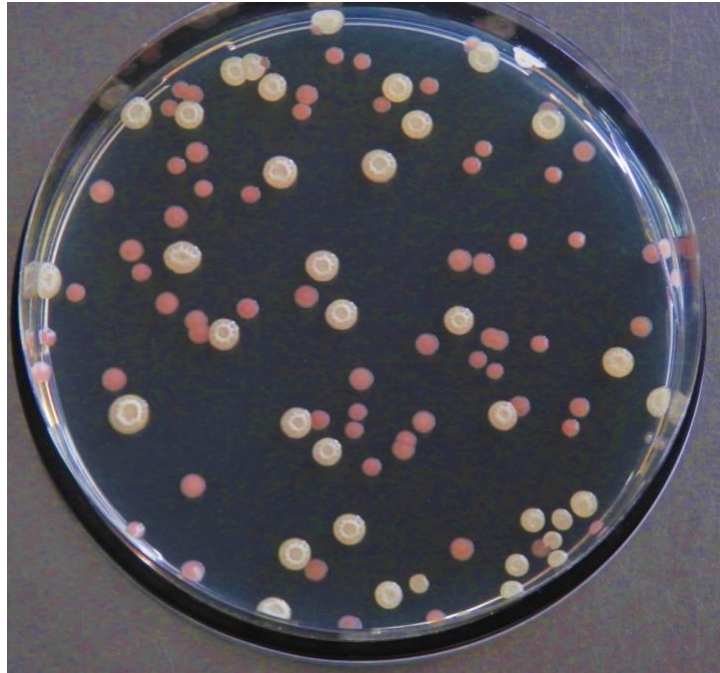


Figure 11. Plaque de résultats de comptage des populations de *B. velezenis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a (en rouge) sur boîte de pétri.

4.2.4.5 Quantification de la sporulation

Pour les inoculations simples, les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} sont utilisées pour quantifier la sporulation. Pour les compétitions se sont les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} qui sont utilisées.

Les Eppendorfs contenant les suspensions microbiennes diluées sont placés dans un bain-marie à 80°C pendant 10 minutes afin d'éliminer les bactéries non sporulantes (Molina-Santiago et al., 2019). Par la suite, $100\mu\text{l}$ des solutions ne contenant plus que des spores sont étalés à l'aide de billes de verre sur des boîtes de pétri avec du milieu LB. Les boîtes de comptage de spores sont placées dans un incubateur à 30°C pendant 24 heures. Les colonies qui apparaissent sur les boîtes sont comptées.

4.3 Cytométrie en flux

4.3.1.1 Analyse des solutions microbiennes

Les suspensions cellulaires résultant des cultures en milieu solide et in planta sont vortexées et filtrées avec des filtres de 5 µm (VWR, Leuven, Belgique).

La concentration de la suspension cellulaire à analyser est auparavant ajustée avec du PBS (Tableau 3) afin d'atteindre une concentration finale approximative de 10^3 par µL (ou diluées en 500 cellules par µL si nécessaire).

Les différents paramètres évalués grâce au cytomètre en flux Accuri C6 (Biosciences, San Jose, USA) sont analysés pour 20 000 événements avec un débit de $35 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ (vitesse moyenne) et un seuil de FSC de 20 000. La fluorescence de l'échantillon est évaluée avec le canal FL1²⁶ et la taille des cellules qui est évaluée avec le canal FSC. Ces données sont enregistrées au format .fcs et seront lues et traitées grâce au logiciel Matlab.

4.3.2 Traitement des données

Les jeux de données obtenus au format .fcs doivent tout d'abord être lus dans le logiciel Matlab à l'aide d'une fonction « fca_readfcs ». Ensuite, différentes informations peuvent être extraites des données brutes de FSC et de FL1. Tout d'abord, les données de FL1 peuvent être converties en données de GFP produites par cellule grâce à la formule ci-dessous.

$$Q_{GFP} = (1,16 * Green Channel) + 2,5 \quad (\text{Fragoso-Jiménez et al., 2019})$$

A partir de ces données, la quantité moyenne de GFP produite par cellule ainsi que la quantité totale de GFP produite par la population ont été calculées. Des données par sous-populations peuvent également être extraites comme la quantité de cellules dans une sous-population, la taille moyenne des cellules de la sous-population ou encore la quantité de GFP moyenne produite par les cellules d'une sous population.

²⁶ Canal de fluorescence N°1

4.3.2.1 Système de comparaison des empreintes

A partir des données brutes de de FL1 et FSC, des cytogrammes de densité ont été réalisés avec le logiciel Python pour chaque population analysée au cytomètre en flux.

Les résultats qui ont été obtenus lors de l'analyse au cytomètre en flux d'une population correspondent à l'empreinte en un temps donné de la population de *B. velezensis* GA1 selon la taille et la production de fluorescence des cellules. Les valeurs de FL1 et de FSC sont des unités d'émission et de dispersion évaluées par la machine.

Un système de comparaison des empreintes a été mis en place sur base des résultats obtenus lors de l'analyse des cytogrammes des trois types de culture qui ont été réalisés avec la souche *B.velezensis* GA1 $\Delta amyE::cat-pacnB/GFPmut3$. Sur base de ces résultats, les représentations graphiques ont été scindées en 6 parties selon deux seuils de FL1 et un seuil de FSC. Le but est d'isoler dans différentes zones les sous-populations qui apparaissent pour pouvoir les analyser en tant que variables à part entière.

La figure 12 donne un exemple des délimitations mises en place sur une empreinte tandis que le tableau 4 présente les valeurs de FSC et FL1 utilisées pour les seuils.

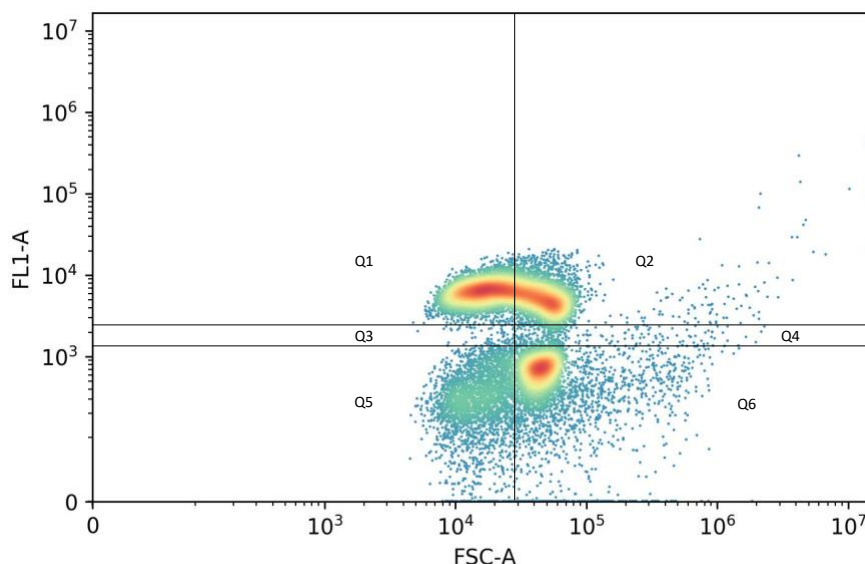


Figure 12. Exemple de découpage d'une empreinte en 6 zones.

Tableau 4. Valeurs utilisées pour la limitation des zones

Zones	Valeurs de FSC	Valeurs de FL1
Q1	< 30.000	≥ 2500
Q2	≥ 30.000	≥ 2500
Q3	< 30.000	< 2500 & ≥ 1500
Q4	≥ 30.000	< 2500 & ≥ 1500
Q5	< 30.000	<1500
Q6	≥ 30.000	<1500

La séparation en 6 zones des empreintes à analyser donne lieu à l'évaluation de 8 variables explicatives de la différence entre ces empreintes. En premier lieu, le pourcentage de cellules dans chaque zone a été calculé (section 4.3), ce qui donnera lieu à 6 variables de quantité de cellules (C1,C2,C3,C4,C5 et C6). Dans un deuxième temps, la quantité de GFP totale produite dans les deux zones à fluorescence positive (Q1 et Q2) a été calculée et correspond à deux nouvelles variables (GFP1 et GFP2). Ces 8 variables sont potentiellement explicatives des différences existant entre les types de culture. La comparaison des empreintes a été réalisée par analyse en composantes principales (ACP²⁷).

4.4 Analyse de la transcription du gene *acnA* par RT-qPCR

Les culots à analyser sont conservés à -80 °C, les culots de trois prélèvements vont être analysés soit les culots après 3 heures, 5 heures et 7 heures de culture.

La RT-qPCR va permettre d'évaluer de façon relative le niveau d'expression des gènes *acnA* et *gfpmut3* grâce à l'utilisation du composé fluorescent (SYBR green) qui fluoresce lorsqu'il se lie un a un ADNc²⁸ double brin. La quantité de double chaîne synthétisée est estimée par la quantité de fluorescence émise. L'évolution de la fluorescence va dépendre du nombre de séquences initiales de l'ARN d'intérêt. La quantité d'ARN²⁹ codant pour les gènes d'intérêt présente dans l'échantillon est estimée en quantité relative par rapport à l'expression de la *gyrase*. La *gyrase* est utilisée comme gène de référence car son expression est considérée comme étant constante au cours du temps et indépendante des paramètres expérimentaux.

²⁷ Analyse en composantes principales

²⁸ Acide désoxyribonucléique complémentaire

²⁹ acide ribonucléique

La technique RT-qPCR comporte trois grandes étapes :

- 1) L'extraction de l'ARN des culots
- 2) La rétrotranscription pour transformer l'ARN extrait en ADN complémentaire (DNAc)
- 3) La qPCR proprement dite pour amplifier la séquence ADN

La première étape est réalisée grâce à un kit commercial NucleoSpin RNA (Machery Nagel) dans lequel un traitement DNase est inclus. Le mode opératoire est fourni avec le kit.

Les étapes de rétrotranscription et de polymérisation en chaîne (PCR) sont réalisées simultanément grâce au kit Luna[®] (New England BioLabs^{® inc}). Les différents réactifs sont ajoutés à la solution d'ARN extrait. Ces réactifs correspondent à un mix fourni par le kit, des enzymes, les amorces sélectionnées et de l'eau. Ensuite, la RT-qPCR est réalisée dans le Thermocycler StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Les séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR sont reprises ci-dessous :

gyrase

Fw → GAGACGCACTGAAATCGTGA
Rv → GCCGGGAGACGTTTAACATA

acnA

Fw → CCAAGCAGCTGCGTATTTTT
Rv → CTTCGACTCTGGGCATCTCT

gfpmut3

Fw → ACGTAAACGGCCACAAGTTC
Rv → AAGTCGTGCTGCTTCATGTG

4.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec les logiciels Prism et R.

5. Résultats

5.1 Validation du système rapporteur GFP comme outil d'investigation de la production d'amylocycline

Le gène *acnA* fait partie de l'opéron *acn* codant pour la production d'amylocycline. Le système rapporteur du gène *gfpmut3* est basé sur le promoteur *acnB*. Les gènes *acnA* et *acnB* font parties du même opéron (Figure 5) codant pour transcription d'un seul ARNm. L'analyse de la transcription de ces deux gènes donne donc la même information.

Un suivi de 8 heures a été réalisé sur la culture de *B. velezensis* GA1 en milieu RE^{1/2} (section 4.2.2). Lors de cette expérience, la densité optique et la fluorescence ont été analysées chaque heure. En parallèle, des analyses en RT-qPCR sur la transcription du gène *acnA* et du gène *gfpmut3* ont été réalisées (section 4.4). Les résultats des analyses en RT-qPCR permettent d'évaluer la transcription du gène *acnA*. La transcription du gène *gfpmut3* est comparée avec ces résultats pour valider son efficacité en tant que système rapporteur de la production d'amylocycline. L'évaluation de la transcription est également comparée aux données de traduction de la protéine GFP (Figure 12).

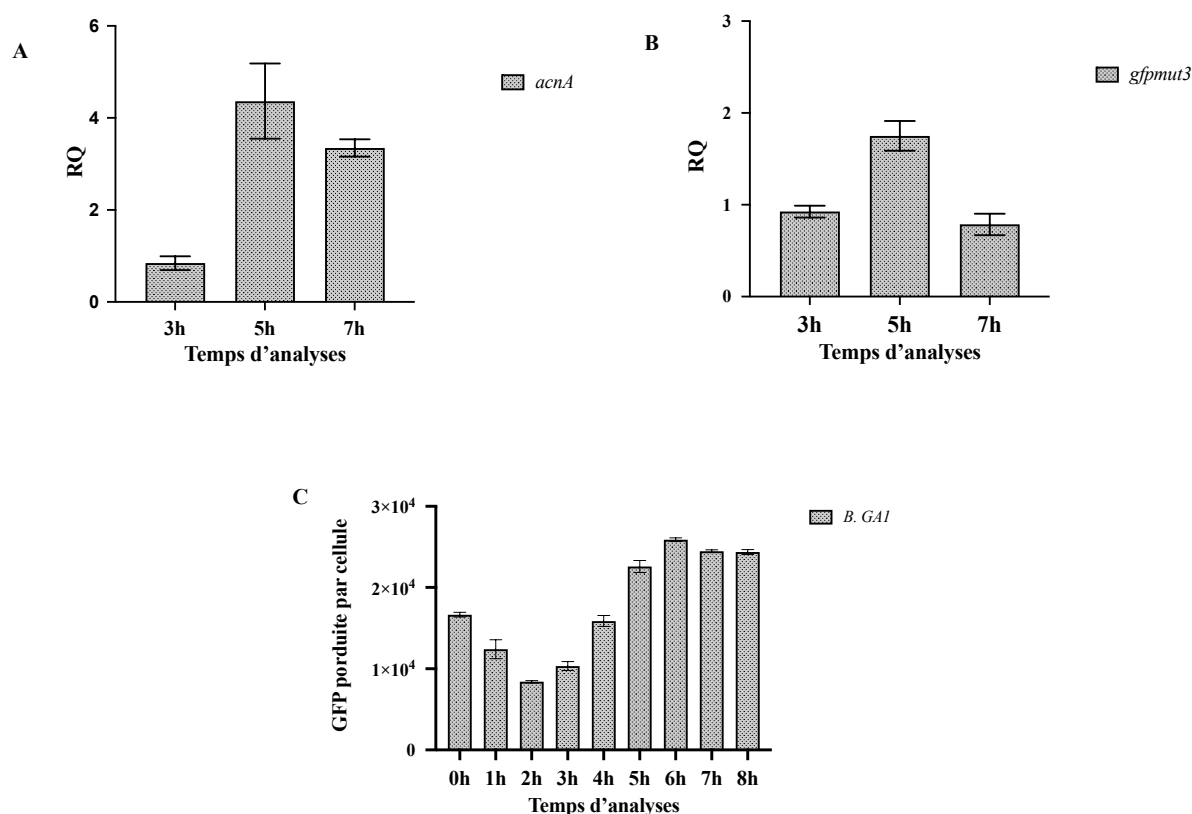


Figure 13. Validation du système rapporteur GFP par comparaison de la quantification de la transcription du gène *acnA* obtenue par RT-qPCR et par fusion transcriptionnelle. **A** : Quantification relative du gène *acnA* par RT-QPCR après 3 heures, 5 heures et 7 heures de culture. **B** : Quantification relative du gène *gfpmut3*

par RT-qPCR après 3 heures, 5 heures et 7 heures de culture. L'expression des gènes d'intérêt est réalisée par rapport à l'expression de la *gyrase* (gène de référence). RQ signifie « relative quantification » et représente l'expression relative de gènes par rapport à la *gyrase* et par rapport à l'expression de premier échantillon. **C** : Quantité moyenne de protéine GFP fonctionnelle traduite dans une cellule en fonction du temps.

Un pic d'expression du gène *acnA* est observé après 5 heures de culture à la figure 12.A. Une augmentation est également observée pour l'expression du gène *gfpmut3* au même moment (Figure 12.B). Après 7 heures de culture, l'expression relative des deux gènes décroît.

L'expression relative du gène *acnA* par rapport à la *gyrase* est plus importante que l'expression relative de la *gfpmut3* par rapport à la *gyrase*. Néanmoins, les changements d'expressions entre les deux gènes semblent être corrélés. Un test de corrélation de Pearson est réalisée (Annexe 2) et montre l'existence d'une corrélation modérée positive de 0,624 entre la transcription des deux gènes. La p-valeur de ce test étant de 0,57 aucune conclusion définitive ne peut être déduite quant à la corrélation de l'expression relative des gènes *acnA* et *gfpmut3*.

Les données de sortie de cytométrie en flux converties permettent d'obtenir une production moyenne en GFP par cellule. La figure 12.C représente l'évolution au cours du temps de cette quantité moyenne.

Durant les deux premières heures, la quantité de protéines fluorescentes vertes (GFP) produite par cellule baisse par rapport au niveau initial. La quantité de GFP produite remonte à partir de trois heures de culture et semble atteindre un pic à 6 heures de culture pour redescendre à un seuil pour les deux dernières heures. La fluorescence étant liée à la protéine fluorescente verte elle peut donc être comparée avec l'expression du gène *gfpmut3* que l'on retrouve à la figure 12B. La production de GFP par les cellules la plus importante arrive après 6 heures de culture, alors que le pic d'expression du gène *gfpmut3* est réalisé après 5 heures de culture. Ces résultats tendent à montrer l'existence d'un décalage temporel entre la transcription du gène *gfpmut3* et la traduction et la maturation d'une protéine fluorescente fonctionnelle.

Malgré les décalages temporels et d'intensité observés entre la transcription du gène *acnA* et l'expression de la GFP, le système mis en place permet de rendre compte de changements dans la production de la bactériocine. Cet outil sera donc utilisé pour caractériser les populations de *B. velezensis* GA1 en fonction de la production de l'amylocycline. Les populations vont être analysées par cytométrie en flux comme énoncé à la section 4.3.

Pour la validation de l'utilisation et la visualisation de la fluorescence au cytomètre en flux, la population *B. velezensis* GA1 $\Delta amyE::cat-pacnB/GFPmut3$ est comparée avec la souche *B. velezensis* GA1 sauvage (Figure 13).

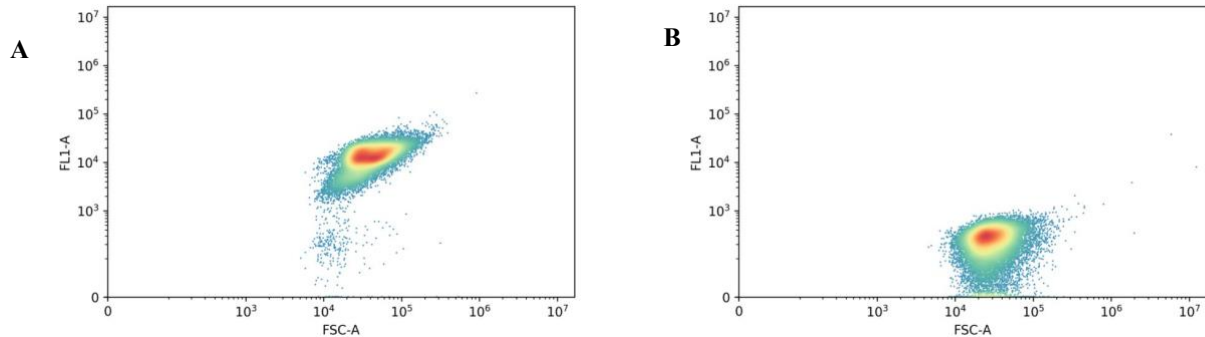


Figure 14. **Comparaison des cytogrammes des souches de *B. velezensis* GA1 $\Delta amyE::cat-pacnB/GFPmut3$ et sauvage.** Cytogrammes de densité de la population de *B.velezensis* GA1 en fonction de la taille des cellules (FSC) et de la fluorescence (FL1). Le cytogramme **A** représente l’empreinte de la population de *B. velezensis* GA1 avec rapporteur GFP obtenue par analyse en cytométrie en flux. Le cytogramme **B** montre l’empreinte de la population de *B. velezensis* GA1 sans système rapporteur GFP. Les cultures sont réalisées en milieu liquide RE ½ pendant 18h.

