



Université de Lille – Sciences et Technologies
Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement

Thèse de Doctorat

Préparée à l'Institut Charles Viollette

par

Alexandre BRICOUT

Pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Lille

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Mise en évidence d'une forte diversité structurale de lipopeptides chez *P. syringae*, un complexe bactérien aux activités antifongiques prometteuses

Soutenue le 30 Juin 2020

Présidée par le Pr. Philippe Jacques

Membres du Jury :

Nicole Orange	Professeure, Univ. Rouen-Normandie, LMSM	Rapportrice
Claire Prigent-Combaret	Directrice de recherche, CNRS, Lyon	Rapportrice
Philippe Jacques	Professeur, Univ. Liège, MiPI	Examineur
Marc Bardin	Directeur de recherche, INRAE, Avignon	Examineur
Valérie Leclère	Professeure, Univ. Lille, ICV	Directrice de thèse
Alice Rochex	Maître de conférences, Univ. Lille, ICV	Co-encadrante
Maude Pupin	Maître de conférences (HDR), Univ. Lille, CRISAL	Invitée

Remerciements

Je remercie tout d'abord Nicole ORANGE et Claire PRIGENT-COMBARET d'avoir accepté de rapporter cette thèse ainsi que les autres membres du jury Maude PUPIN, Philippe JACQUES et Marc BARDIN.

Je remercie Pascal DHULSTER, directeur du laboratoire, pour avoir supporté ma candidature, m'avoir accueilli au sein du laboratoire et m'avoir permis de m'épanouir tout au long de mon parcours à l'Institut Charles Viollette.

Je remercie bien sûr mes encadrantes, Valérie LECLERE et Alice ROCHEX, qui m'ont accompagné, épaulé, supporté et encouragé tout au long de ce travail de thèse et grâce auxquelles j'ai beaucoup appris humainement, scientifiquement et professionnellement.

Je remercie l'ADEME d'avoir participé au financement de mon projet de thèse. Je remercie bien sûr Valérie PINEAU qui a su répondre à toutes mes questions d'ordre administratif et Céline SCHEUER, ma référente ADEME qui a pris le temps de suivre de près l'évolution de mon travail.

Un grand merci à l'équipe de l'INRAE d'Avignon de m'avoir généreusement fourni les souches utilisées dans ce travail et pour nos échanges sur les *P. syringae*, Cindy E. MORRIS, Philippe NICOT, Marc BARDIN, Charlotte CHANDEYSSON et Magali DUFFAUD.

Je remercie également les différents chercheurs avec qui j'ai pu discuter tout au long de ma thèse et qui m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances dans les différents domaines dans lesquels j'ai travaillé. Ainsi je remercie particulièrement Ali SIAH de m'avoir initié à la réalisation de tests *in planta* et pour son expertise sur la septoriose du blé, Sébastien LEMIERE pour son aide pour l'analyse statistique des résultats, Didier LECOUTURIER qui m'a apporté son aide pour les techniques d'ultrafiltration, PHILIPPE JACQUES, qui a partagé avec moi son immense savoir sur les lipopeptides et Matthieu DUBAN, le spécialiste de la biologie moléculaire.

Comment ne pas remercier Corinne BOISTEL et Cathy OUBLION, deux personnes inestimables, indispensables au bon fonctionnement du laboratoire. Corinne, je te remercie pour ton aide infaillible en microbiologie et ta bonne humeur permanente.

J'adresse un immense merci à Gabrielle CHATAIGNE pour m'avoir formé en spectrométrie de masse et pour tous tes conseils avisés sur le MALDI et l'HPLC-MS. A ce sujet, je remercie également Christophe FLAHAUT, Barbara DERACINOIS et Mickaël CHEVALIER, les spécialistes de la masse qui ont répondu à nombre de mes questions.

J'adresse un grand merci à tous les collègues de l'Institut Charles Viollette et particulièrement les collègues du bureau des doctorants, notamment Barbara, Justine, Sandy, Alice, Alexandre, Quentin, Ali, Adrien, etc. pour tous les échanges scientifiques que nous avons eus mais également pour tous les rires, sourires et sujets de discussion divers et variés qui ont rythmé ma vie au laboratoire. Soyez certains que je ne vous oublierai jamais.

Enfin, je remercie ma famille de m'avoir soutenu inconditionnellement au cours de ces années de thèse, dans les hauts, comme dans les bas. Je remercie particulièrement ma femme Anne BRICOUT qui a su m'écouter parler de lipopeptides à longueur de journées et qui m'a accompagné à chaque instant.

Résumé

L'utilisation de microorganismes ou de substances naturelles d'origine microbienne est une des solutions alternatives actuellement envisagées pour remplacer partiellement ou totalement les pesticides conventionnels.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer le potentiel de biocontrôle des souches de *P. syringae*. Une étude des lipopeptides produits par les souches du complexe *P. syringae* a d'abord été réalisée car ces molécules sont connues pour leurs activités antimicrobiennes puis l'activité antifongique des bactéries a été analysée. Pour y parvenir, une collection de 709 souches, représentative de la diversité phylogénétique du complexe *P. syringae*, a été explorée.

Grâce à une stratégie faisant intervenir des approches complémentaires de spectrométrie de masse et de bioinformatique, il a été possible de révéler une forte diversité structurale de lipopeptides : 61 lipopeptides dont 38 nouveaux, répartis dans les 5 familles décrites chez *P. syringae* (syringafactine, syringomycine, corpeptine, syringopeptines 22 et 25) ont été identifiés. Ces lipopeptides sont produits par 81,1% des souches de la collection étudiée, réparties dans 8 des 13 phylogroupes référencés au sein du complexe *P. syringae*.

Concernant leurs activités, 22,3% des souches ont montré une activité antifongique *in vitro*. Les lipopeptides, produits par 97,3% des souches antifongiques et retrouvés dans des surnageants de culture bruts et semi-purifiés, sont certainement responsables de ces activités. Enfin, deux souches ont montré, *in planta*, un potentiel intéressant de biocontrôle de la septoriose du blé, causée par le champignon phytopathogène *Zymoseptoria tritici*. Leurs surnageants de culture bruts et ultrafiltrés, ont montré des niveaux de protection du blé allant jusqu'à 62% par rapport au témoin d'infection.

Mots clés : *P. syringae*, lipopeptides, spectrométrie de masse, bioinformatique biocontrôle, activité antifongique

Abstract

The use of microorganisms or natural substances of microbial origin is one of the identified alternatives to partially or totally replace conventional pesticides.

In this context, the aim of this thesis was to evaluate the biocontrol potential of strains belonging to the *P. syringae* complex. First, the lipopeptides produced by strains of this bacterial complex have been studied because these molecules are known for their antimicrobial activities. Then, the antifungal activity of these bacteria was analysed. To reach this goal, a collection of 709 strains, representative of the phylogenetic diversity of the *P. syringae* complex, was explored.

Through a strategy involving complementary approaches of mass spectrometry and bioinformatics, it has been possible to reveal a huge lipopeptide structural diversity: in total, 61 lipopeptides, including 38 new, distributed into the 5 families described in the *P. syringae* complex (syringafactin, syringomycin, corpeptin, syringopeptins 22 and 25) have been identified. Lipopeptides producing strains, which represent 81.1% of the collection studied, belong to 8 of the 13 phylogroups referenced in the *P. syringae* complex.

Concerning their activities, 22.3% of the strains have shown an antifungal activity *in vitro*. Lipopeptides, which are produced by 97,3% of the antifungal strains and are also found in crude and ultra-filtered cell free supernatants, are certainly responsible for these activities. Finally, two strains have shown, *in planta*, an interesting potential for the biocontrol of Septoria tritici blotch of wheat caused by the fungus *Zymoseptoria tritici*. Their crude and ultra-filtered cell free supernatants have shown different wheat protection levels up to 62% compared to the infection control.

Key words: *P. syringae*, lipopeptides, mass spectrometry, bioinformatics, biocontrol, antifungal activity

Sommaire

Remerciements	1
Résumé.....	2
Abstract	3
Sommaire	4
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des abréviations.....	9
Introduction générale.....	12
Introduction bibliographique	14
1. Le biocontrôle, une alternative aux pesticides chimiques	15
1.1. Le marché du biocontrôle	16
1.2. Les 4 classes des produits de biocontrôle	16
1.3. Les bactéries et métabolites bactériens utilisés comme agents de biocontrôle antifongiques	18
2. Les <i>Pseudomonas</i>	22
2.1. Présentation du genre <i>Pseudomonas</i>	22
2.2. Le complexe <i>Pseudomonas syringae</i>	24
3. Les lipopeptides.....	28
3.1. La synthèse NRPS	30
3.2. Les lipopeptides de <i>Pseudomonas</i>	38
3.3. Les activités des lipopeptides de <i>Pseudomonas</i>	44
4. Le patho-système blé-septoriose	50
4.1. Le marché du blé tendre	50
4.2. La septoriose du blé	51
4.3. Moyens de luttés contre la septoriose.....	54
Objectifs de la thèse.....	56
Matériels et Méthodes.....	57
1. Souches et milieux.....	58
1.1. Diversité de la collection de <i>Pseudomonas</i>	58
1.2. Culture et conservation des souches	61
2. Production de lipopeptides en milieu liquide	62
2.1. Préparation des surnageants de culture	62
2.2. Semi-purification par ultrafiltration/diafiltration.....	62
3. Détection et analyse de la structure chimique des lipopeptides.....	63