Les valeurs de FL1 présentées dans la population planctonique sans rapporteur (figure 13.B) sont de maximum 700 ce qui correspond à l’autofluorescence des cellules. Dans le cas de la population avec système rapporteur GFP, les valeurs de FL1 correspondent à la fluorescence due à la production de GFP. La seule différence entre les deux souches est la présence du système rapporteur GFP. La fluorescence de l’outil est bien perceptible au cytomètre en flux et la différence avec les cellules non fluorescentes aisément identifiable.

5.2 Le type de culture influence la structure et la différenciation de la population de *Bacillus velezensis* GA1

Avant d’étudier l’impact de l’interaction entre *Pseudomonas* sp. CMR12a et *B. velezensis* GA1 sur la structure de la population de *B. velezensis* GA1, il est essentiel de caractériser la structure de la population lorsque *B. velezensis* GA1 est cultivé seul.

La souche de *B. velezensis* GA1 est cultivée dans trois milieux différents puis analysée par cytométrie en flux. Le résultat est présenté à la figure 15.

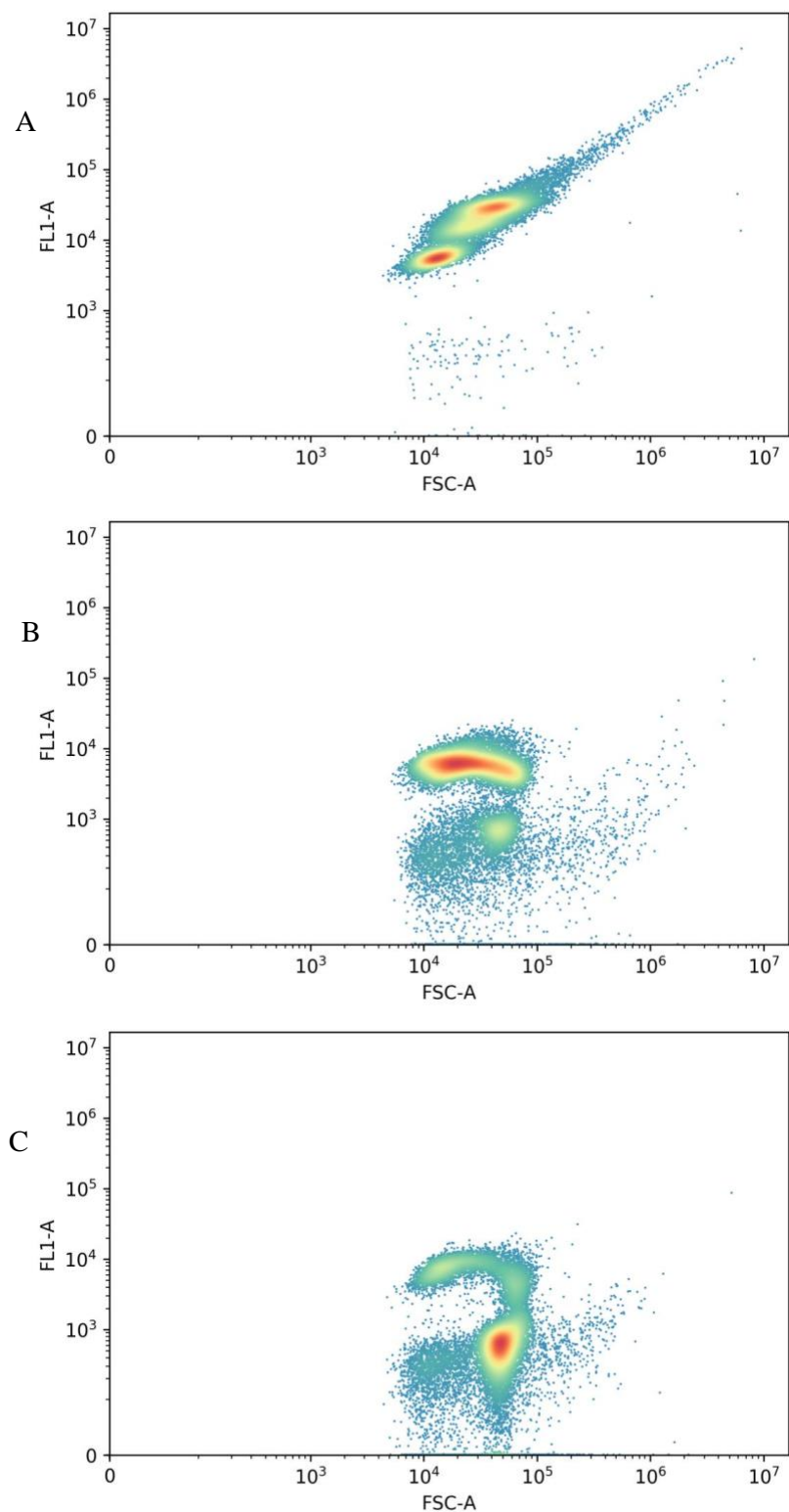


Figure 15. **Identification de l'impact du type de culture sur l'empreinte de la population de *B. velezensis* GA1.** Cytogrammes de la densité de la population de *B. velezensis* GA1 en fonction du type de culture. L'empreinte de la population est analysée en fonction de la taille des cellules (FSC) et de l'expression de leur fluorescence (FL1) liée à la production d'amylocyclicine. L'empreinte **A** est celle de la culture de *B. velezensis* GA1 en milieu liquide RE ½ pendant 42 heures. Cette structure correspond à une culture en fiole agitée et a été réalisée en triplicat. L'empreinte **B** est celle d'une culture de *B.velezensis* GA1 sur milieu solide RE ¼ pendant 42 heures. Cette structure correspond à une colonie sur boîte de pétri. La culture a été réalisée en triplicat. L'empreinte **C** est celle de la population de *B.velezensis* GA1 cultivée *in planta* pendant 72 heures. Cette structure correspond à un biofilm racinaire. Quatre répétitions ont été réalisées.

5.2.1 Le mode de culture influence l’empreinte de la population de *B. velezensis* GA1

L’observation des cytogrammes des trois populations (culture liquide, colonie sur agar et biofilm racinaire) montre des empreintes très différentes. Dans le but de comparer les trois types de distribution cellulaire, une analyse en composante principale a été réalisée.

Les résultats de l’analyse en composantes principales se présentent en deux graphiques. Le premier graphique (Figure 16.A) permet l’identification des composantes explicatives de la variabilité entre les individus (= type de cultures) à étudier. Le nombre de composantes à retenir correspond au nombre de composantes dont la valeur propre est supérieure à 1. Dans ce cas, deux composantes sont retenues. La mise sous forme de graphique des deux premières composantes explicatives donne une représentation dans un nouveau plan factoriel appelé « premier plan factoriel ». Les composantes explicatives correspondent aux deux dimensions présentées à la figure 16.B.

Le deuxième graphique de résultats est une représentation des variables explicatives et des individus dans le premier plan factoriel (Figure 16B.). Ce graphique combiné est choisi pour l’analyse car il permet une vision globale des résultats de l’ACP. L’interprétation de ce graphique pourra se faire comme suit : un individu se trouvant du même côté qu’une variable, a une valeur élevée pour cette variable; un individu se trouvant sur le côté opposé à une variable aura une faible valeur pour cette variable. De plus, les variables sont corrélées (positivement ou négativement) avec une composante si elles sont proches de cette composante et les variables proches sont corrélées entre elles. Pour finir, les variables qui sont loin de l’origine sont bien représentées par l’ACP.

L’observation de la figure 16.B montre un rassemblement des individus selon le type de culture. Le type de culture a donc bien un impact sur le profil de production de l’amylocyclicine par *B. velezensis* GA1. Les populations planctoniques (Corrélation positivement avec Dim1) présentent un grand nombre de cellules dans les zones supérieures. Cette culture est caractérisée par une importante production d’amylocyclicine. Les populations de biofilm racinaire (corrélation négative avec Dim1) présentent une quantité de cellules importantes dans les zones inférieures (zones 4 et 6). De plus, la production de la bactériocine est faible dans ce type de culture. Enfin, les populations de biofilm synthétique (corrélation positivement avec la dim2)

présentent une quantité importante de cellules dans la zone 3 ce qui est sans doute lié à la forme assez dense de l’empreinte.

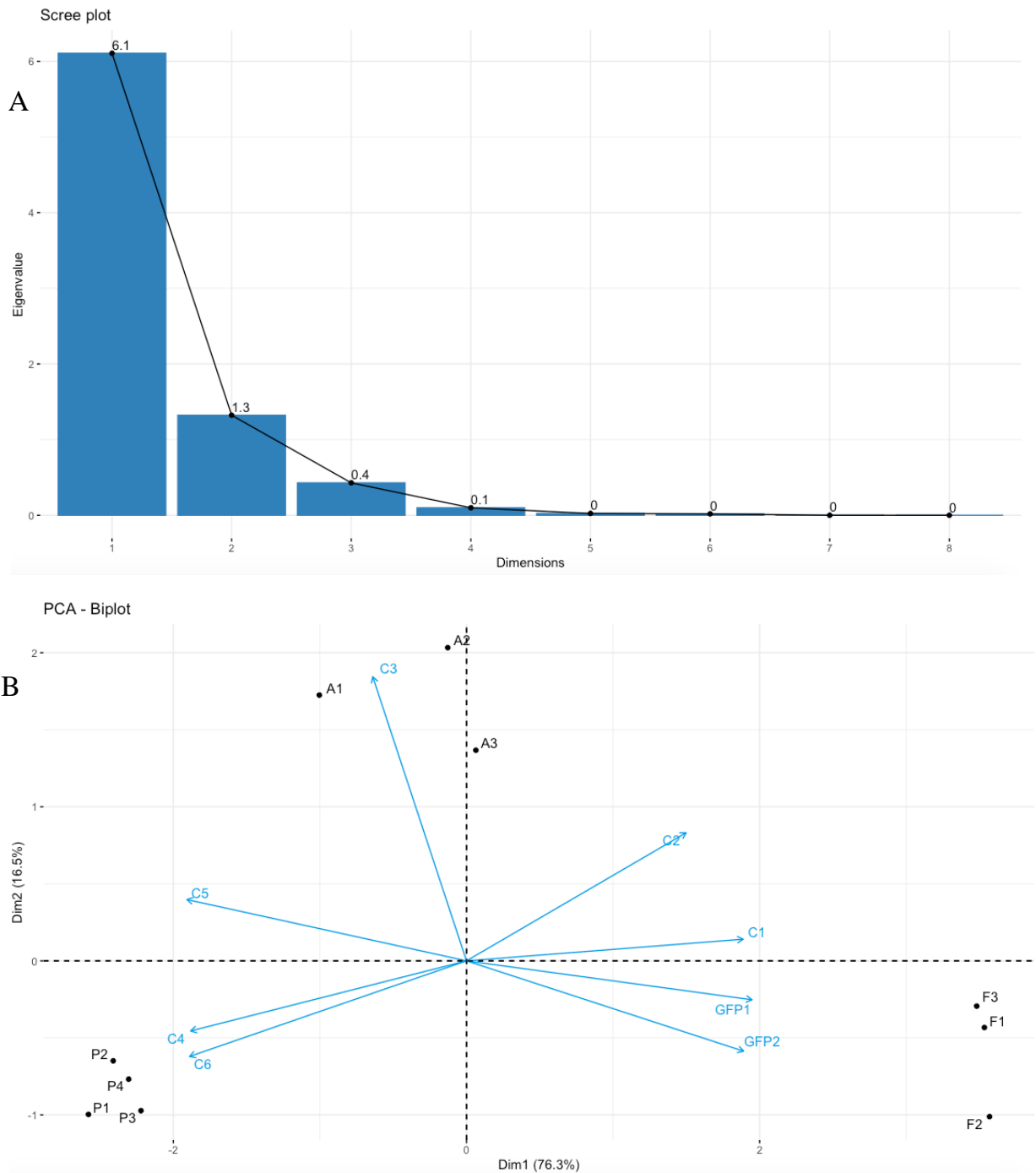


Figure 16. **Les empreintes de *B. velezensis* GA1 se classent en fonction du type de culture.** Les graphiques de résultats de l’analyse en composantes principales sont présentés ici. Dans ce cas l’analyse est réalisée uniquement sur le premier plan factoriel. Graphique de valeurs propres est présenté en **A**. Deux dimension ont une valeur propre supérieure à 1. En **B** un Biplot des variables et des individus dans le premier plan factoriel est présenté. Les individus F1, F2 et F3 correspondent aux répétitions en culture liquide. Les individus A1, A2 et A3 correspondent aux répétitions en culture solide. Les individus P1, P2, P3 et P4 correspondent aux répétitions *in planta*.

En définitive, la comparaison des types de culture en fonction de la production de GFP (lié à la production d'amylocycline) montre que la production de GFP des populations planctoniques est significativement (p -valeur = 0,0001) plus importante que la production de la bactériocine en biofilm (Figure 17).

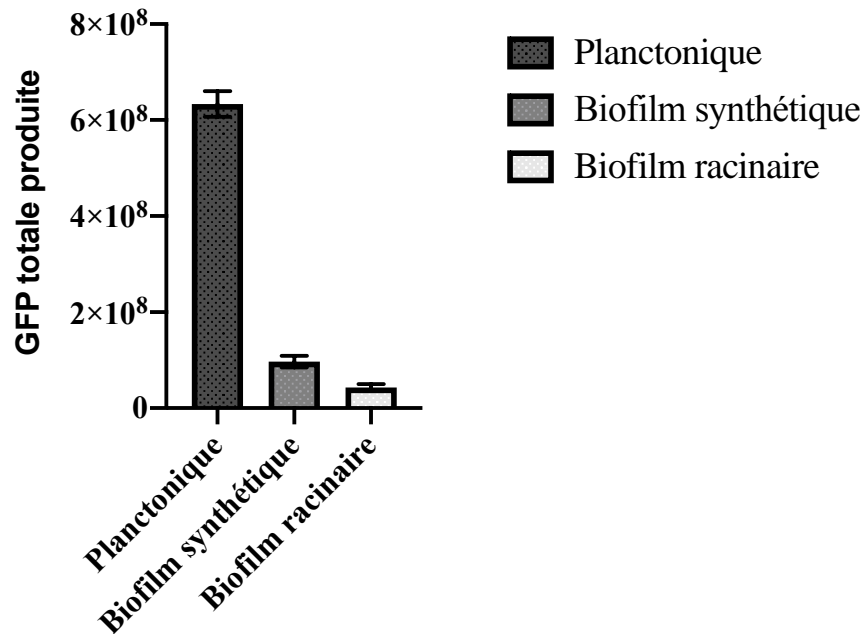


Figure 17. **La production d'amylocycline est significativement plus importante sous forme planctonique.** Le graphique présente une comparaison de la quantité totale de GFP produite en fonction du type de culture. La validation du système rapporteur GFP permet de réaliser les conclusions en fonction de la production d'amylocycline.

La comparaison des trois types de culture montre l'existence d'un impact du type de culture sur la structure de la population de *B. velezensis* GA1 et sur la production d'amylocycline. Les trois populations étudiées ne sont pas homogènes, en effet, la visualisation graphique de la figure 14 permet d'identifier la présence de sous-populations au sein des empreintes analysées. De plus, la représentation de la densité permet d'évaluer la densité cellulaire au sein des sous-populations. L'apparition de telles structures dans les empreintes des populations de *B. velezensis* pourrait impliquer la présence de différents phénotypes au sein des profils de production de l'amylocycline.

5.2.1.1 La population planctonique est composées de deux phénotypes

L’empreinte population planctonique (Figure 15.A) présente un aspect dense à fluorescence élevée. De plus, les cellules sont majoritairement situées dans des FSC élevés. Au sein de la population globale, on voit apparaître deux sous-populations qui se différencient par la taille et la fluorescence des cellules qui la composent. Une différence hautement significative (p-valeur = 0,008) existe entre la taille moyenne des cellules composants les deux populations. De plus, une différence hautement significative (p-valeur = 0,06) existe entre la fluorescence moyenne des cellules. Pour finir les effectifs dans les deux populations sont identiques car aucune différence significative n’apparaît quant à la quantité de cellules présentent dans chaque population (p-valeur = 0,0906). Les résultats des analyses statistiques sont donnés en annexe 3.

Deux sous-populations distinctes et d’effectifs semblables apparaissent lors de la culture en milieu liquide de *B. velezensis* GA1. Les deux populations ont des tailles et des fluorescences différentes. Ce résultat montre la séparation de la population planctonique en deux phénotypes principaux. De grandes cellules très fluorescentes dont la production de GFP est importante composent la première sous-population. De plus petites cellules avec une fluorescence moindre composent la seconde sous-population.

Dans les cas de la population planctonique très peu de cellules ne font pas parties des deux sous-populations. Cependant, deux autres phénotypes apparaissent clairement sur le graphique. Tout d’abord certaines cellules ne présentent pas de fluorescence et apparaissent dans le bas des graphiques avec des valeur de FL1 très faibles. Ces cellules sont minoritaires, de fait, leur pourcentage moyen dans les trois répétitions est de 0,51%. Le deuxième phénotype à apparaître est la présence d’évènements à taille et fluorescence élevés dans le haut du nuage de points. Ces évènements forment une ligne partant de la population globale et allant jusqu’à la partie supérieure droite du graphique. Ces évènements correspondent à des agrégats de plusieurs cellules présentent dans l’échantillon. Les valeurs de FL1 et de FSC sont ainsi surestimées.

5.2.1.2 La structure des colonies sur agar se compose de trois phénotypes

La structure de la colonie de *B. velezensis* GA1 cultivée en milieu solide (Figure 15.B) est différente du cas planctonique. Trois sous-populations apparaissent au sein de l’échantillon global.

Des analyses de la variance à 1 critère de classification (AV1³⁰) sont réalisées pour comparer les sous-populations (Annexe 4). Les AV1 montrent une différence hautement significative entre la taille des cellules des trois populations et une différence très hautement significative pour la comparaison de la fluorescence et du nombre de cellules. Une structuration des moyennes est réalisée.

Au vu des résultats de la structuration des moyennes (Annexe 4), la population supérieure peut être décrite comme ayant une fluorescence moyenne par cellule et un nombre de cellules significativement différent des autres. La plus grande majorité des cellules du biofilm synthétique se situe dans cette population et sont des cellules de taille normale productrices d'amylocycline. La population inférieure droite a une taille moyenne similaire à la population supérieure mais la fluorescence moyenne des cellules la composant est significativement différente des deux autres populations. Cette population peut être décrite comme une population de taille de cellule normale non productrice d'amylocycline. La population inférieure gauche a une taille et une fluorescence significativement différentes des deux autres populations. Cette dernière se compose de cellules de petites tailles non productrices d'amylocycline. Il pourrait s'agir de spores ou de cellules en sporulation. Les effectifs dans les deux populations inférieures sont similaires.