3.1.	Analyses MALDI-ToF	63
3.2.	Analyses HPLC-ESI-MS	65
4.	Analyse des génomes bactériens	66
4.1.	Extraction et séquençage de l'ADN génomique.....	66
4.2.	Outils bioinformatiques pour l'annotation des génomes	66
5.	Tests d'activités antifongiques <i>in vitro</i>	68
5.1.	Champignons cibles.....	68
5.2.	Activité antifongique des colonies bactériennes	69
5.3.	Activité antifongique des surnageants de culture.....	70
6.	Tests <i>in planta</i>	71
6.1.	Préparation du blé.....	72
6.2.	Tests de phytotoxicité	73
6.3.	Tests de protection.....	73
7.	Tests statistiques	74
7.1.	Tableaux de contingence.....	74
7.2.	Tests de significativité	74
	Résultats et Discussion	75
	Chapitre 1 : Diversité des lipopeptides produits par les souches du complexe <i>P. syringae</i>	76
1.1.	Diversité des lipopeptides produits.....	78
1.2.	Identification de nouveaux variants de syringafactines.....	85
1.3.	Identification de nouvelles syringomycines	93
1.4.	Identification de nouvelles sous-familles dans les familles à longues chaînes d'acides aminés	100
1.5.	Relations entre lipopeptides produits et classification phylogénétique des souches du complexe <i>P. syringae</i>	113
	Chapitre 2 : Evaluation de l'activité antifongique des souches du complexe <i>P. syringae</i>	122
2.1.	Evaluation, <i>in vitro</i> , de l'activité antifongique des souches du complexe <i>P. syringae</i>	123
2.2.	Etude des relations entre activité antifongique et production de lipopeptides.....	128
2.3.	Relations entre activités antifongiques et classification phylogénétique des souches du complexe <i>P. syringae</i>	134
2.4.	Evaluation, <i>in planta</i> , du potentiel de biocontrôle des souches du complexe <i>P. syringae</i>	137
	Discussion générale	143
	Conclusion et perspectives.....	148
	Références bibliographiques	153
	Communications scientifiques	166

Liste des figures

Figure 1 : Cycle des pesticides	15
Figure 2 : Arbre phylogénétique construit à partir de l'analyse des séquences des gènes de ménage <i>cts</i> , <i>gyrB</i> , <i>gapA</i> et <i>rpoD</i> de 216 souches de <i>P. syringae</i> (Berge et al., 2014)	25
Figure 3 : Structures de lipopeptides produits par des souches du complexes <i>P. syringae</i>	28
Figure 4 : Réaction d'activation du monomère par le domaine A	31
Figure 5 : Réaction de fixation du monomère au domaine T	32
Figure 6 : Réaction de catalyse de la liaison peptidique entre deux monomères par le domaine C	32
Figure 7 : Réaction de libération du peptide néoformé par le domaine Te	33
Figure 8 : Biosynthèse de la cichofactine A chez <i>P. cichorii</i> SF1-54	34
Figure 9 : Biosynthèse de la syringomycine E chez <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	36
Figure 10 : Structure des molécules types de chaque famille de lipopeptides de <i>Pseudomonas</i> (adapté de Geudens et Martins, 2018)	39
Figure 11 : Structures des lipopeptides de la famille des syringafactines	40
Figure 12 : Structures des lipopeptides de la famille des syringomycines	41
Figure 13 : Structure des lipopeptides des familles des corpeptines (A), des syringopeptines 22 (B) et des syringopeptines 25 (C)	43
Figure 14 : Fonctions biologiques des lipopeptides de <i>Pseudomonas</i>	44
Figure 15 : Répartition de la production de blé mondiale par continent (Source FAO, 2018)	50
Figure 16 : Feuille de blé infectée par le champignon phytopathogène <i>Zymoseptoria</i> (ARVALIS 2013)	52
Figure 17 : Cycle infectieux de <i>Zymoseptoria tritici</i> sur blé (Ponomarenko et al. 2011)	53
Figure 18 : Cultures de <i>Botrytis cinerea</i> de 72h à 25°C (A) et 10 jours, 18°C, alternance 16h jour/ 8h nuit (B)	69
Figure 19 : Photographies illustrant le protocole de préparation des plants de blé pour les tests de phytotoxicité (A) et les tests de protection des plantes (B)	72
Figure 20 : Exemples de masses détectées au MALDI-ToF et assignées à différents lipopeptides des 5 familles décrites chez <i>P. syringae</i>	79
Figure 21 : Chromatogramme des ions totaux (TIC) en LC-MS/MS du surnageant de culture SRM de la souche <i>P. cichorii</i> CFBP4407 concentré 30 fois par ultrafiltration	85
Figure 22 : Détermination de la structure des cichofactines A et B et des 4 nouveaux variants de cichofactine par une analyse combinée LC-MS/MS et bioinformatique	89
Figure 23 : Régions génomiques responsables de la production des molécules assignées aux syringomycines chez <i>P. syringae</i> CVB0031, syringotoxines chez <i>P. syringae</i> CCV0214, syringostatine chez <i>P. syringae</i> CC1466, pseudomycines chez <i>P. cichorii</i> CFBP4407, syringosine chez <i>P. syringae</i> USA0035 et syringomycines A1, E, G chez <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	94