5.2.1.3 Diversification phénotypique au sein des biofilms racinaires

L'empreinte des populations de *B. velezensis* en biofilm racinaire a une répartition similaire à la répartition des cellules en biofilm synthétique. Trois sous-populations différentes s'y détachent. Néanmoins la répartition au sein des populations semble différente.

Des AV1 sont réalisées pour comparer les moyennes des sous-populations. Les AV1 montrent une différence très hautement significative entre les 3 populations en ce qui concerne les trois variables. Une structuration des moyennes est réalisée (Annexe 5).

Les résultats de la comparaison des moyennes des populations en fonction des trois variables montrent une différence significative entre les trois sous-populations et ce pour les trois variables explicatives. La sous-population supérieure comporte des cellules à taille et fluorescence significativement plus importantes que les cellules des deux autres populations.

³⁰ Analyse de la variance à 1 critère de classification

La sous-population inférieure gauche se compose de cellules significativement plus petites que celles des autres populations et de plus le niveau de fluorescence est également significativement plus petit. Cette population pourrait correspondre à des spores ou à des cellules en sporulation. La troisième sous-population, dont l'effectif est le plus élevé, correspond à des cellules de taille normale mais exprimant une fluorescence faible.

Dans le cas du biofilm racinaire, la distinction sur le graphique de la sous-population supérieure et de la sous-population inférieure droite n'est pas aussi claire que dans le cas du biofilm synthétique. Des cellules de niveau intermédiaire sont présentes et font le lien entre les deux populations. De plus, la population supérieure semble tendre vers une séparation en deux sous-populations.

5.3 Le surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a induit la transcription du gène *acnA*.

Un suivi en fonction du temps des caractéristiques de *B. velezensis* GA1 a été réalisé en milieu liquide RE^{1/2} avec ou sans ajout de 1% surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12A. La densité optique et la fluorescence des cultures ont été analysées en fonction du temps.

Dans un premier temps, la DO des cultures a été évaluée chaque heure (figure 17).

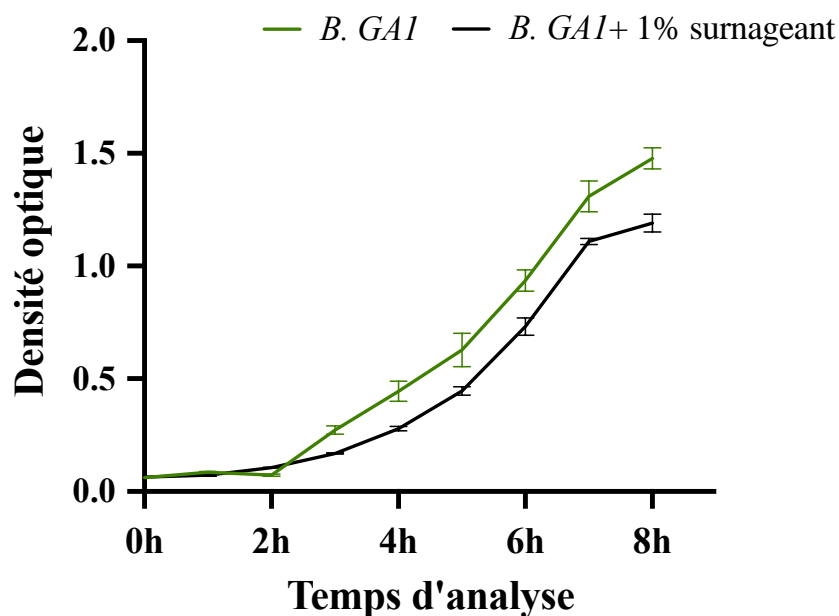


Figure 18. Influence de l'ajout de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la densité optique. Représentation de l'évolution de la densité optique des cultures de *B. velezensis* GA1 avec (noir) et sans (vert) ajout de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a. La quantité de surnageant ajoutée équivaut à 1%. La culture est réalisée en milieu liquide RE 1/2 pendant 8 heures.

Il est observé que l'ajout de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a inhibe la croissance cellulaire de *B. velezensis* GA1 durant les 8 heures de culture.

Par la suite, l'analyse par RT-qPCR et cytométrie en flux (figure 19) a permis de démontrer que dans les premières heures de culture l'ajout de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a à la culture de *B. velezensis* GA1 inhibait la transcription du gène *acnA*. Puis, après 7 heures de culture, une surexpression du gène *acnA* est induite par l'ajout du surnageant. Cette tendance est similaire entre l'expression des gènes *acnA* et *gfpmut3* (annexe 6). Ces résultats sont également démontrés par la comparaison de la quantité de GFP produite par les populations en fonction du temps (figure 17.C). En effet, l'AV2 et la comparaison des moyennes pour les deux types de cultures (annexe 7) ont permis de démontrer que la quantité de GFP produite après 7 heures de culture par la culture avec surnageant est significativement plus importante que la production dans la culture sans surnageant.

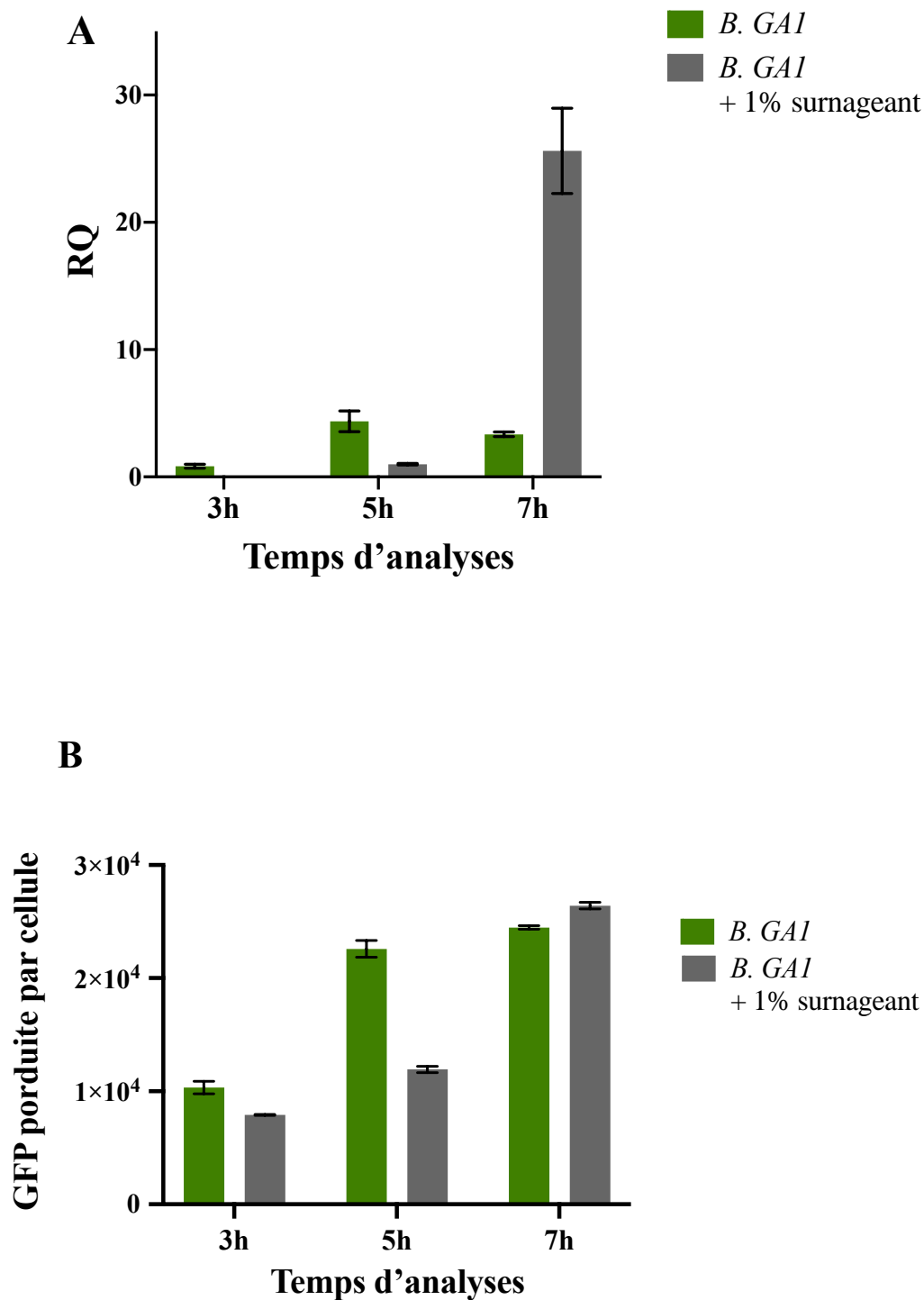


Figure 19. Le surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a amplifie significativement la production d'amylocyclicine par *B. velezensis*. Les résultats obtenus en culture normale sont présentés en vert et les résultats obtenus en culture avec 1% de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a sont présentés en gris. En **A** la quantification relative du gène *acnA* en fonction du type de culture. Analyses réalisées par RT-QPCR. En **B** Quantité moyenne de protéine GFP fonctionnelle traduite dans une cellule selon le type de culture.

5.4 L'interaction microbienne entre les colonies de *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a sur agar n'affecte pas la structure de la population de *B. velezensis* GA1

Suite à la mise en interaction de colonies *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. sur milieu solide, des analyses des biofilms de *B. velezensis* GA1 ont été réalisées par cytométrie en flux. La structure des populations des biofilms synthétiques a été comparée par analyses en composantes principales de façon similaire à la section 5.2

5.4.1 Le temps de culture affecte la structure des empreintes des populations

Dans un premier temps, les souches sauvages de *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a sont mises en interaction selon 4 distances différentes sur milieu RE ¼ (section 4.2.3). Les analyses par cytométrie en flux sont réalisées en différents temps soit 18 heures , 24 heures et 42 heures de culture.

Les résultats de l'analyse en composantes principales (annexe 8) montrent un impact du temps de culture sur le profil de production de l'amylocycline des colonies de *B. velezensis* GA1. Les individus se rassemblent par temps de culture dans le premier plan factoriel. L'observation des empreintes montrent l'apparition d'une sous-population non fluorescente (Figure 19).

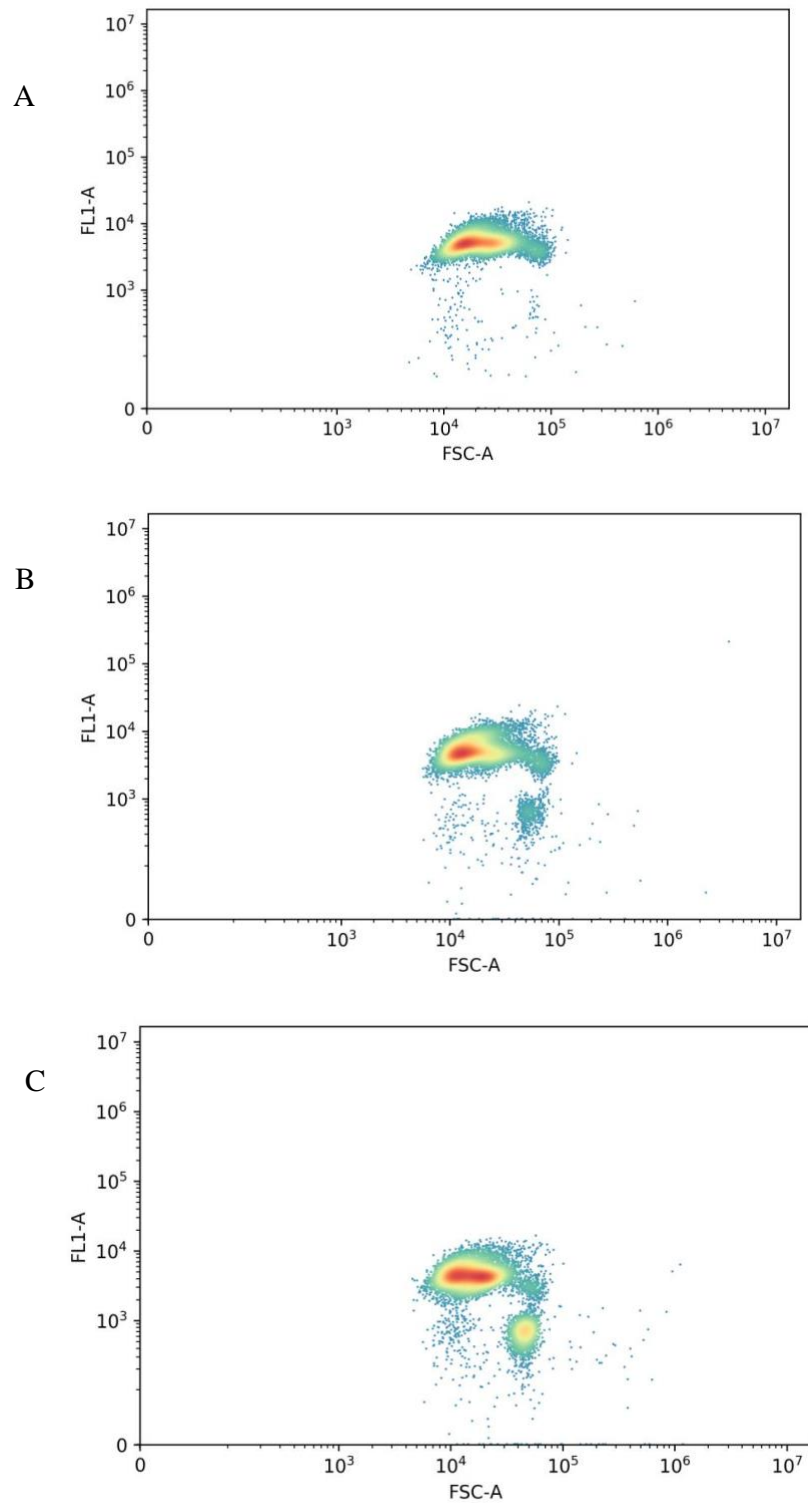


Figure 20. **Impacte du temps de culture sur la structure des empreintes de *B. velezensis* GA1 en Biofilm synthétique.** Comparaison des cytogrammes de densité de population de *B. velezensis* GA1 sur milieu solide en fonction du temps. L'empreinte de la population est analysée en fonction de la taille des cellules (FSC) et de l'expression de leur fluorescence (FL1) liée à la production d'amylocyclicine. L'empreinte **A** correspond à un temps de culture de 18 heures. L'empreinte **B** correspond à un temps de culture de 24 heures. L'empreinte **C** correspond à un temps de culture de 42 heures. Les trois graphiques correspondent à une distance de 1cm entre les colonies de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* CMR12a. La culture a été réalisée en milieu solide RE ¼.

Le temps de culture le plus long (42 heures) est caractérisé par une concentration plus importante de cellules dans les zones inférieures (zones 3 et 6). A l'inverse le temps de culture de 18 heures est caractérisé par une production de GFP et une quantité de cellules importantes dans la zone 2. Le temps de culture intermédiaire (24 heures) se caractérise par une quantité plus importante de cellules dans la zone 1 ainsi qu'une importante quantité de GFP produite dans cette zone.

Aucun impact de la distance avec *Pseudomonas* sp. CMR12a n'apparaît lors de cette analyse. La différence entre les temps de culture pourrait résider dans un épuisement du milieu ou dans la mise en place d'une différenciation au sein des cellules du biofilms. Pour la suite, le temps de culture le plus long est retenu dans le but d'avoir un temps d'interaction important entre *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp.

5.4.2 Aucune influence des composés volatils de *Pseudomonas* sp. CMR12a n'est observé sur les empreintes des populations de *B. velezensis* GA1

Bacillus velezensis GA1 a été cultivé en milieu solide RE ¼ dans une même boîte de pétri que *Pseudomonas* sp. CMR12a sans mettre les colonies en interaction ou dans une boîte sans *Pseudomonas* sp. CMR12a. Deux timing sont réalisés quant à l'inoculation de *Pseudomonas* sp. CMR12a dans les boîtes (section 4.2.2).

L'analyse en composantes principales (annexe 9) ne montre pas d'impact de la présence de *Pseudomonas* sp. CMR12a dans la boîte sur la structure de la population de *B. velezensis* GA1. En effet, les individus sont mélangés dans le premier plan factoriel.

Des corrélations plus fortes entre individus apparaissent néanmoins, les individus se regroupent en fonction du timing d'inoculation de *Pseudomonas* sp. CMR12a et en fonction des répétitions de l'expérience. Les variations entre les individus sont situées autour de la dimension 1 et sont surtout caractérisées par des changements de densité et de production de GFP, ainsi que par la présence de cellules dans les zones 5 et 6. Les variations entre les individus sont très faibles et correspondent sans doute à des variations liées à l'expérimentation.

Aucune conclusion ne peut être tirée quant à l'impact des composés volatils de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur les profils de production de l'amylocycline de *B. velezensis*.

5.4.3 Aucune différence n'est observée entre les empreintes de *B. velezensis* GA1 avec et sans interaction avec *Pseudomonas* sp. CMR12a

Une analyse en composantes principales est réalisée pour comparer les résultats d'interaction entre *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a (annexe 10). La comparaison des individus est réalisée sur le premier plan factoriel.

La plupart des individus sont regroupés dans le premier plan factoriel. Seuls deux témoins sont différents du reste des individus. Néanmoins il n'existe aucune différence entre les autres témoins sans interaction par rapport aux empreintes des individus avec interaction. Aucun impact de la présence de *Pseudomonas* sur les empreintes des populations de *B. velezensis* GA1 n'est identifié.

5.4.4 La distance d'interaction avec *Pseudomonas* sp. CMR12a n'a pas d'impact sur les empreintes des populations de *B. velezensis* GA1

Une autre analyse en composantes principales est réalisée pour comparer les populations avec interaction en fonction de leur distance avec *Pseudomonas* sp. CMR12a (Annexe 11). Trois composantes explicatives sont retenues.

La répartition des individus dans le premier plan factoriel et le deuxième plan factoriel ne montre aucune tendance entre les individus. Ces derniers sont répartis aléatoirement autour du centre des plans factoriels.

Aucune conclusion ne peut être tirée quant à l'impact de la distance avec les colonies de *Pseudomonas* sp. CMR12a. Cette conclusion est en accord avec les résultats de la section 5.4.3 où aucune différence entre les colonies avec et sans interaction n'est observée.

5.4.5 La délétion de la sessiline, de l'orfamide et de la phénazine n'a pas d'impact sur le profil des empreintes de *B. velezensis* GA1

Pour finir, les colonies de *B. velezensis* GA1 ont été mises en interaction avec les 3 mutants de *Pseudomonas* sp. CMR12a (section 4.1.1). L'utilisation de ces mutants permettra de voir si la production des métabolites secondaires délétés par *Pseudomonas* sp. CMR12a a un impact sur la production de l'amylocycline par *B. velezensis* GA1.

Deux analyses en composantes principales ont été réalisées. Une pour chaque timing entre l'inoculation des deux souches. La première analyse en composantes principales correspond à l'inoculation simultanée de *B. velezensis* et de *Pseudomonas* sp. (annexe 12) et la deuxième analyse en composantes principales correspond à l'inoculation préalable de *Pseudomonas* sp. sur le milieu (annexe 13). Les résultats de l'analyse en composantes principales ne montrent aucune différence entre les empreintes des populations de *B. velezensis* GA1 selon l'interaction avec les différents mutants de *Pseudomonas* sp. CMR12a. Les variations observées au sein des individus dans les plans factoriels sont dues aux variations expérimentales.

5.5 *Pseudomonas* sp. CMR12a a une meilleure fitness que *B. velezensis* GA1 *in planta*.

La culture *in planta* représente un système plus complexe que les expériences précédemment réalisées. En effet, lors des expériences d'interactions en milieu solide, les interactions entre *Pseudomonas* sp. CMR12a et *B. velezensis* GA1 correspondent uniquement à des échanges de métabolites par l'intermédiaire du milieu. Sur les racines, les bactéries sont directement en contact les unes avec les autres ce qui engendre une complexité d'interactions plus importantes. De plus, dans ce cas d'étude les seuls nutriments fournis par les exsudats des plantes sont disponibles.

Les souches de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. CMR12a ont été cultivées *in planta* sur des plantules de tomates (section 4.2.4) lors de deux types d'expérimentation. Lors de la première expérience les cellules ont été inoculées sur les racines sans lavage préalable. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont présentés à la figure 21.

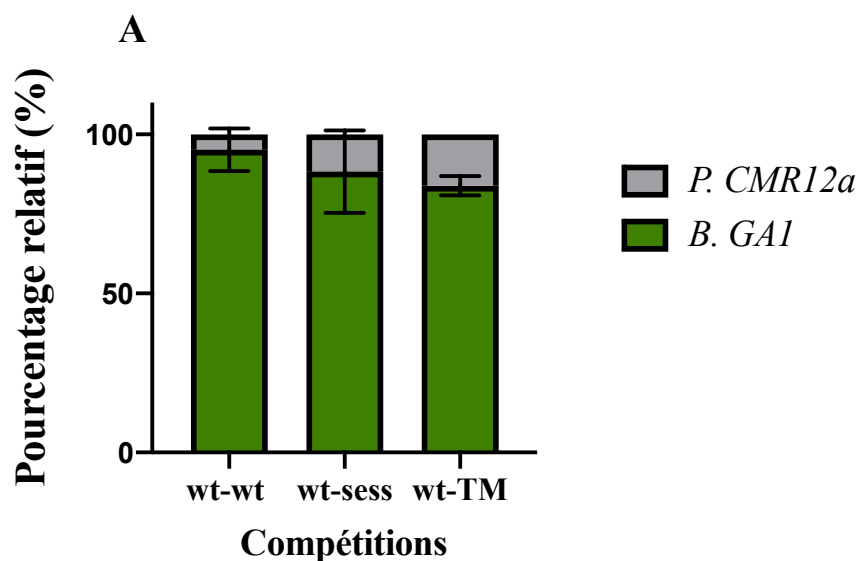


Figure 21. Effet de la présence de métabolites secondaires sur les capacités de colonisation *in planta* de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. CMR12a. La figure présente les résultats obtenus lors de la première expérience *in planta*. Le temps de pré culture de *B. velezensis* est de 48h et le temps de pré culture de *Pseudomonas* ps. est de 6 heures. Les cellules n'ont pas subi de lavage avant inoculation et les compétitions sont réalisées avec 5% de *Pseudomonas* sp. CMR12a et 95% de *B. velezensis* GA1. Les cellules ont été cultivées *in planta* durant 72 heures. Les pourcentages relatifs sur la plante ont été calculés à partir des résultats de comptage sur boîte (section 4.2.4).

Lors de la première expérience, la préculture de *B. velezensis* GA1 a duré 48 heures et les cellules n'ont pas été lavées avant inoculation, ce qui induit la présence dans l'inoculum de métabolites secondaires produits par *Bacillus* au cours de sa pré-culture. Les résultats de cette expérience montrent une présence majoritaire de *B. velezensis* GA1 sur les racines avec un pourcentage relatif d'environ 90% dans les trois cas. Le pourcentage de *Pseudomonas* sp. sur les racines est d'environ 10%. Malgré sa faible présence par rapport à la quantité de *B. velezensis* GA1, le pourcentage de *Pseudomonas* sp. a doublé en comparaison au pourcentage présent dans l'inoculum de départ.

A la suite des résultats obtenus lors de la première expérience réalisée *in planta*, des ajustements du protocole ont été réalisés. Tout d'abord, un lavage des cellules de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. CMR12a est effectué avant inoculation. De plus, le poids des racines est évalué dans le but de quantifier la colonisation en fonction du poids racinaire. Ensuite, une quantification de la sporulation de *B. velezensis* dans les populations est réalisée. Enfin la colonisation du mutant Δ srfaA de *B. velezensis*, incapable de produire de la surfactine, est également étudiée. La colonisation des souches de *B. velezensis* GA1 sera également évaluée avec et sans l'ajout de 10 μ mol de surfactine dans l'inoculum. Ces ajustements donnent lieu aux résultats présentés à la figure 22.

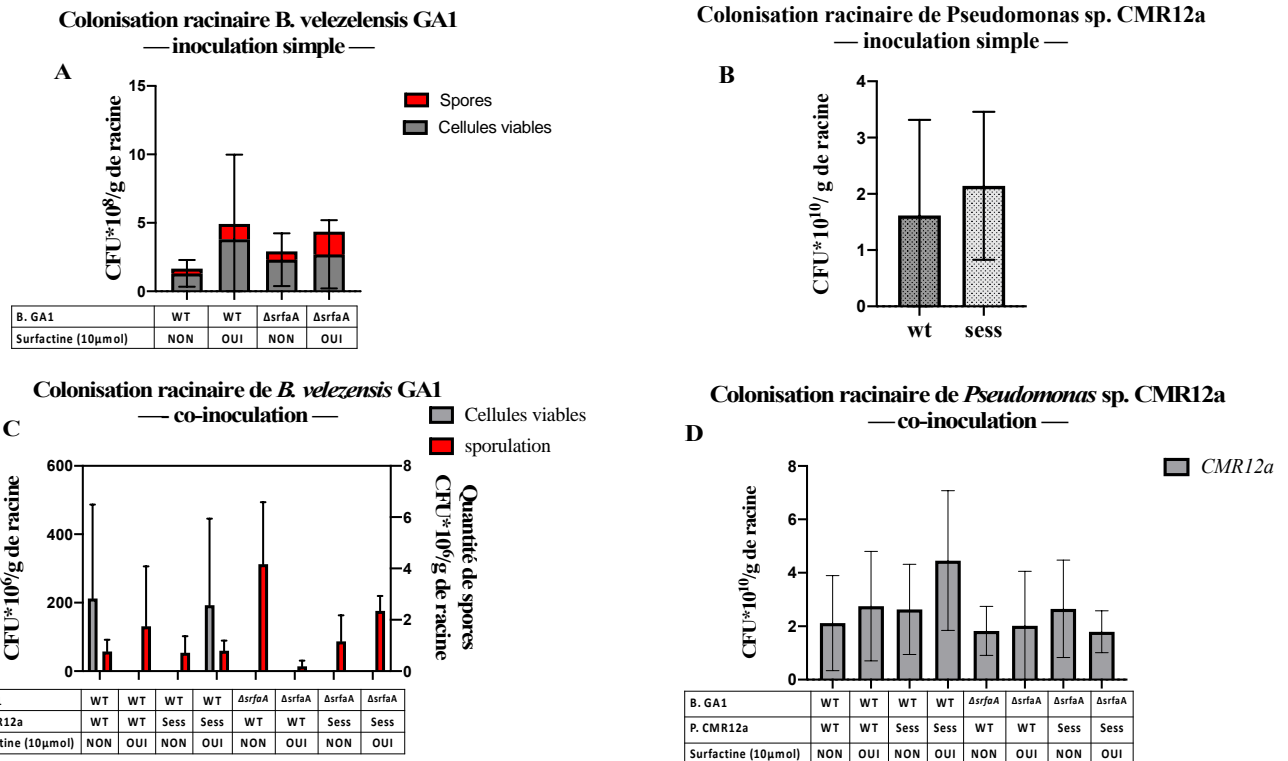


Figure 22. Étude des populations de *Pseudomonas* sp. CMR12a et *B. velezensis* GA1 *in planta* après inoculation simple ou en compétition. La figure représente une comparaison des résultats obtenus en colonisation simple par *B.velezensis* et en compétition *in planta* de *B.velezensis* et *Pseudomonas* sp. Les cellules ont été lavées avant inoculation. Le temps de pré-culture de *B.velezensis* est de 48 heures et le temps de pré-culture de *Pseudomonas* est de 6 heures. La colonisation a été évaluée après 72 heures de culture. **A** : Quantité de CFU par gramme de racine après 72 heures de colonisation pour GA1 et Δ srfa avec et sans l'ajout de 10 μ mol de surfactine. Les informations sont séparées en fonction de la quantité de spores et de cellules viables dans la population totale. **B** : les résultats de colonisation racinaire pour les souches de *Pseudomonas* sp. CMR12a en inoculation simple. **C** : Quantité de CFU de *B. velezensis* GA1 par gramme de racine après 72 heures de compétition (spores et les cellules viables). **D** : Résultats de colonisation racinaire pour les souches de *Pseudomonas* sp. CMR12a en compétition.

En premier lieu les résultats des inoculations simples montrent une colonisation plus importante des racines par *Pseudomonas* sp. CMR12a que par *B.velezensis* GA1. En effet, la quantité de CFU de *Pseudomonas* sp. par gramme de racine est environ 100 fois plus élevée que la quantité de CFU de *B. velezensis* GA1 présent par gramme de racine. De plus la population totale de *B. velezensis* GA1 comporte entre 20% et 30% de spores. En colonisation simple, *Pseudomonas* sp. CMR12A se montre plus efficace que *B. velezensis* GA1 pour coloniser les racines.

Sur les données récoltées en inoculation simple, plusieurs comparaisons des moyennes sont réalisées (Annexe 14). En premier lieu une comparaison de la colonisation racinaire entre le mutant Δ srfaA et la souche Δ amyE::cat-pacnB/GFPmut3 de *B. velezensis* GA1 est réalisée. Ce test ne montre aucune différence significative entre la colonisation racinaire de ces deux souches (p-valeur=0,396). Ensuite, l'impact de l'ajout de surfactine sur la colonisation racinaire

des deux souches est évalué. Aucune différence de la colonisation racinaire n'est observée chez la souche sauvage avec ajout ou non de surfactine (p-valeur=0,3355). Pour finir aucune différence entre la colonisation racinaire de la souche Δ srfaA n'est observée entre l'ajout ou non de surfactine (p-valeur =0,5275).

En plus des données de comptage, les populations de la souche sauvage ont été analysées par cytométrie en flux puisqu'elles possèdent un système rapporteur GFP. Une analyse en composantes principales est réalisée pour comparer les empreintes des populations de la souche sauvage avec et sans ajout de surfactine (annexe 15). N'ACP, ne montre aucune différence entre les empreintes des populations avec et sans surfactine.

En deuxième lieu, les résultats des compétitions *in planta* montrent la présence d'une majorité de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la racine. La quantité de *Pseudomonas* sp. CMR12a après 72 heures de culture avec *B. velezensis* GA1 est similaire à la quantité de *Pseudomonas* sp. CMR12a présent par gramme de racine que lors de la colonisation simple. La présence de *B. velezensis* GA1 ne semble en aucun cas affecter la colonisation racinaire de *Pseudomonas* sp. CMR12a. En ce qui concerne *B.velezensis* GA1, son occurrence sur les racines est 10.000 fois moins importante que celle de *Pseudomonas* sp. CMR12a. Peu de données pour les cellules viables sont disponibles à la figure 21C. En effet, dû à la forte concentration de *Pseudomonas* sp. CMR12a des dilutions importantes sont réalisées, dans laquelle la présence de *B. velezensis* GA1 sur les racines n'est pas toujours représentée. Néanmoins la présence de spores sur les racines est un indicateur de la présence de *B. velezensis* GA1 sur les racines.

Les résultats montrant un faible pourcentage de *B.velezensis* GA1 sur les racines obtenus par comptage sont comparés aux résultats d'analyse par cytométrie en flux. Lors de la comparaison des empreintes des colonisations simples de *Pseudomonas* sp. CMR12a et *B. velezensis* GA1 avec l'empreinte de la compétition (annexe 16), il ressort une grande similitude entre l'empreinte de *Pseudomonas* sp. CMR12a et l'empreinte de la compétition mêlant des cellules de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. CMR12a. Ces résultats viennent corroborer les résultats obtenus par comptage.

Lors de cette dernière expérimentation, il est très difficile d'identifier les cellules de *B. velezensis* GA1 au sein des empreintes de compétition. En effet, très peu de cellules apparaissent dans les niveaux de FL1 supérieurs. De plus lors de l'ACP (annexe 17), aucune

différence importante n'apparaît entre les empreintes de *pseudomonas* sp. CMR12a en simple inoculation et les empreintes des compétitions.

Lorsque la même comparaison (annexe 18) est réalisée pour les empreintes obtenues lors de la première expérience, une tendance est observée. En effet, les individus correspondant à des inoculations simples de *Pseudomonas* sp. CMR12a sont rassemblés et se caractérisent donc par un grand nombre de cellules dans la zone 5. En comparaison, les empreintes correspondant à des compétitions sont caractérisées par un nombre des cellules importants dans les zones 4 et 6. La différence observée dans l'ACP s'observe également lors de la comparaison des empreintes (Figure 23. A et B). De plus, certaines empreintes de compétitions (Figure 23.C) comportent des cellules de *B. velezensis* GA1 exprimant une fluorescence. La présence de *B. velezensis* GA1 dans les empreintes de compétition est donc bien identifiable dans le cas de la première expérience. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats obtenus par comptage.

Pour finir, l'observation des empreintes de compétition montre une très faible production d'amylocyclicine lorsque *B. velezensis* GA1 est mis en présence de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur les racines. La présence de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur les racines semble induire une inhibition de la production de la bactériocine.

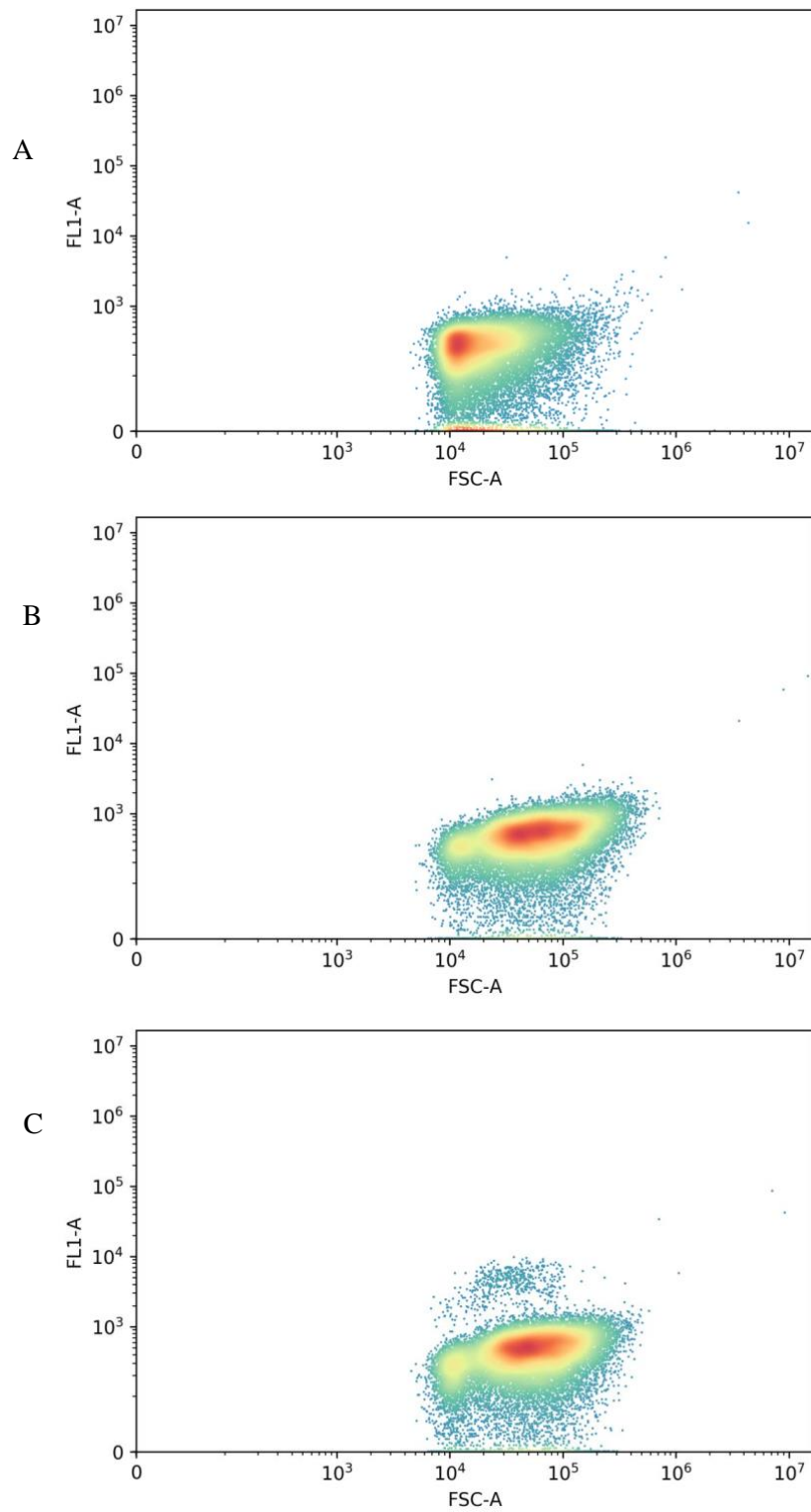


Figure 23. **Comparaison des empreintes de compétition avec les empreintes de colonisation simple de *Pseudomonas* sP. CMR12a.** Comparaison d'un cytogramme de la densité de *Pseudomonas* sp. en inoculation simple en **A.** avec des cytogrammes de compétition en **B** et **C.** L'empreinte de la population est analysée en fonction de la taille des cellules (FSC) et de l'expression de leur fluorescence (FL1) liée à la production d'amylocycline.

6. Discussion et perspectives

Dans le cadre de la recherche agronomique d'alternatives aux produits phytosanitaires, les avancées sur la connaissance de l'écologie de *B. velzensis* GA1 ainsi que l'investigation sur l'utilisation de l'amylocyclicine en tant qu'agent de protection des plantes pourraient mener à l'amélioration des bioformulations basées sur cette souche. De plus la compréhension des interactions avec d'autres microorganismes de la niche écologique pourrait permettre d'améliorer les effets des agents de biocontrôle lors de leur application en conditions réelles.

Dans ce cadre, un outil de suivi de l'expression de l'amylocyclicine a été développé. Celui-ci est basé sur la combinaison d'un système rapporteur de l'expression de l'opéron *acn* codant pour l'amylocyclicine et de la cytométrie. La validation de cet outil par RT-qPCR a montré que les variations dans la production de l'amylocyclicine étaient détectées par l'association de ces deux outils. En effet, les variations observées par RT-qPCR dans la transcription du gène *acnA* sont également observées dans la transcription du gène *gfpmut3*. Ces variations sont aussi détectées par l'émission de fluorescence des cellules dans le cytomètre en flux. Dans ce cas d'étude l'association de ces deux outils est particulièrement pertinente, en effet, la détection de la production d'amylocyclicine est compliquée et n'a été détectée que dans une seule publication. La masse de la forme protonée de la bactériocine a été détectée à un m/z de 6,381,4 par HPLC par Scholz et al. en 2014.