Figure 24 : Structures proposées pour les lipopeptides de la famille des syringomycines produits par les souches étudiées	98
Figure 25 : Approche combinée de spectrométrie de masse et de bioinformatique pour la caractérisation structurale de la syringopeptine 22CCV-A de m/z 2146,3 [M+H]⁺	103
Figure 26 : Comparaison des structures des nouveaux lipopeptides de la famille des syringopeptines 22 caractérisés (Syringopeptines 22CVB-A, 22CVB-B et Syringopeptines 22-CCVA, 22CCV-B) à celles des lipopeptides de la famille des syringopeptine 22 connus (Syringopeptine 22A/22B (Ballio et al. 1991), Syringopeptine 22phVA/phVB (Grgurina et al. 2002), Syringopeptines 508A, 508B (Grgurina et al. 2005), Syringopeptines SC1, SC2 (Isogai et al. 1995))	105
Figure 27 : Comparaison des structures des nouveaux lipopeptides de la famille des syringopeptines 25 caractérisés (Syringopeptine 25UB-A, Syringopeptines 25TA-A, 25TA-B, Syringopeptine 25USA-A et Syringopeptines 25CVB-A, 25CVB-B) à celles des lipopeptides de la famille des syringopeptines 25 connus (Syringopeptines 25A, 25B (Ballio et al. 1991), Syringopeptine 25A [Phe25] (Scaloni et al. 1997))	107
Figure 28 : Comparaison des structures des nouveaux lipopeptides de la famille des corpeptines caractérisés (Cichopeptine GAW-C et Cichopeptines 83-A, 83-B) à celles des lipopeptides de la famille des corpeptines connus (Corpeptines A, B (Emanuele et al. 1998), Thanapeptine (Van Der Voort et al. 2015), Sclérosine (Berry et al. 2012), Nunapeptine (Michelsen et al. 2015), Cichopeptines A, B (Huang et al. 2015), Cichorinotoxine (Komatsu et al. 2019), Braspeptine (Zhao et al. 2019))	110
Figure 29 : Co-production de lipopeptides de différentes familles par les souches étudiées	113
Figure 30 : Sous-familles de lipopeptides produites par des souches du complexe <i>P. syringae</i> appartenant à différents groupes phylogénétiques (adapté de Berge et al., 2014)	116
Figure 31 : Activité antifongique de la souche <i>P. syringae</i> CCV0214 contre les 3 champignons ciblés : A) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, B) <i>Botrytis cinerea</i>, C) <i>Zymoseptoria tritici</i>	123
Figure 32 : Activité antifongique du surnageant de culture de la souche <i>P. cichorii</i> CFBP4407 dilué au demi contre <i>Botrytis cinerea</i> (A) et <i>Zymoseptoria tritici</i> (B)	125
Figure 33 : Lipopeptides produits par les souches antifongiques	129
Figure 34 : Chromatogramme des ions totaux (TIC) en LC-MS des surnageants de culture TSB des souches de <i>P. cichorii</i> (A) et <i>P. syringae</i> (B)	131
Figure 35 : Chromatogramme des ions totaux (TIC) en LC-MS des surnageants de culture TSB des souches de <i>P. cichorii</i> (A) et <i>P. syringae</i> (B), purifiés et concentrés par ultrafiltration (10X)	132
Figure 36 : Absence de phytotoxicité des surnageants de culture bruts et semi-purifiés (concentrés deux fois) des souches de <i>P. cichorii</i> et <i>P. syringae</i>, observée à 10 jours après traitement	137
Figure 37 : Exemples de feuilles de blé protégées par un surnageant de culture	139
Figure 38 : Moyennes des surfaces foliaires infectées après traitement du blé avec les surnageants des souches de <i>P. cichorii</i> et <i>P. syringae</i>	140
Figure 39 : Moyennes des densités de pycnides, notées de 0 à 5, observées sur les plants de blé après traitement avec les surnageants des souches de <i>P. cichorii</i> et <i>P. syringae</i>	141