L'outil proposé a permis de détecter des différences de production de l'amylocyclicine au cours des expériences. En effet, l'analyse de la corrélation entre la transcription du gène *acnA* et du gène *gfpmut3* montre l'existence d'une corrélation entre la transcription des deux gènes. Néanmoins trop peu d'analyses ont été réalisées pour pouvoir mettre en place un test statistique robuste. Un suivi temporel de l'expression des deux gènes par RT-qPCR permettrait, par l'acquisition de données supplémentaires, de mettre en place une corrélation robuste entre la transcription des gènes *acnA* et *gfpmut3*.

De plus lors de la validation de l'outil, un décalage temporel et d'intensité est observé entre la transcription du gène *ancA* et l'observation d'une protéine fonctionnelle fluorescente au cytomètre en flux. Une première explication aux discordances observées est l'existence d'un décalage entre la transcription d'un gène et sa traduction et maturation en protéine

fonctionnelle. Dans le cas de la protéine fluorescente verte, après avoir été produite, cette dernière doit d'abord passer par une étape de maturation avant d'être fonctionnelle (Mio R. et al., 2016). Sans maturation, la protéine synthétisée ne pourra pas exprimer de fluorescence, cette étape est aussi la plus longue de tout le processus de création d'une protéine (Mio R. et al., 2016). Le temps de maturation de la GFPmut3 prend 7 minutes chez *E. coli* (Mio R. et al., 2016) cependant, le temps de maturation peut varier en fonction des souches et du stade de croissance (Hebisch, Knebel, Landsberg, Frey, & Leisner, 2013). En plus de la différence dans le temps de maturation pouvant exister entre *E. coli* et *Bacillus sp.*, la transcription d'un ARNm et sa traduction en protéine n'assure pas la réussite de la phase de maturation et il peut donc exister un décalage entre le nombre de protéines traduites et le nombre de protéines exprimant une fluorescence (Bustin et al., 2009).

Une seconde explication aux discordances observées est le site de liaison ribosomique (RBS) utilisé lors de la fusion transcriptionnelle entre le promoteur *acnB* de la GFPmut3. En effet, ce dernier a été optimisé pour la souche *B. subtilis* et non pas pour *B. velezensis* GA1 (Bisicchia, Botella, & Devine, 2010; Trauth & Bischofs, 2014). Une adaptation de cette optimisation pour *B. velezensis* GA1 pourrait améliorer la transcription de la *gfpmut3*. Pour finir, le système rapporteur *gfpmut3* se situe à la place du gène *amyE* dans le génome. Une compétition pour la transcription entre les deux sites du promoteur *acnB* ainsi qu'une différence dans la facilité d'accès pourrait également expliquer les différences d'intensité entre la transcription des gènes *ancA* et *gfpmut3*. En effet, l'architecture de la chromatine varie en fonction des régions du génome et peut influencer l'expression génétique (Willenbrock & Ussery, 2004).

En définitive, l'outil d'investigation de l'expression de l'amylocyclicine peut être utilisé pour répondre aux objectifs de cette étude. L'optimisation du système rapporteur ainsi que son association à d'autres rapporteurs fluorescents pourraient considérablement améliorer la force de cet outil dans l'étude d'agent de protection des plantes. La combinaison avec la technique HPLC pour la détection d'autres métabolites secondaires pourrait également permettre des avancées dans la compréhension de l'écologie de *B. velezensis* GA1.

Le premier objectif de ce projet consistait à étudier et évaluer le profil de production de l'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1 dans des conditions proches de la niche écologique.

La comparaison des profils de production de l'amylocyclicine de *B. velezensis* GA1 en fonction des trois types de culture investiguées a permis d'identifier des différences importantes dans la production de la bactériocine ainsi que dans la structure de la population de *B. velezensis* GA1. La production d'amylocyclicine par la population planctonique est significativement plus importante que la production de la bactériocine dans les biofilms. La production la moins importante est identifiée dans le profil de production de l'amylocyclicine *in planta*. De plus, les empreintes des biofilms sont caractérisées par la présence d'une sous-population négative ne produisant pas le métabolite d'intérêt et une population non productrice de taille réduite. Une diversification phénotypique importante est observée au sein des populations de *B. velezensis* GA1 en biofilms. En effet, les cellules à l'intérieur des biofilms, en plus d'avoir une physiologie différente des cellules planctoniques vont varier les unes par rapport aux autres (Stewart & Franklin, 2008). En effet, l'analyse individuelle des 3 types d'empreinte analysées au cours de l'étude a permis d'identifier la présence de sous-populations exprimant des phénotypes différents dans les trois populations.

L'analyse du profil de production de l'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1 en culture planctonique montre l'apparition de deux sous-populations au sein de la population fluorescente. Les cellules des deux sous-populations ont des tailles et des fluorescences significativement différentes ce qui montre l'existence de deux phénotypes dans la population globale. Cette différenciation phénotypique peut être expliquée par l'épuisement du milieu qui va induire la sporulation de *B. velezensis* GA1. En effet, la partie de la cellule formant l'endospore n'exprime pas de fluorescence ce qui pourrait faire diminuer l'émission de fluorescence des cellules en sporulation (Doherty, Bailey, & Lewis, 2010).

Lors des cultures en milieu solide et *in planta*, les bactéries s'agrègent en biofilm. Ce mode de croissance est totalement différent du mode planctonique et implique l'apparition d'autres propriétés chez les bactéries (Danhorn & Fuqua, 2007). En effet, une diversification phénotypique plus importante que dans le cas planctonique a été démontrée lors de la comparaison des structures en fonction du type de culture. Dans les biofilms synthétiques et racinaires, il y a apparition de 3 sous-populations distinctes. Une population « positive » qui produit de l'amylocyclicine, une population « négative » qui n'exprime pas de fluorescence et

une dernière population qui n'exprime pas de fluorescence mais dont la taille est réduite par rapport aux autres populations. Cette dernière population est difficile à caractériser. Il pourrait s'agir de spores ou de cellules en sporulation n'exprimant pas de fluorescence. En effet, le stade de sporulation a un impact sur l'expression de la fluorescence par les cellules et l'expression de la GFP est fortement impactée lors du dernier stade de sporulation des cellules chez *B. subtilis* (Doherty et al., 2010). Cette dernière population pourrait donc correspondre à des cellules en fin de sporulation.

Cette différence dans la structure des empreintes et dans la production de la bactériocine entre le modèle planctonique et les modèles biofilms peut s'expliquer de différentes façons. Tout d'abord, la disponibilité en nutriments est moins importantes dans les milieux dans lesquels les biofilms sont cultivés ce qui peut induire un état de carence nutritive pour les bactéries et donc changer leurs activités physiologiques. Ensuite, dans les biofilms, les bactéries de même espèces vont exprimer différents phénotypes en fonction de leur place dans la colonie et des besoins de cette dernière (Stewart & Franklin, 2008). Les cellules du biofilm vont associer plusieurs moyens de défenses donc la production d'amylocycline, ce qui pourrait expliquer pourquoi un petit pourcentage de cellules sont productives de la bactériocine. Dans cette même optique, la production d'amylocycline pourrait dépendre de la place des cellules dans le biofilm. En effet, les cellules du centre n'ont pas besoin d'en produire car elles ne vont pas rentrer en contact avec des agresseurs, de plus il faut s'assurer que la production des composés antibactériens n'atteint pas les cellules sœurs. Dans cette optique, il serait intéressant d'investiguer la répartition de la bactériocine dans les biofilms. Différentes techniques permettent d'analyser *in situ* la structure, la composition, les processus et la dynamique des communautés microbiennes comme la microscopie à balayage laser (LSM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou encore la microscopie à rayons X à transmission par balayage (STXM)(Ongena & Jacques, 2008).

Bien que les empreintes des deux biofilms soient similaires, des différences sont observées entre les deux profils de biofilms analysés. En premier lieu la population positive est beaucoup moins dense en biofilm racinaire et la plus grande densité de cellule est retrouvée dans la population négative. De plus, il y a apparition d'un phénotype intermédiaire entre la population positive et négative. Une tendance à la séparation en deux de la population positive semble également se profiler. La différenciation phénotypique en biofilm racinaire est donc plus importante qu'en biofilm synthétique. Cette différence pourrait être due à une ressource en

nutriments plus faible sur la racine car la seule source de nutriments est l'exsudat des plantules. De plus le biofilm qui se forme sur la racine est plus complexe que le biofilm synthétique. En effet, les cellules sur agar s'agrègent sous forme d'une colonie. Cette dernière peut être considérée comme un biofilm simplifié. Enfin, la plante de par la production de composé, pourrait inhiber la production de la bactériocine.

En conclusion, l'étude des profils de production de l'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1 prouve que les phénotypes observés lors des cultures liquides en labo sont différentes des conditions réelles auxquelles la bactérie est confrontée dans sa niche écologique. La compréhension de l'existence d'une différence de production de la bactériocine entre la culture liquide et les cultures en biofilm est une avancée dans la connaissance de l'écologie de *B. velezensis* GA1 et sa production d'amylocyclicine. Des recherches plus avancées sur la production de métabolites en conditions réelles doivent être menées. En effet, la découverte de la production de cette bactériocine par *B. velezensis* GA1 ne certifie pas que la production de ce métabolite est importante en conditions réelles et ne donne pas d'information par rapport aux conditions dans lesquelles elle est produite. Le rôle de protection étant déjà réalisé par le biofilm (Danhorn & Fuqua, 2007), la production de l'amylocyclicine n'est peut-être pas nécessaire lorsque les cellules vivent sous cette forme. De plus, de nouvelles investigations quant à l'effet antimicrobien de l'amylocyclicine pourraient permettre de mieux comprendre son utilité. Jusqu'à maintenant l'amylocyclicine a été identifié comme ayant un effet antimicrobien sur des bactéries à gram-négatives (Scholz et al., 2014). Cette investigation pourrait notamment être réalisée par l'utilisation d'un mutant *ancA* en comparaison à la souche sauvage dans des tests d'antagonismes.

Le second objectif de ce travail consistait à évaluer l'impact de l'interaction entre *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la production d'amylocyclicine par *B. velezensis* GA1.

Tout d'abord nous avons démontré que l'ajout de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a à une culture planctonique de *B. velezensis* GA1 induisait une surexpression de la transcription du gène *acnA* par *B. velezensis* GA1 après 7 heures de culture. L'ajout de surnageant au milieu solide ou sur les racines des plantes devrait être réalisé pour quantifier l'impact de l'ajout de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur l'expression de gène *acnA* dans d'autres types de culture.

Cette amplification indique la présence dans le surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a de composés qui vont induire une réponse de défense chez *B. velezensis* GA1 et influencer la production d'amylocycline. En effet, une autre étude dans le laboratoire d'accueil a permis de montrer que la production de certains KPs (Bacilaene et Difficidine) produits par *B. velezensis* GA1 étaient aussi induite par le même surnageant (Andric et Al en préparation).

La mise en interaction de *B. velezensis* GA1 et de *Pseudomonas* sp. CMR12A sur milieu solide et ce sans contact entre les colonies bactériennes n'a montré aucun impact de la présence de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la structure des populations de *B. velezensis* GA1 et sur la production en amylocycline. Une dépendance au temps du le profil de production de l'amylocycline en milieu solide à été démontrée. Cet effet pourrait être dû à un épuisement du milieu de culture et/ou alors à la mise en place d'une différenciation au sein du biofilm synthétique (Stewart & Franklin, 2008).

Cette étude s'est focalisée sur la production d'amylocycline par *B. velezensis* GA1 et dans ce cas d'étude aucune interaction n'a été détectée. Néanmoins l'impact de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la production des autres métabolites secondaires de *B. velezensis* GA1 n'a pas été investiguée. Or, comme discuté précédemment, l'impact du surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur d'autres métabolites secondaires produits par *B. velezensis* GA1 a été démontré (Andric et Al en préparation). L'analyse des autres métabolites secondaires produits par *B. velezensis* GA1 pourrait résulter en l'identification de variations dues à l'interaction. De plus, la quantification de la sporulation n'a pas été réalisée dans ce cas d'étude. De telles analyses des spores de *B. velezensis* GA1 pourraient être intéressantes. En effet, *Pseudomonas* sp. peut être impliqué dans la sporulation de *Bacillus* sp. (Molina-Santiago et al., 2019) comme semblent le confirmer les résultats de compétition *in planta* de cette étude.

Différentes informations ressortent de la mise en interaction *in planta* de *B. velezensis* GA1 avec *Pseudomonas* sp. CMR12a en compétition sur des plantules de tomates. Tout d'abord, la comparaison de la colonisation seule de *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a montre une meilleure capacité de colonisation racinaire par *Pseudomonas* sp. CMR12a. Cette capacité de colonisation de CMR12a se reflète également en compétition. En effet, même dans cas le cas où la présence de *B. velezensis* GA1 est importante sur les racines, le pourcentage de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur les racines double en 72 heures de culture. L'investigation de l'interaction entre les souches sur le long terme serait une expérimentation intéressante à

investiguer pour voir si le pourcentage des deux populations évolue et pour permettre de voir si une interaction synergique permet de mettre en place un biofilm bi-espèces ou si la croissance de *Pseudomonas* sp. CMR12a va continuer jusqu'à occulter *B. velezensis* GA1. De plus, des expérimentations sur sol ou avec plus de microorganismes pourraient être intéressantes. En effet, la présence d'une troisième espèce sur la racine pourrait contrôler la croissance de *Pseudomonas* sp et permettre à *B. velezensis* GA1 une colonisation plus efficace.

En ce qui concerne la colonisation de *B. velezensis* GA1, lors de la première expérience dans laquelle aucun lavage n'est réalisé sur les racines, la souche colonise de façon importante les racines. Néanmoins lorsque les métabolites secondaires produits lors de la pré-culture sont éliminées par lavage, la colonisation racinaire de *B. velezensis* GA1 est considérablement affectée. Les métabolites secondaires produits par *B. velezensis* GA1 jouent donc un rôle important pour la colonisation de la niche et pour la défense contre des organismes concurrents. Néanmoins, la comparaison de la colonisation simple et en compétition de *B. velezensis* GA1 sauvage avec un mutant Δ srfaA n'a montré aucune différence dans la colonisation des deux souches. De plus, l'ajout de surfactine réalisé dans l'inoculum n'affecte pas non plus la colonisation.

La présence de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur les racines semble également augmenter la sporulation de *B. velezensis* GA1 puisque la quantité de spores présents dans les compétitions est très importante par rapport à la quantité de spores dans les colonisations simples au vu des concentrations en *B. velezensis* GA1 sur les racines.

Pour finir, l'analyse des empreintes de compétition comportant une majorité de *B. velezensis* GA1 a permis d'identifier la présence de *B. velezensis* GA1 dans la population. Néanmoins le pourcentage de cellules exprimant une fluorescence est minime dans cette population en comparaison aux empreintes obtenues en colonisation seule. Ces résultats pourraient être dus à une inhibition de la production d'amylocycline par la présence de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur les racines. Néanmoins, l'amylocycline n'a pas montré d'effet antimicrobien contre les bactéries à gram-négatif (Scholz et al., 2014) ce qui pourrait expliquer la non expression de fluorescence des bactéries en compétition. De plus les empreintes observées confirment les résultats obtenus par comptage et sont donc un bon indicateur de la présence de *B. velezensis* GA1 sur les racines.

Pour finir, le système d'inoculation des plantules pourrait être revu notamment en réalisant des inoculations différées entre *B. velezensis* GA1 et *Pseudomonas* sp. CMR12a. De plus les colonisations racinaires pourraient être suivies par imagerie confocale pour caractériser la structuration des biofilms sur les racines (Bridier & Briandet, 2014).

7. Conclusion

L'augmentation de la population mondiale et avec elle, celle de la demande en denrée alimentaire sont d'autant de contraintes qui ont provoqué l'intensification globale de l'agriculture. De nos jours, les conséquences de ce mode de production se font ressentir par l'appauvrissement des sols, la pollution des zones aquatiques ou encore la disparition de la biodiversité. Le système agricole doit évoluer et se diversifier dans le but de répondre à la demande de façon plus durable et dans le respect de l'environnement.

L'ingénierie des sphères rhizoïdales pourrait dès lors réduire notre dépendance à l'égard des produits agrochimiques notamment par l'utilisation d'agents de biocontrôle. Bien que prometteuse, cette solution a rencontré beaucoup de problèmes notamment en ce qui concerne l'efficacité de l'application des agents de biocontrôle sur le terrain. C'est pourquoi, la recherche sur l'écologie des PGPR ainsi que sur les mécanismes qui régissent leurs colonisations, leurs interactions et leurs productions de composés bioactifs au sein de la rhizosphère sont des points phares de cette recherche.

Dans ce contexte, l'étude présentée s'est penchée sur l'écologie de *B. velezensis* GA1 une rhizobactérie promotrice de la croissance des plantes et sa production en amylocycline, une nouvelle molécule bioactive d'intérêt. Cette étude a permis de montrer, par l'utilisation d'une méthode de comparaison des empreintes, les différences existantes dans la production de l'amylocycline par *B. velezensis* GA1 en fonction du mode de culture de la souche. De plus la comparaison des structures de *B. velezensis* GA1 montre une diversification phénotypique au sein des biofilms quant à la production de la bactériocine. Cette étude démontre également l'induction d'une surexpression de l'amylocycline lors de l'ajout de surnageant de *Pseudomonas* sp. CMR12a à la culture liquide.

Lors des tests de compétitions et de colonisations *in planta* une plus grande efficacité de colonisations par *Pseudomonas* sp. CMR12a a pu être identifiée. Les résultats semblent

également indiquer un rôle important des métabolites secondaires de *B.velezensis* GA1 dans la colonisation racinaire, la défense contre *Pseudomonas* sp. CMR12a et un impacte de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la sporulation de *B. velezensis* GA1

Pour finir, cette étude est un exemple de l'utilisation d'un système rapporteur pour le suivi de la production d'un métabolite secondaire d'intérêt et ouvre les perspectives de l'utilisation d'un tel outil dans la détection d'autres métabolites secondaire de *B. velezensis* GA1.