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches bactériennes autorisées en France et/ou aux Etats-Unis pour lutter contre les maladies fongiques de différentes cultures (source e-phy et EPA)	19
Tableau 2 : Liste des souches de <i>Pseudomonas</i> utilisées dans cette étude	58
Tableau 3 : Conditions chromatographiques pour l'éluion et la séparation des molécules	65
Tableau 4 : Caractéristiques des champignons cibles	68
Tableau 5 : Volumes de surnageants purs à ajouter aux milieux PDA en fonction de la dilution du surnageant à tester	70
Tableau 6 : Récapitulatif des assignations sur les masses détectées par MALDI-ToF sur des colonies bactériennes	80
Tableau 7 : Liste des ions b et y obtenus après fragmentations des ions de m/z [M+H] ⁺ 1109,8, 1137,9, 1123,8, 1151,8, 1135,8 et 1163,8 correspondant aux formes protonées respectives des cichofactines A et B putatives et des variants 1, 2, 3, 4.....	86
Tableau 8 : Prédiction des acides aminés incorporés par les domaines A avec le programme NRPSPredictor2 et le code de Stachelhaus et prédiction de leur isomérisation avec le programme NaPDos	88
Tableau 9 : Récapitulatif des différentes sous-familles de la famille des syringomycines et leurs variants, produits par les souches étudiées	93
Tableau 10 : Pourcentages d'homologies entre les protéines identifiées chez les souches étudiées et les protéines SyrP ; SyrB2 et SyrC, identifiées chez <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D.....	96
Tableau 11 : Récapitulatif des différentes masses produites par les souches étudiées, assignées aux variants de différentes sous-familles de lipopeptides	100
Tableau 12 : Liste des ions y et b obtenus après fragmentations de l'ion de m/z 2146,3 [M+H] ⁺ ..	101
Tableau 13 : Détection des gènes impliqués dans la synthèse de lipopeptides de différentes familles chez des souches du complexe <i>P. syringae</i>	115
Tableau 14 : Activités antifongiques des colonies contre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Zymoseptoria tritici</i>	124
Tableau 15 : Activités antifongiques des surnageants de culture contre A) <i>Botrytis cinerea</i> et B) <i>Zymoseptoria tritici</i>	126
Tableau 16 : Pourcentages de souches actives contre les différents champignons ciblés, au sein des différents groupes phylogénétiques du complexe <i>P. syringae</i>	135

Liste des abréviations

4-Cl-Thr	4-Chloro-Thréonine
AA	Acide Aminé
ADN	Acide DesoxiriboNucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATP	Adénosine TriPhosphate
CID	Collision Induced Dissociation
CMC	Concentration Micellaire Critique
CRPM	Code Rural et de la Pêche Maritime
Dab	Acide 2,4-diaminobutyrique
DGAL	Direction Générale de L'Alimentation
dhAbu	Acide 2,3-dehydro-2-aminobutyrique
DMI	Demethylation Inhibitor
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène-Diamine-TétraAcétique
ESI-Q/ToF	ElectroSpray Ionisation-Quadrupole/Time of flight
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBMA	International Biocontrol Manufacturers' Association
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LC-MS/MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (fragmentation)
m/z	Rapport masse/charge
MALDI-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
MLSA	Multi Locus Sequence Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NaPDoS	Natural Product Domain Seeker
NRPS	Non Ribosomal Peptide Synthetase

OAA	Organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
OH-Asp	Acide HydroxyAspartique
PDA	Potato Dextrose Agar
PES	Polyethersulfone
PG	Phylogroupe
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
QTL	Quantitative Trait Loci
RSI = ISR	Résistance Systémique Induite = Induced Systemic Resistance
rpm	rotation par minute
SDHI	Succinate Dehydrogenase Inhibitor
SRM	Syringomycin Recovery Medium
SRMAgar	Syringomycin Recovery Medium Agar
SVM	Support Vector Machine
TFA	Acide Trifluoroacétique
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
Tween 20	polyoxyethylene-sorbitan monolaurate
US.EPA	United States Environmental Protection Agency
WLIP	White Line Inducing Principle

- **Abréviation des lipopeptides**

CF	Cichofactine
CLP	Cyclic Lipopeptide
CP	Cichopectine
CT	Cichorinotoxine
PM	Pseudomycine
SF	Syringafactine
SN	Syringosine
SP	Syringopeptine
SR	Syringomycine
SS	Syringostatine
ST	Syringotoxine

- **Domaines des synthétases NRPS**

Domaine A	Domaine d'Adénylation
Domaine C	Domaine de Condensation
Domaine C/E	Domaine de Condensation/Epimérisation
Domaine ^DCL	Domaine qui réalise une liaison peptidique entre un monomère de conformation D et un monomère de conformation L
Domaine E	Domaine d'Epimérisation qui épimérise un monomère de conformation L vers la conformation D
Domaine ^LCL	Domaine qui réalise une liaison peptidique entre deux monomères de conformation L
Domaine T	Domaine de Thiolation
Domaine Te	Domaine de Thioestérase
PCP	Peptidyl Carrier Protein (= domaine T)

Introduction générale

Les grandes cultures sont attaquées par de nombreux bio-agresseurs, les principaux sont les champignons phytopathogènes qui provoquent des pertes de rendement aux conséquences économiques sérieuses. Le blé, deuxième culture mondiale après celle du maïs n'est pas épargnée. Elle est touchée par de nombreuses maladies cryptogamiques, la septoriose du blé, causée par *Zymoseptoria tritici* étant la plus dommageable. En France, cette maladie génère des pertes de rendement allant jusqu'à 5 tonnes de blé par hectare, le préjudice financier pouvant atteindre 700 millions d'euros par an (Fones and Gurr 2015). Aujourd'hui, la lutte contre cette affection repose essentiellement sur l'utilisation de variétés de blé résistantes et sur l'emploi de pesticides conventionnels. Ces derniers, bien qu'efficaces, font face à l'apparition de résistances et sont de plus en plus décriés car à l'origine de risques importants pour l'environnement, la biodiversité et la santé humaine. Certains de ces produits, tels que l'époxiconazole ou le chlorothalonil, jusqu'ici fréquemment utilisés pour lutter contre la septoriose du blé, sont, pour ces raisons, progressivement retirés du marché. Il devient donc crucial de mettre en place de nouvelles alternatives, en compléments ou en substitutions des pesticides chimiques, qui soient plus respectueuses de l'environnement et qui répondent à la demande émergente de produits plus sains, par les producteurs et les consommateurs. L'une des solutions envisagées est l'utilisation d'agents de biocontrôle tels que les microorganismes et les substances naturelles, qui sont généralement moins toxiques et plus biodégradables que les produits chimiques de synthèse. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun bio-fongicide d'origine microbienne, disponible pour lutter contre la septoriose du blé.