8. Bibliographie

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. Ben, & Galvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, *163*(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Arora, N. K., Verma, M., & Mishra, J. (2017). Rhizobial Bioformulations: Past, Present and Future. In *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation* (pp. 69–99). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3_4
- Bais, Harsh P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bais, Harsh Pal, Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production . *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents*. Retrieved from www.sbg.org.br
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bertin, C., Yang, X., & Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1023/A:1026290508166>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bisicchia, P., Botella, E., & Devine, K. M. (2010). Suite of novel vectors for ectopic insertion of GFP, CFP and IYFP transcriptional fusions in single copy at the *amyE* and *bglS* loci in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, *64*(3), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.06.002>
- Borriss, R. (2011). Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 41–76). https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_3
- Borriss, R. (2015). *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. In *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_40

- Bridier, A., & Briandet, R. (2014). Contribution of confocal laser scanning microscopy in deciphering biofilm tridimensional structure and reactivity. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1147, 255–266. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9_18
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Castiblanco, L. F., & Sundin, G. W. (2016). New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*. <https://doi.org/10.1111/jipb.12428>
- Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., & Onge, M. (2012). Bacillus-Based Biological Control of Plant Diseases. In *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*. <https://doi.org/10.5772/17184>
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X. W., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). In *Gene*. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
- Cosson, P. P., & Mary, C. (2003). GFP, et la lumière fut. *Biofutur*, 1996(161), 24–27. [https://doi.org/10.1016/s0294-3506\(96\)80200-6](https://doi.org/10.1016/s0294-3506(96)80200-6)
- D'aes, J., Hua, G. K. H., De Maeyer, K., Pannecouque, J., Forrez, I., Ongena, M., ... Höfte, M. (2011). Biological control of Rhizoctonia root rot on bean by phenazine- and cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology*, 101(8), 996–1004. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-10-0315>
- D'aes, J., Kieu, N. P., Léclère, V., Tokarski, C., Olorunleke, F. E., De Maeyer, K., ... Ongena, M. (2014). To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2282–2300. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12462>
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- Davey, H. M. (2002). Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods in Cell Science*. <https://doi.org/10.1023/A:1024106317540>
- De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2009). Chapter 6 Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. *Advances in Botanical Research*, 51, 223–281. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51006-3)
- Díaz, M., Herrero, M., García, L. A., & Quirós, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.013>
- Doherty, G. P., Bailey, K., & Lewis, P. J. (2010). Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation in *Bacillus Subtilis*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-303>
- Eberl, L., Schulze, R., Ammendola, A., Geisenberger, O., Erhart, R., Sternberg, C., ... Amann, R. (2006). Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. *FEMS Microbiology Letters*, 149(1), 77–83. <https://doi.org/10.1111/j.1574->

- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., & Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01424.x>
- Egener, T., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (1998). Use of Green Fluorescent Protein to Detect Expression of nif Genes of *Azoarcus* sp. BH72, a Grass-Associated Diazotroph, on Rice Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *11*(1), 71–75. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1998.11.1.71>
- F. Peypoux, J. . B. J. W. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Recent Advances in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803961-8.50001-4>
- FAO. (2018). *STATISTICSFAO 2017 WORLD FOOD AND AGRICULTURE STATISTICAL POCKETBOOK 2018*. Retrieved from <http://www.wipo.int/amc/en/mediation/rules>
- 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*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123615>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Flury, P., Aellen, N., Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Fataar, S., Metla, Z., ... Maurhofer, M. (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: Phylogenetic distribution and comparative genomics. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.5>
- Fragoso-Jiménez, J. C., Baert, J., Nguyen, T. M., Liu, W., Sassi, H., Goormaghtigh, F., ... Gosset, G. (2019). Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1073-5>
- Franke, G. C., Dobinsky, S., Mack, D., Wang, C. J., Sobottka, I., Christner, M., ... Rohde, H. (2007). Expression and functional characterization of gfpmut3.1 and its unstable variants in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Microbiological Methods*, *71*(2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.015>
- Gage, D. J., Bobo, T., & Long, S. R. (1996). Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Bacteriology*, *178*(24), 7159–7166. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7159-7166.1996>
- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>

- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... Toulmin, C. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Grayston, S. J., Vaughan, D., & Jones, D. (1997). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*, 5(1), 29–56. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00126-6)
- Grünberger, A. (2015). *Single cell analysis of microbial production strains in microfluidic bioreactors*. <https://doi.org/urn:nbn:de:hbz:82-rwth-2015-059827>
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- Hebisch, E., Knebel, J., Landsberg, J., Frey, E., & Leisner, M. (2013). High Variation of Fluorescence Protein Maturation Times in Closely Related Escherichia coli Strains. *PLoS ONE*, 8(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075991>
- Heim, R; Cubitt, AB; Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature Vol. 373, N° 6516*, 663–664.
- Heitefuss, R. (2009). Secondary Metabolites in Soil Ecology. *Journal of Phytopathology*, 158(3), 200–200. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01592.x>
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., ... Vater, J. (2004). Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by Bacillus subtilis A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1056-y>
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., & Khalid, A. (2009). *Chapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 102). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(09\)01005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(09)01005-0)
- Kaganovitch, E., Steurer, X., Dogan, D., Probst, C., Wiechert, W., & Kohlheyer, D. (2018). Microbial single-cell analysis in picoliter-sized batch cultivation chambers. *New Biotechnology*, 47, 50–59. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2018.01.009>
- Kiely, P. D., Haynes, J. M., Higgins, C. H., Franks, A., Mark, G. L., Morrissey, J. P., & O’Gara, F. (2006). Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microbial Ecology*, 51(3), 257–266. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9019-y>
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by Bacillus spp. . *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>
- Liu, G., Kong, Y., Fan, Y., Geng, C., Peng, D., & Sun, M. (2017). Whole-genome sequencing of Bacillus velezensis LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.018>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009a). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009b). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

- Ma, Z., Hoang Hua, G. K. H., Ongena, M., & Höfte, M. (2016). Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 896–904. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12454>
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., & Jolliet, O. (2002). Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00336-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00336-X)
- Marschner, P., Yang, C. H., Lieberei, R., & Crowley, D. E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1437–1445. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00052-9)
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. ., Crowley, D. ., Gajardo, G., & Mora, M. . (2010). MECHANISMS AND PRACTICAL CONSIDERATIONS INVOLVED IN PLANT GROWTH PROMOTION BY RHIZOBACTERIA. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 293–319. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>
- Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W., & Thomashow, L. S. (2006). Phenazine Compounds in Fluorescent. *Annual Review of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>
- Mcspadden Gardener, B. B. (2004). *The Nature and Application of Biocontrol Microbes: Bacillus spp. Ecology of Bacillus and Paenibacillus spp. in Agricultural Systems*.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Meena, S. K., Meena, R. K., Kumar, A., Verma, J. P., & Singh, N. P. (2017). Can bacillus species enhance nutrient availability in agricultural soils? In *Bacilli and Agrobiotechnology*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_16
- Mio R., R. ;Phillip., Spector, D. L., Lamond, A. I., Pfalzgraf, D., Kluth, L., Reiss, P., ... Tell, G. (2016). <cellBiologyByTheNumbersJuly2015.pdf>. *Antioxidants & Redox Signaling*, 43(2), 1–4. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5491>
- Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M. V., Caraballo-Rodríguez, A. M., Petras, D., ... Romero, D. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*, 10(1), 1919. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09944-x>
- Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1729–1739. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>
- Nicholson, W. L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8433-7>
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., & Thonart, P. (2011). Effet bénéfique de la communauté microbienne de la rhizosphère sur la croissance et la santé des plantes. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 15(2), 327–337. Retrieved from https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/113786/1/2011_Nihorimbere_Base.pdf
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Olorunleke, F. E., Kieu, N. P., De Waele, E., Timmerman, M., Ongena, M., & Höfte, M. (2017). Coregulation of the cyclic lipopeptides orfamide and sessilin in the biocontrol strain *Pseudomonas* sp. CMR12a. *MicrobiologyOpen*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.499>

- 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. (2007a). 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>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007b). 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>
- Parmar, N., & Dufresne, J. (2011). Beneficial Interactions of Plant Growth Promoting Rhizosphere Microorganisms. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19769-7_2
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J. M., De Vos, P., & Höfte, M. (2007). Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1007–1020. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03345.x>
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1), 63–77. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>
- 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>
- 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>
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01421-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01421-9)
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 191–195. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Santoyo, G., Del, M., Orozco-Mosqueda, C., & Govindappa, M. (2012). Biocontrol Science and Technology Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Santoyo, G., del Orozco-Mosqueda, M. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>

- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. N., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4), 519–537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>
- Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K., ... Borriss, R. (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 196(10), 1842–1852. <https://doi.org/10.1128/JB.01474-14>
- Shapiro, H. M. (2000). Microbial analysis at the single-cell level: Tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 42(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00167-6)
- Slepecky, R. A., & Hemphill, H. E. (2006). The Genus *Bacillus*—Nonmedical. In *The Prokaryotes* (pp. 530–562). https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_16
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008, March). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Trauth, S., & Bischofs, I. B. (2014). Ectopic integration vectors for generating fluorescent promoter fusions in *Bacillus subtilis* with minimal dark noise. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098360>
- Tsien, R. Y. (1998). *THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN*. *Annu. Rev. Biochem* (Vol. 67). Retrieved from www.annualreviews.org
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, and P. S. (2014). The Plant Microbiome. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 69, pp. 279–309). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417163-3.00011-1>
- Vadakkan, K., Choudhury, A. A., Gunasekaran, R., Hemapriya, J., & Vijayanand, S. (2018). Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.001>
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research* (pp. 243–254). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_2
- Vessey, J. K. (2003). *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. *Plant and Soil* (Vol. 255). Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1026037216893.pdf>
- Willenbrock, H., & Ussery, D. W. (2004). Chromatin architecture and gene expression in *Escherichia coli*. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-12-252>
- Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lubeck, M., & Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*, 51(5), 574–584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x>
- Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D. R., Bork, P., & Patil, K. R. (2015). Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421834112>
- Zhang, R., Vivanco, J. M., & Shen, Q. (2017). The unseen rhizosphere root–soil–microbe interactions for crop production. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.008>

9. Annexes

Annexe 1 : Photo des plantules des tomates



Annexe 1. Les plantules de tomates sont disposées par 5 sur une boîte de pétri carrée avec du milieu Hoagland

Annexe 2 : Test de corrélation de Pearson

Correlation Pearson r		A	B
		GA1- <i>acnA</i>	GA1- <i>gfpmut3</i>
	⊗	Y	Y
1	GA1- <i>acnA</i>	1.000	0.624
2	GA1- <i>gfpmut3</i>	0.624	1.000

Correlation P values		A	B
		GA1- <i>acnA</i>	GA1- <i>gfpmut3</i>
	⊗	Y	Y
1	GA1- <i>acnA</i>		0.571
2	GA1- <i>gfpmut3</i>	0.571	

Annexe 2. Test de corrélation de Pearson réalisé avec le logiciel Prism. Évaluation de la corrélation entre l'expression des *acnA* et *gfpmut3*

Annexe 3 : Welch t-test de comparaison des moyennes entre les deux sous-populations planctoniques

Comparaison des moyennes des deux populations			
Variable	Taille moyenne	Fluorescence moyenne	Nombre de cellules
P-valeur	0,008	0,006	0,0906

Annexe 3. Welch t-test de comparaison des moyennes des deux populations planctoniques réalisées avec le logiciel Prism

Annexe 4 : T-test de comparaison des moyennes entre les sous-populations en biofilm synthétique

Comparaison des populations en fonction de la variable taille			
	Pop sup.	Pop inf. gauche	Pop inf. droite
Pop sup		0,3109	0,028
Pop inf. gauche	0,3109		0,03
Pop inf. droite	0,028	0,03	

Comparaison des populations en fonction de la fluorescence			
	Pop sup.	Pop inf. gauche	Pop inf. droite
Pop sup		<0,0001	0,0003
Pop inf. gauche	<0,0001		0,0022
Pop inf. droite	0,0003	0,0022	

Comparaison des populations en fonction du nombre de cellules			
	Pop sup.	Pop inf. gauche	Pop inf. droite
Pop sup		0,0036	0,0021
Pop inf. gauche	0,0036		0,0989
Pop inf. droite	0,0021	0,0989	

Annexe 4. Résultats des t-tests de comparaison des moyennes entre les sous-populations en biofilm synthétique réalisées avec le logiciel Prism

Annexe 5 : t-tests de comparaison des moyennes entre les sous-populations en biofilm racinaire

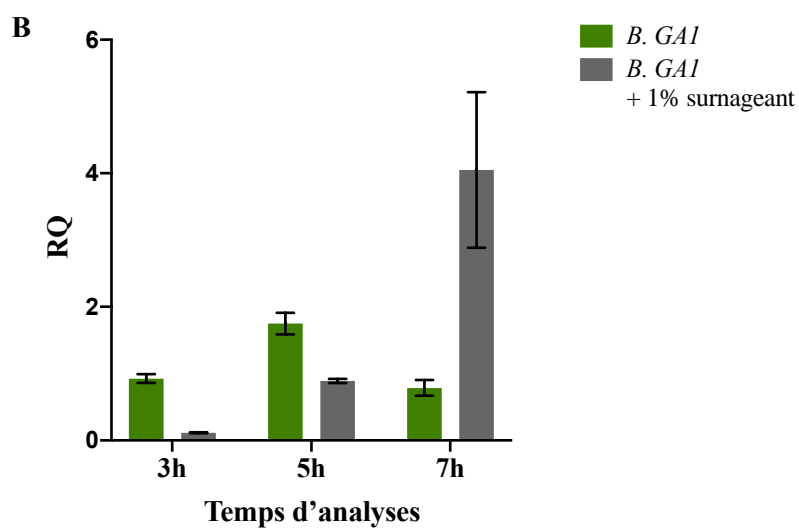
Comparaison des populations en fonction de la variable taille			
	Pop sup.	Pop inf. gauche	Pop inf. droite
Pop sup		0,013	0,0372
Pop inf. gauche	0,013		<0,0001
Pop inf. droite	0,0372	<0,0001	

Comparaison des populations en fonction de la fluorescence			
	Pop sup.	Pop inf. gauche	Pop inf. droite
Pop sup		<0,0001	<0,0001
Pop inf. gauche	<0,0001		<0,0001
Pop inf. droite	<0,0001	<0,0001	

Comparaison des populations en fonction du nombre de cellules			
	Pop sup.	Pop inf. gauche	Pop inf. droite
Pop sup		0,0202	<0,0001
Pop inf. gauche	0,0202		<0,0001
Pop inf. droite	<0,0001	<0,0001	

Annexe 5. Résultats des t-test de comparaison des moyennes entre les sous-populations des biofilm racinaires

Annexe 6 : Quantification relative du gène *gfpmut3* par RT-qPCR en fonction du type de culture.



Annexe 6. Quantification relative du gène *gfpmut3* en fonction du type de culture

Annexe 7 : Comparaison des cultures liquides selon deux facteurs (Temps & type de culture)

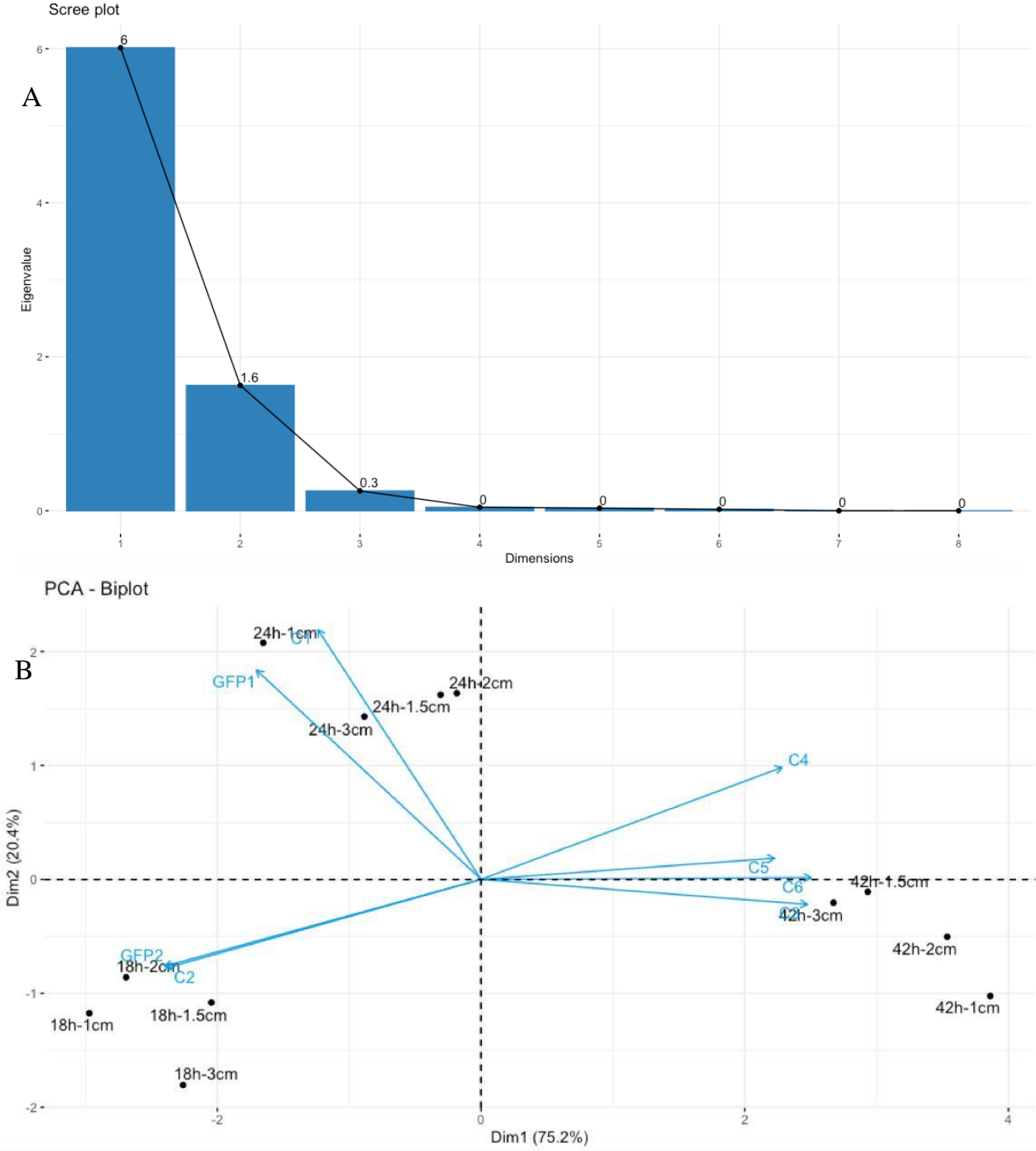
- Analyse de la variance à deux critères de classification

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Time x type de culture	8.245	<0.0001	****	Yes
Time	88.06	<0.0001	****	Yes
type de culture	3.349	<0.0001	****	Yes
Subject	0.04167	0.3731	ns	No

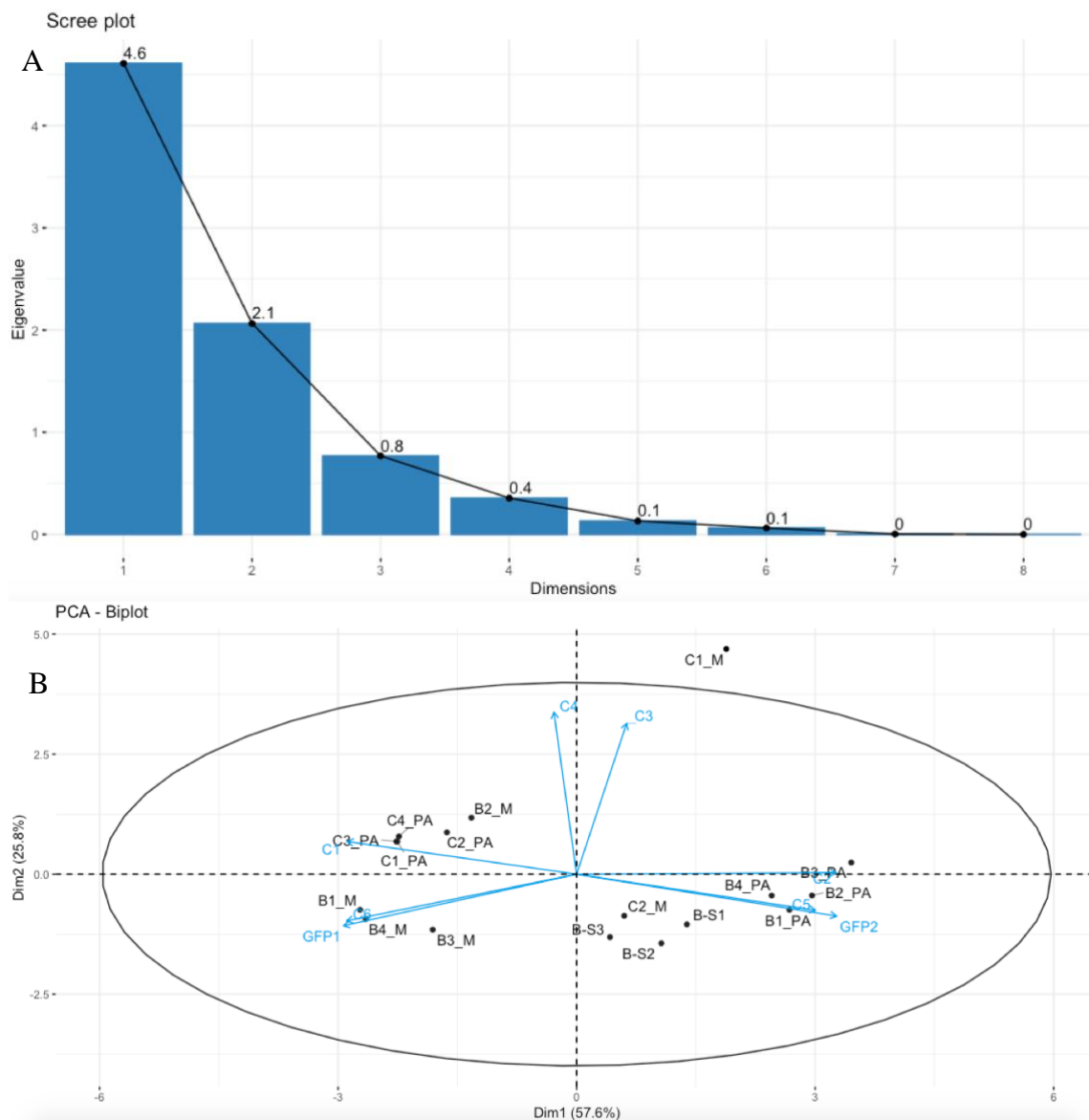
- T-test de comparaison des moyennes des cultures avec et sans surnageant

Comparaison du type de culture en chaque modalité du facteur temps	
Temps (heures)	p-valeur
3	0,0016
5	<0,0001
7	0,0005

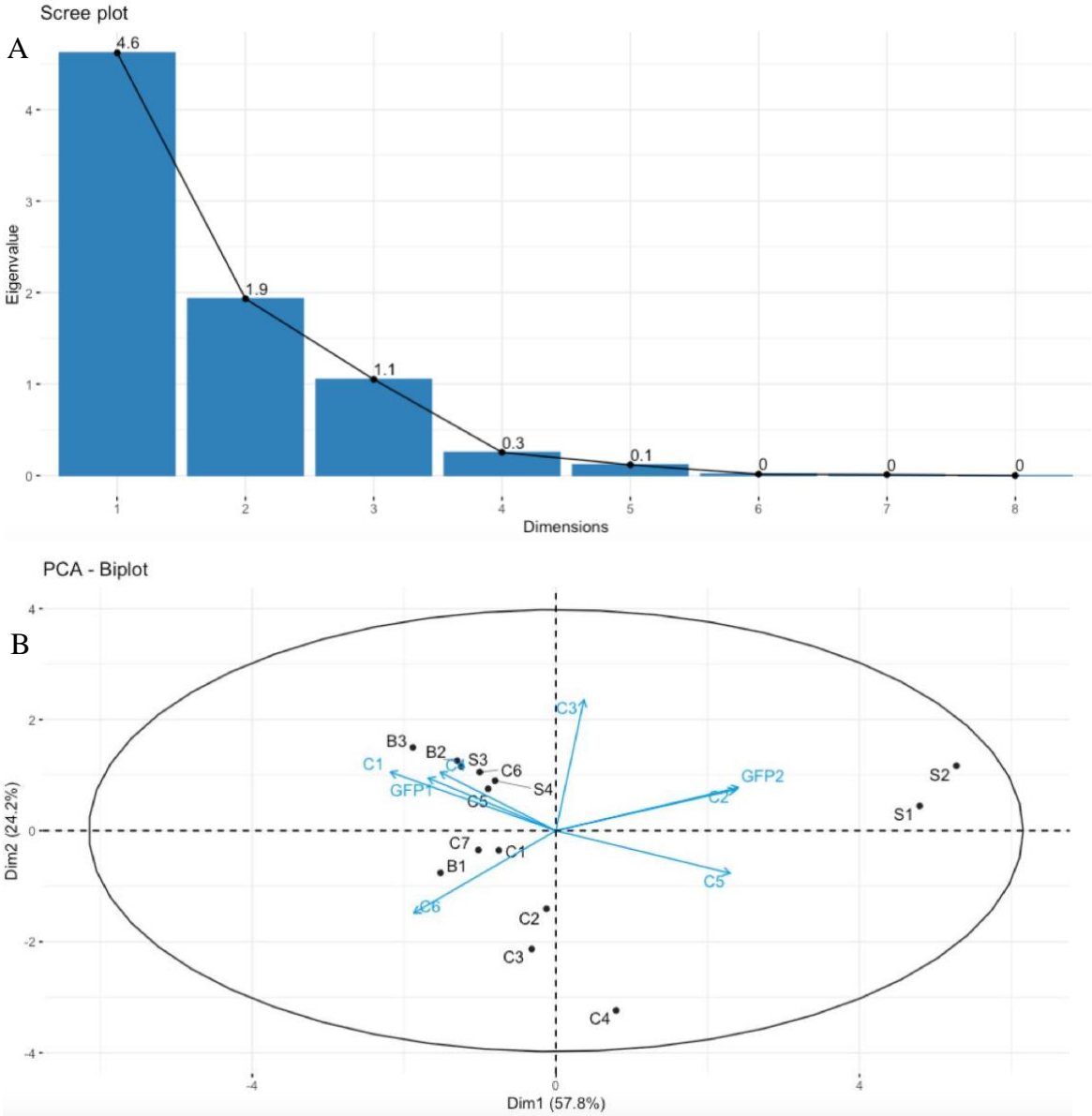
Annexe 8 : Impact du temps de culture sur la structure des colonies sur Agar



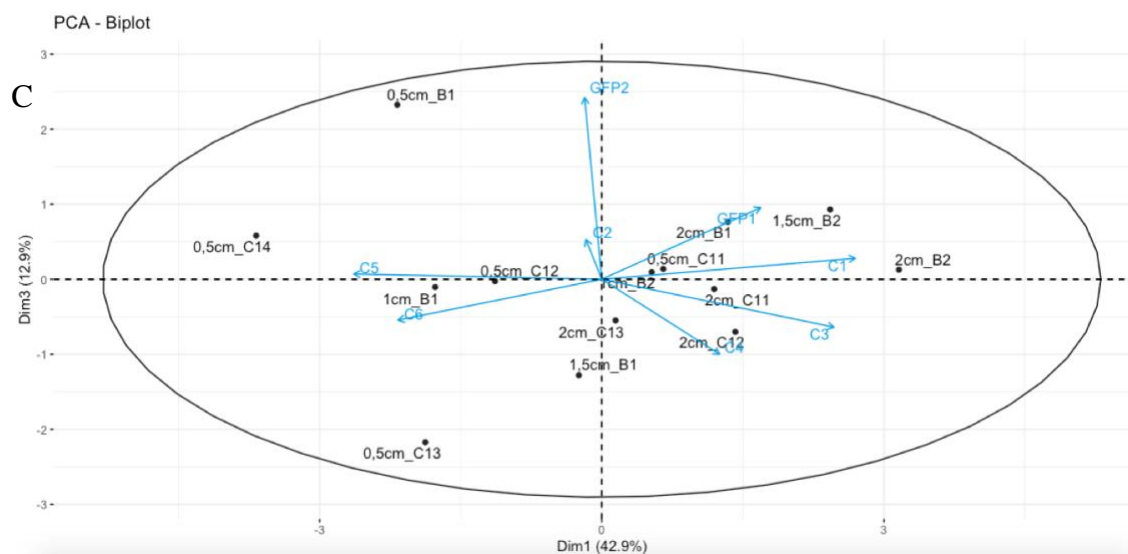
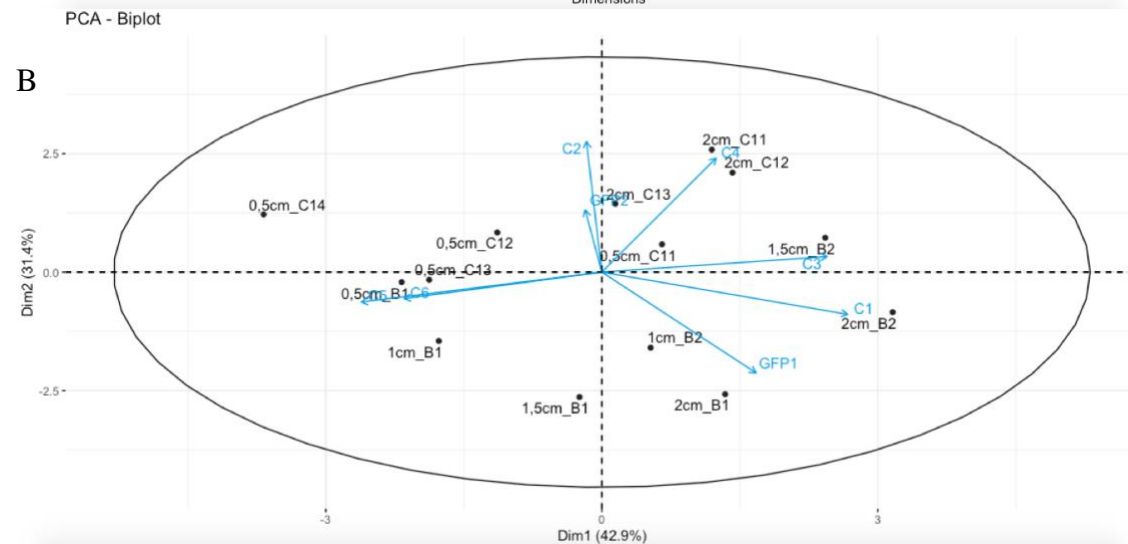
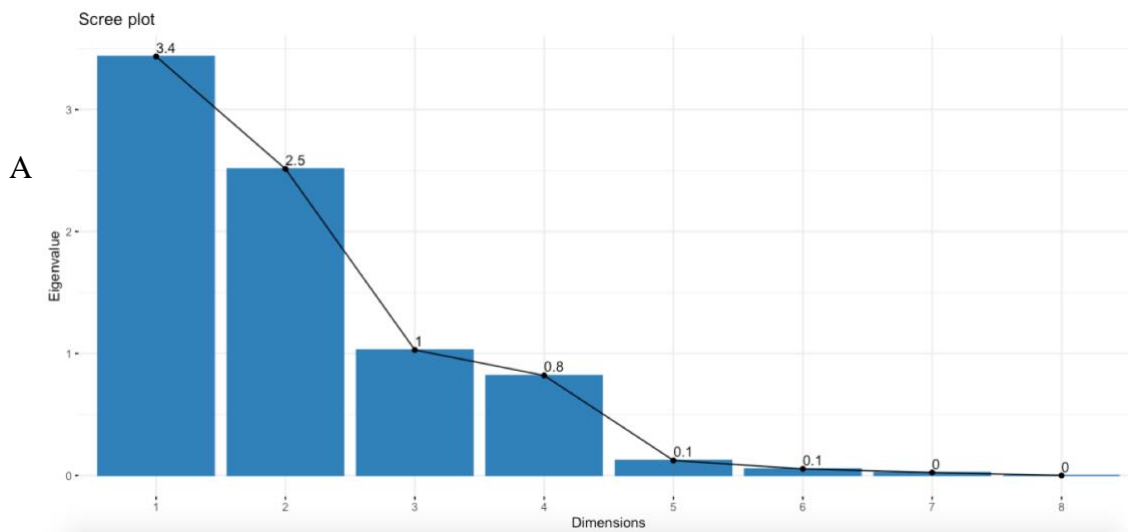
Annexe 9 : résultats de L'ACP sur l'influence des composés volatiles de *Pseudomonas* sp. CMR12a



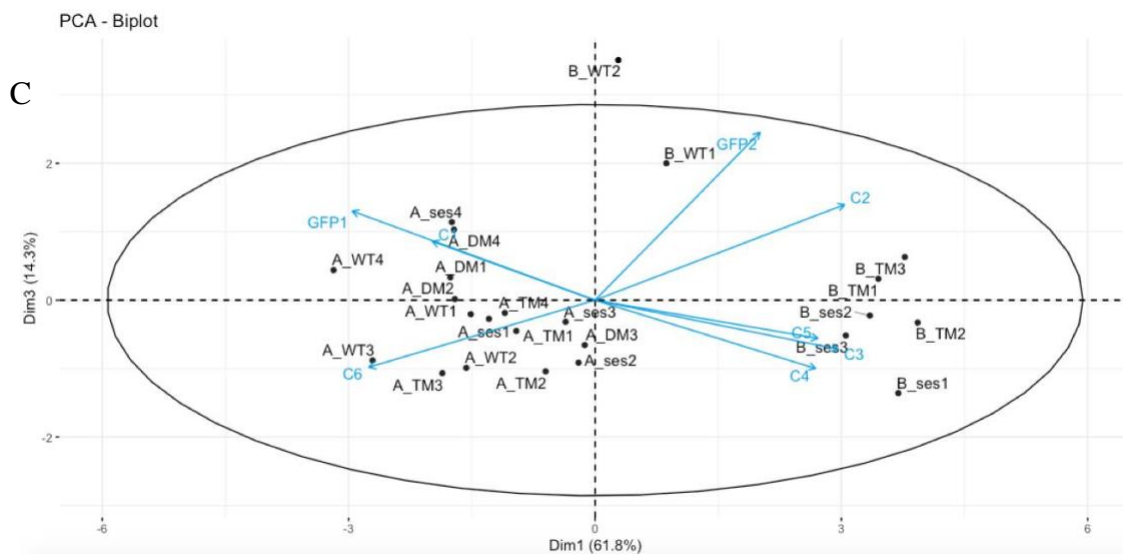
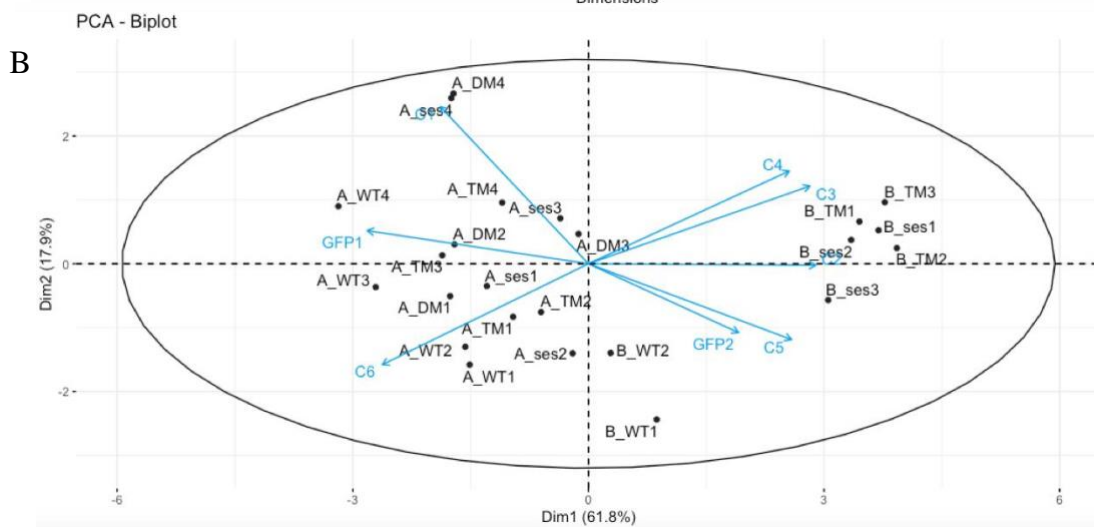
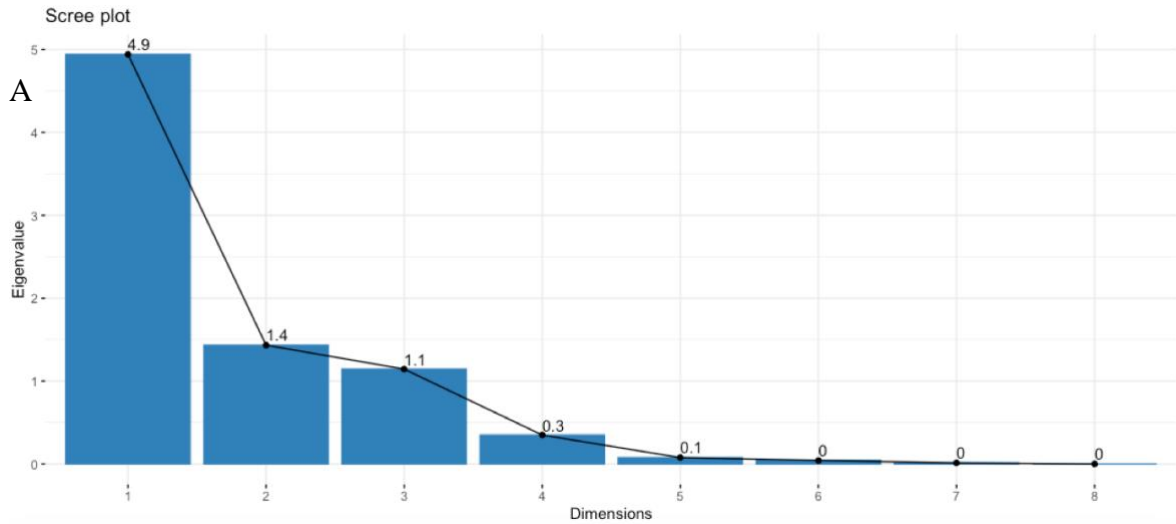
Annexe 10 : Résultats de L'ACP pour l'impact de la présence de *Pseudomonas* sp. CMR12a sur la structure de la population de *B. velezensis* GA1.