Les lipopeptides, molécules amphiphiles constituées d'une chaîne d'acide gras hydrophobe, liée à une chaîne peptidique hydrophile sont des candidats prometteurs. Ces métabolites secondaires sont produits par voie non ribosomique, par des complexes multienzymatiques appelés NRPSs (Non Ribosomal Peptide Synthetases). De ce mode de synthèse résulte une grande diversité structurale, les lipopeptides pouvant être cycliques ou linéaires, composés d'acides aminés protéinogènes et non protéinogènes et pouvant avoir des acides gras de différentes tailles, et différents niveaux de saturation et d'hydroxylation. Certains lipopeptides produits par les souches du complexe *P. syringae* ont montré d'intéressantes activités antifongiques, notamment contre des champignons responsables de maladies cryptogamiques d'intérêt économique tels que *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise sur vigne,

tomate, laitue ou *Pythium ultimum* responsable de la fonte des semis (Lavermicocca et al. 1997; Kawasaki et al. 2016).

Malgré ces activités antifongiques intéressantes, les *P. syringae* ont peu été étudiées pour une utilisation en tant qu'agents de biocontrôle. Cela s'explique d'une part, par le fait que ces bactéries, souvent exclusivement considérées comme des pathogènes des végétaux, ont une connotation négative. D'autre part, la diversité des lipopeptides, considérés comme les principales molécules responsables de leurs activités antifongiques, est encore peu connue. Notons également que leurs activités antifongiques, connues contre divers champignons phytopathogènes, est très peu documentée en ce qui concerne *Zymoseptoria tritici*.

L'objectif de ces travaux de thèse a été d'évaluer le potentiel de biocontrôle des souches du complexe *P. syringae*. La première étape a consisté à explorer et élucider la diversité structurale des lipopeptides au sein de ce complexe bactérien. La deuxième étape s'est focalisée sur une évaluation de l'activité antifongique des souches du complexe *P. syringae* en faisant le lien avec la production de lipopeptides.

Introduction bibliographique

1. Le biocontrôle, une alternative aux pesticides chimiques

En 2016, le marché mondial des produits de protection des plantes incluant les pesticides conventionnels et les produits de biocontrôle s'élevait à 53582 millions de dollars de produits vendus. Les pesticides chimiques représentent 94,4% de ce marché (Phillips McDougall 2018). Ces produits phytosanitaires, massivement utilisés, sont disséminés dans l'air, les sols et les eaux comme l'illustre le cycle des pesticides présenté en **Figure 1** (Barriuso et al. 1996; Mamy et al. 2008). Cela génère d'importants risques environnementaux qui sont notamment dus à leur persistance et leur faible biodégradabilité.

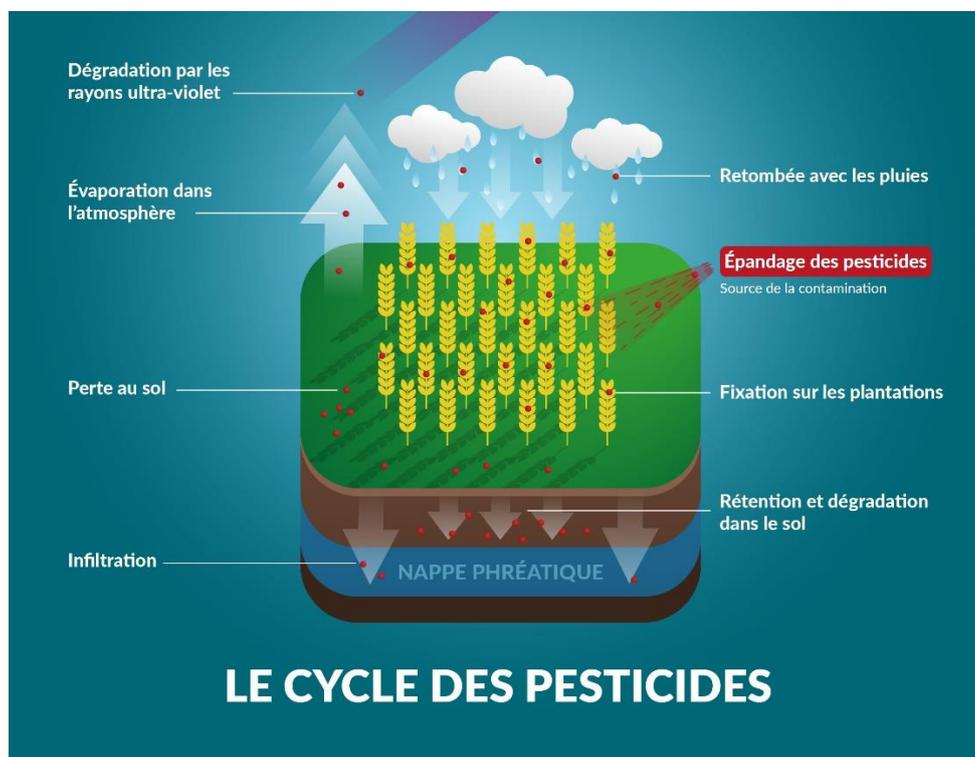


Figure 1 : Cycle des pesticides

Ils menacent également la biodiversité et la santé humaine. Chez l'homme l'exposition aux pesticides favorise le développement de certaines maladies comme la maladie de Parkinson et différents cancers. Les utilisateurs réguliers de ces produits comme les producteurs et les agriculteurs sont les premiers concernés (Baldi et al. 2013). Il devient donc essentiel de proposer de nouvelles alternatives, plus respectueuses de l'environnement et qui répondent à la demande de produits plus sains à la fois par les agriculteurs et les consommateurs. L'une des solutions envisagées est l'utilisation des produits de biocontrôle.

1.1. Le marché du biocontrôle

Inscrit dans le cadre de la lutte intégrée, le biocontrôle fait appel à des agents ou produits utilisant des interactions ou mécanismes naturels dans le but de lutter contre les ennemis des cultures. En 2016, le marché mondial des produits de biocontrôle, exprimé en recettes des ventes a atteint la barre des 3000 millions de dollars, soit 5,6% du marché total de protection des plantes (Phillips McDougall 2018). En 2018, d'après IBMA (International Biocontrol Manufacturers' Association) le chiffre d'affaires français s'élevait, quant à lui, à 170 millions d'euros, représentant ainsi 8% du marché de la protection des plantes. Ces dernières années, ce chiffre d'affaires évolue positivement. Il a par exemple augmenté de 24% entre 2017 et 2018 (IBMA 2019).

Notons que les produits de biocontrôle correspondent aux produits qui étaient jusqu'à récemment appelés biopesticides. En Europe, cette appellation (*i.e.* biopesticides) est progressivement abandonnée et ce certainement à cause de la connotation négative du mot « pesticide » qu'elle comporte. Aux Etats-Unis, c'est le terme biopesticides qui demeure employé.

1.2. Les 4 classes des produits de biocontrôle

Les produits de biocontrôle sont divisés en quatre catégories : les macroorganismes, les médiateurs chimiques, les microorganismes et les substances naturelles (Charbonnier 2019). Les trois dernières catégories contiennent des produits considérés comme phytopharmaceutiques dont la mise sur le marché dépend du règlement CE 1107/2009 qui a été adopté par le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne, le 21 octobre 2009.

- Les macroorganismes regroupent les organismes invertébrés visibles à l'œil nu exerçant une activité directe ou indirecte sur les ravageurs des cultures cibles. On distingue les macroorganismes prédateurs pour lesquels le ravageur est une proie (exemple : la coccinelle vis-à-vis du puceron) et les macroorganismes parasites pour lesquels le ravageur est un hôte indispensable à son développement. Cette catégorie représente 11% du chiffre d'affaires français des produits de biocontrôle (IBMA 2019).

- Les médiateurs chimiques regroupent les phéromones d'insecte et les kairomones. Les phéromones sont des molécules sémiochimiques (molécules signales) impliquées dans la communication entre insectes d'une même espèce. Les kairomones sont quant à elles des molécules sémiochimiques libérées dans l'environnement par des organismes émetteurs à destinations d'organismes récepteurs appartenant à d'autres espèces. Les médiateurs chimiques sont utilisés de deux manières : le piégeage qui consiste à suivre ou contrôler les populations de ravageurs et la confusion sexuelle qui consiste à perturber le système hormonal de reproduction des ravageurs. Cette catégorie représente 19% du chiffre d'affaires français des produits de biocontrôle (IBMA 2019).
- Les microorganismes regroupent les bactéries, champignons et virus. Ils présentent des activités variées (insecticide, fongicide, bactéricide...). En France, cette catégorie représente 7% du chiffre d'affaires des produits de biocontrôle. Elle est dominée par la bactérie *Bacillus thuringiensis* qui est utilisée pour ses propriétés insecticides (IBMA 2019).
- Les substances naturelles regroupent tous les produits d'origine minérale, végétale, animale ou microbienne. Elles sont utilisées comme insecticide, bactéricide, fongicide, etc. Leurs mécanismes d'action sont très variés et dépendent fortement du produit utilisé. En France, cette catégorie est de loin la plus importante puisqu'elle représente 63% du chiffre d'affaires des produits de biocontrôle (IBMA 2019). Elle est largement dominée par les produits soufrés et les produits issus de végétaux. Seules trois substances d'origine microbienne sont autorisées : le spinosad (insecticide), un mélange des spinosynes A et D, deux toxines produites par la bactérie *Saccharopolyspora spinosa*, l'abamectine (insecticide), un mélange des avermectines B1a et B1b, deux molécules produites par *Streptomyces avermitilis* et les cérévisanes, des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, utilisées comme stimulateur des défenses de divers plantes.