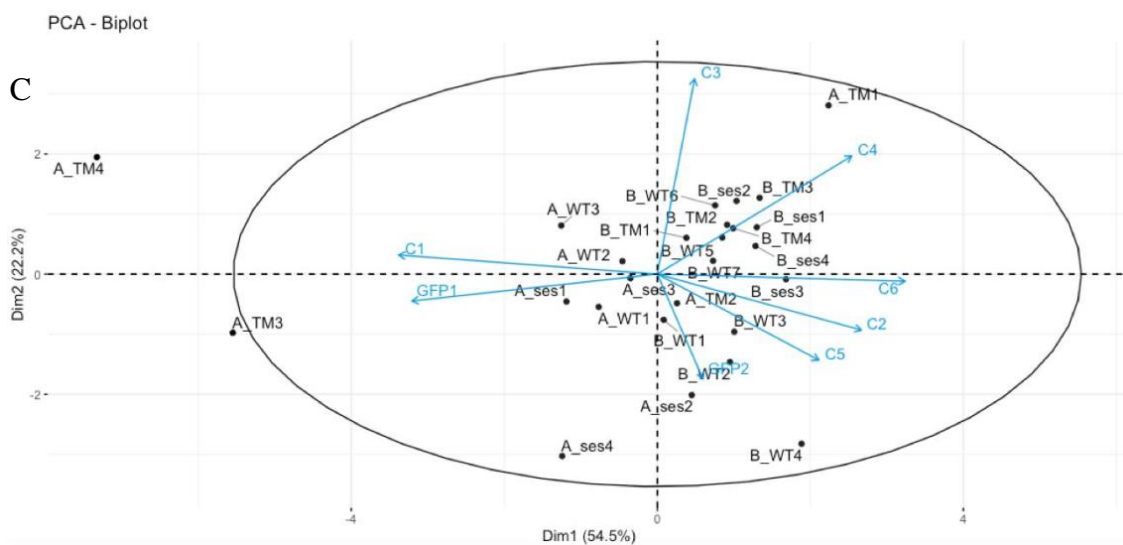
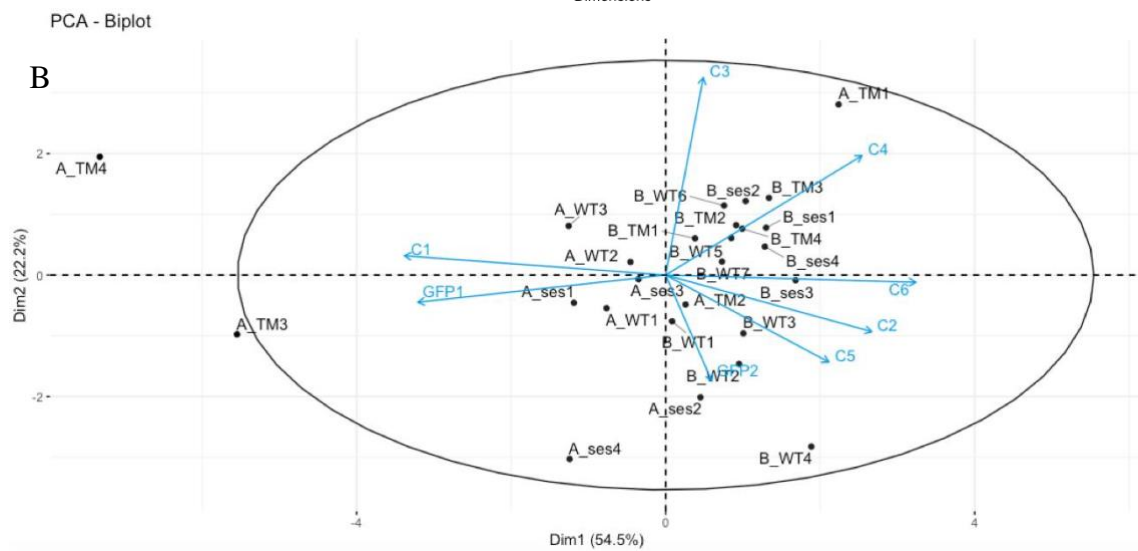
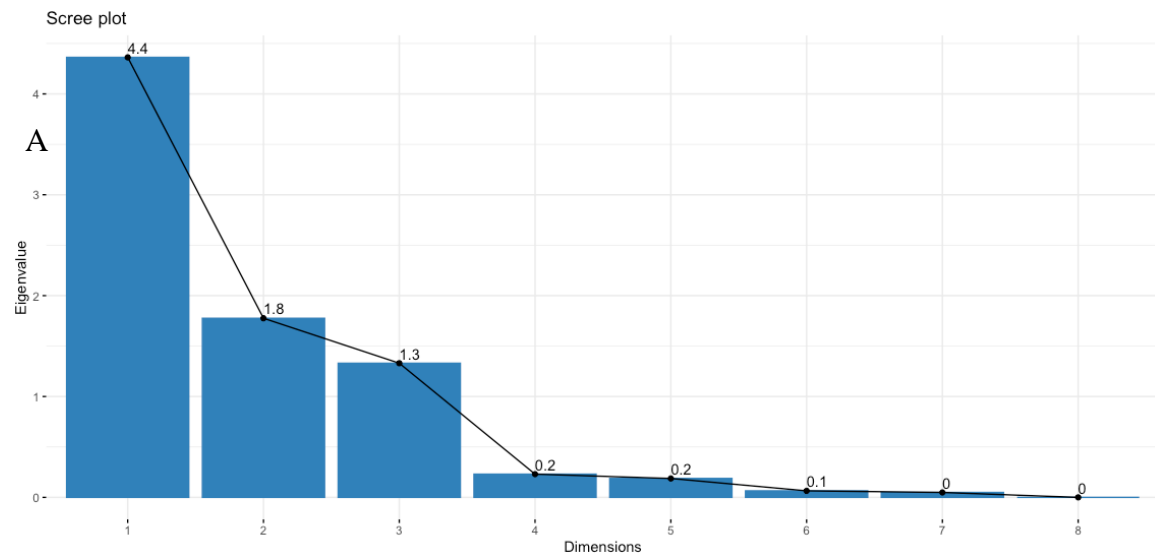
Annexe 11 : Résultats de l'ACP pour l'impact de la distance avec les colonies de *Pseudomonas* sp. CMR12a



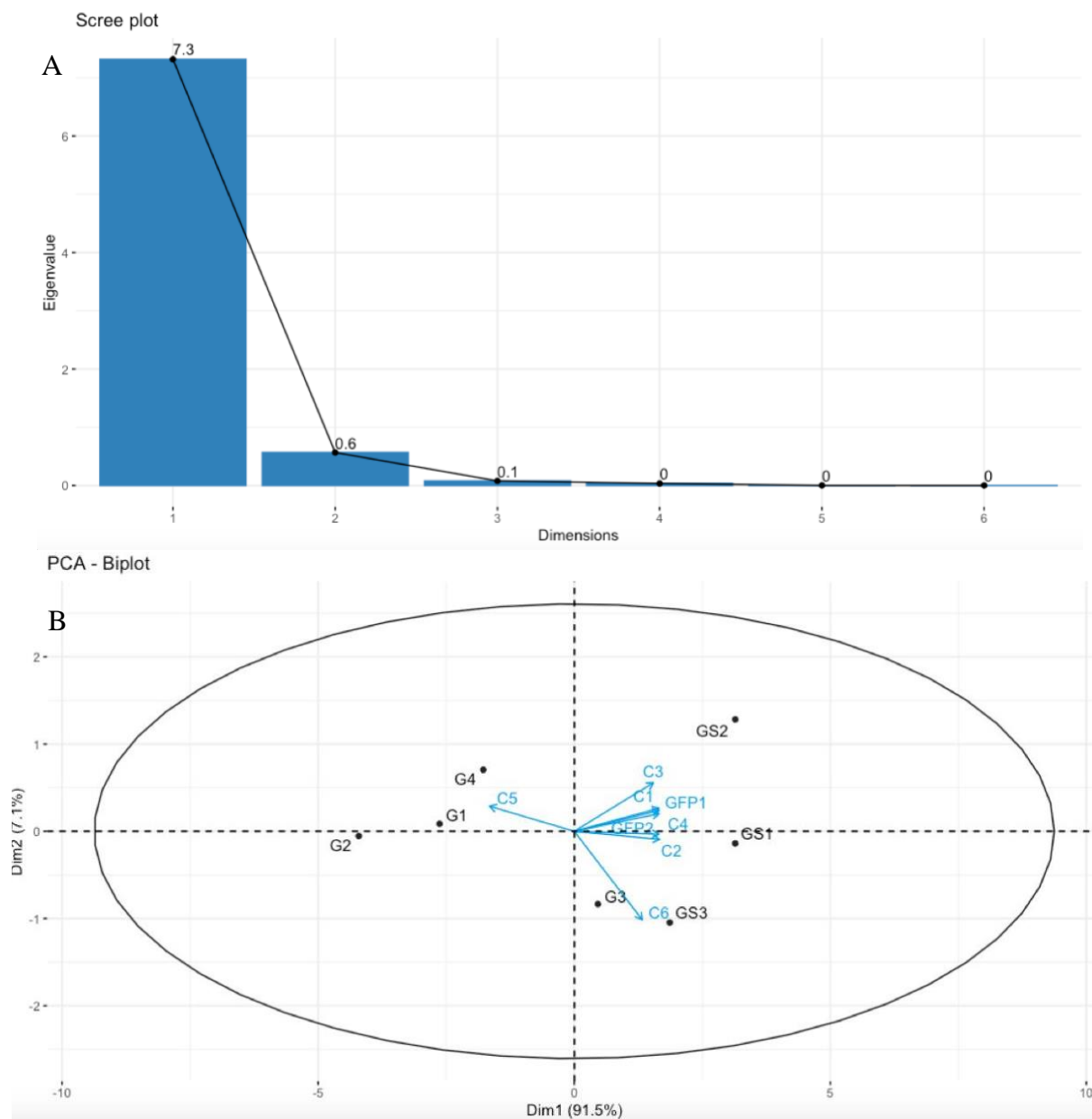
Annexe 13 : résultats de l'ACP pour la comparaison de l'impact des différents mutant en inoculation simultanée.



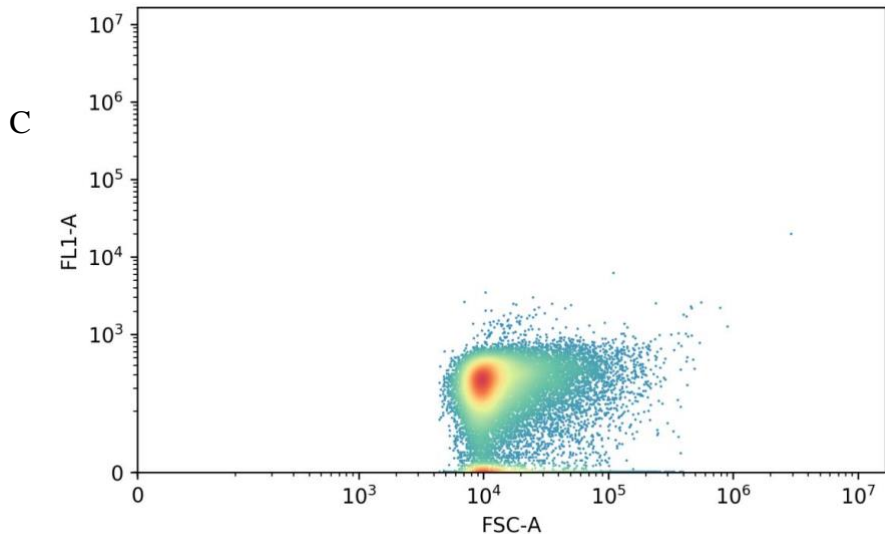
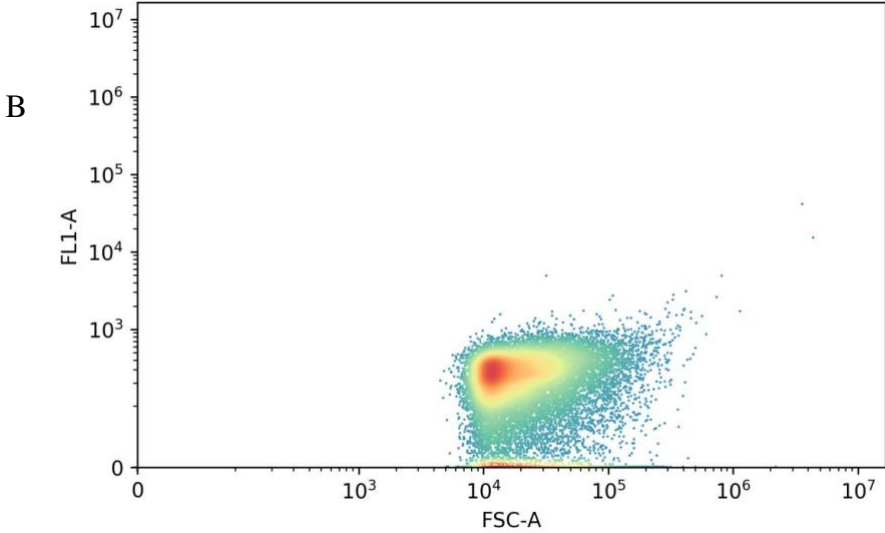
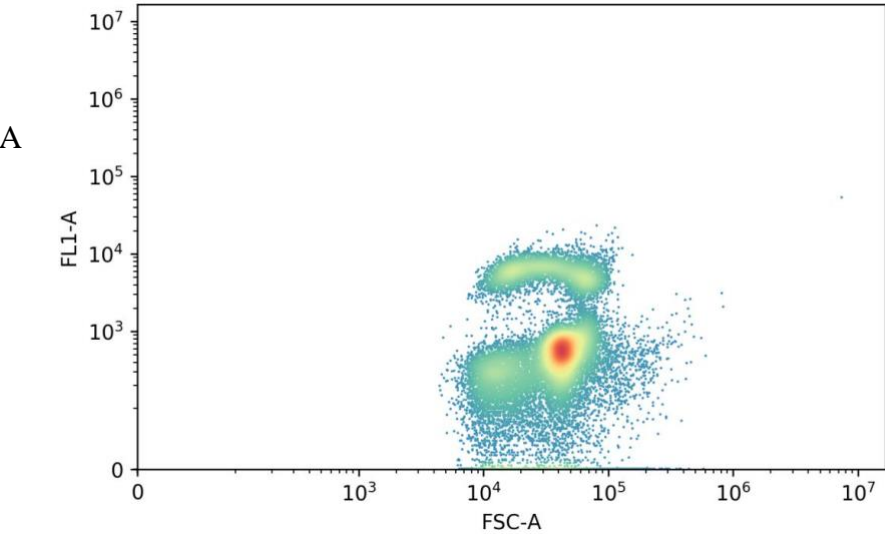
Annexe 14 : Résultats de l'ACP pour la comparaison de l'impact des différents mutant en inoculation différée.



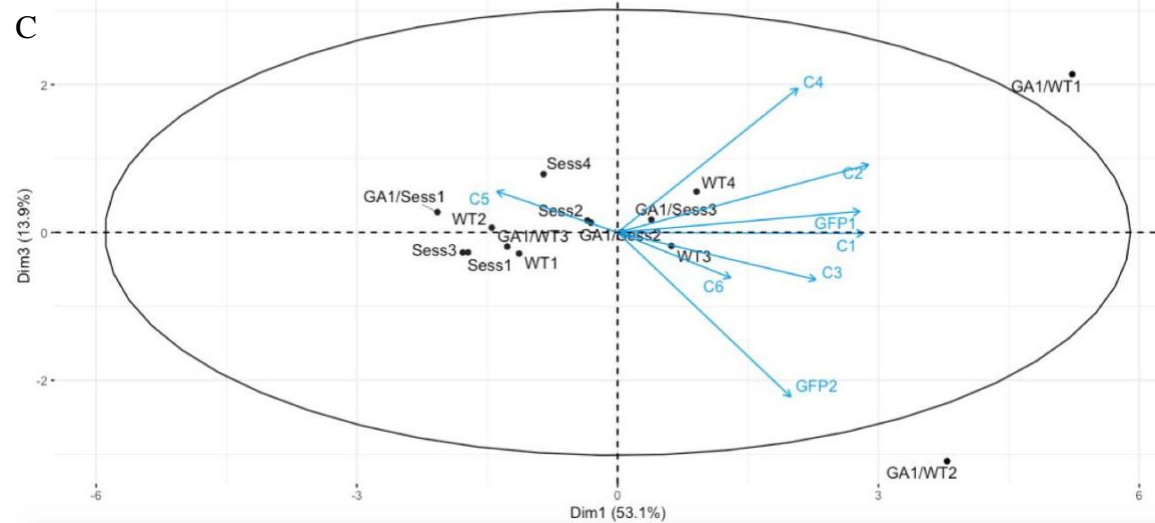
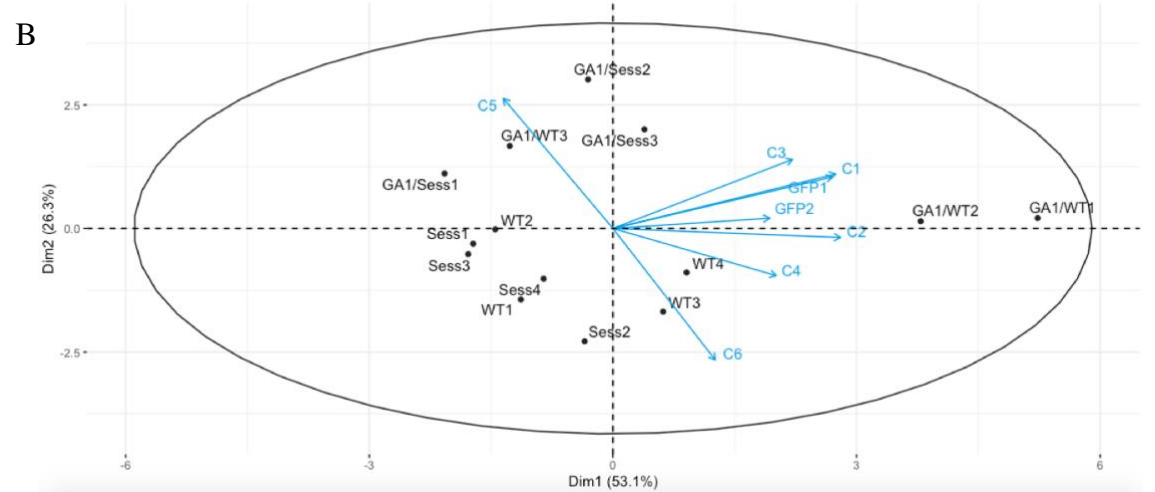
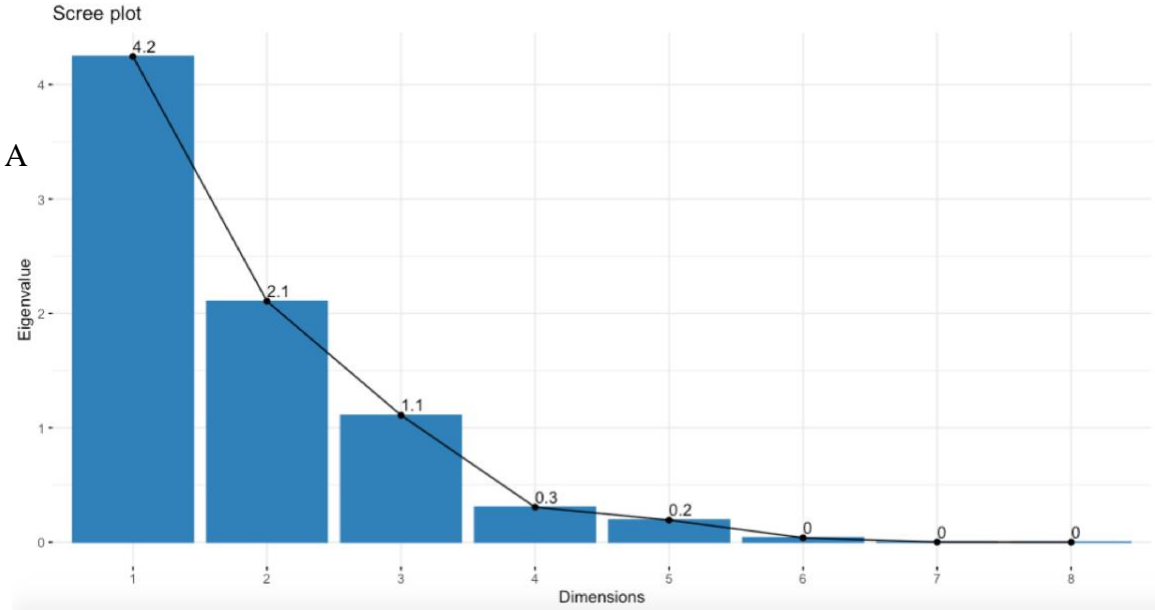
Annexe 15 : Résultats de l'ACP pour la compariaosn des empreinte de colonisation simple avec et sans surfactine



Annexe 16 : Comparaison des empreintes en inoculation simple et double



Annexe 17 : Résultats de l'ACP de comparaison des empreintes



Annexe 18 : Résultats de l'ACP de comparaison des inoculations simple et de compétition