En France, chaque produit de biocontrôle doit obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) lui permettant d'être distribué, commercialisé et utilisé. L'obtention d'une AMM est rattachée à un usage particulier (une ou plusieurs cultures, un ou plusieurs ravageurs, une dose d'utilisation, etc.). En cas d'extension d'usage, ou toute autre modification (composition du produit, changement d'emballage, etc.), le produit doit faire l'objet d'une nouvelle demande d'AMM. A chaque demande, l'agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail (ANSES) effectue une analyse (validité scientifique, risques, etc.) et émet un avis scientifique qui est transmis à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL). Cette dernière approuve ou rejette la demande d'AMM (ITAB-ONEMA 2013). La liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle autorisés, au titre des articles L.253-5 et L.253-7 du Code Rural et de la Pêche Maritime (CRPM) est régulièrement publiée par la Direction Générale de L'Alimentation (DGAL). Chaque produit autorisé est également répertorié sur le site internet <https://ephy.anses.fr/>.

Aux Etats-Unis, l'homologation des substances actives est réalisée par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (US.EPA – United States Environmental Protection Agency). Une liste des substances actives ayant été approuvées comme « Biopesticide Active Ingredients » est disponible sur le site internet www.epa.gov.

1.3. Les bactéries et métabolites bactériens utilisés comme agents de biocontrôle antifongiques

Cette partie a pour vocation de faire un état des lieux des bactéries et métabolites bactériens actuellement autorisés pour une application en tant qu'agents de biocontrôle antifongiques, en France comme aux Etats-Unis. La liste des bactéries (utilisées entières) autorisées est dressée dans le **Tableau 1**. Parmi elles, les plus représentées sont les *Bacillus* et les *Pseudomonas* dont l'efficacité a été montrée contre une large gamme de champignons et d'oomycètes (Stockwell and Stack 2007; Fira et al. 2018).

Tableau 1 : Souches bactériennes autorisées en France et/ou aux Etats-Unis pour lutter contre les maladies fongiques de différentes cultures (source e-phy et EPA)

Souche bactérienne	Usage (France : source e-phy / USA : source EPA)	Autorisation France	Autorisation USA
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> F727	Mildiou des cucurbitacées		✓
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB24	Nombreux usages (dont oïdium, mildiou, pourriture grise) sur légumes, fraise, vigne, pomme de terre	✓	✓
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI 600	Maladies des semences de colza, Pourriture grise et sclérotiniose de la vigne, des fruits et légumes	✓	✓
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747	Nombreux usages (dont oïdium, pourriture grise, sclérotiniose, moniliose) sur fruits, légumes et vigne	✓	✓
<i>Bacillus licheniformis</i> FMCH001	Maladies des semences de céréales, pois, légumes et tubercules et oléagineux		✓
<i>Bacillus licheniformis</i> SB3086	Tâches foliaires et mildiou de l'herbe, des plantes ornementales et des conifères		✓
<i>Bacillus mycoides</i> isolat J	Cercosporiose de la betterave sucrière		✓
<i>Bacillus pumilus</i> GB34	Rhizoctone et fusariose du soja		✓
<i>Bacillus pumilus</i> QST2808	Sclérotiniose, oïdium et maladies des siliques du colza et de la moutarde, oïdium de la vigne, des fruits et légumes et du tabac	✓	✓
<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	Nombreux usages (dont anthracnose, cercosporiose, oïdium, sclérotiniose, pourriture grise, moniliose) sur vigne, légumes, fruits	✓	✓
<i>Bacillus subtilis</i> CX-9060	Maladies fongiques des cultures ornementales		✓
<i>Bacillus subtilis</i> FMCH002	Maladies des semences de céréales, pois, légumes, oléagineux et tubercules		✓
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Maladies des semences de céréale et pois		✓
<i>Bacillus subtilis</i> IAB/BS03	Maladies fongiques des semences de fruits, légumes, noix, canne à sucre, etc.		✓
<i>Burkholderia cepacia</i> type <i>Wisconsin M54</i>	Fonte des semis causés par divers champignons tels que Rhizoctonia, Pythium et Fusarium sur culture en champs et en serre		✓
<i>Burkholderia cepacia</i> type <i>Wisconsin J82</i>	Fonte des semis causés par divers champignons tels que Rhizoctonia, Pythium et Fusarium sur culture en champs et en serre		✓
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> Tx-1	Dollar spot, anthracnose, pythium, moisissure rose des neiges des cours de golf		✓
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 63-28	Maladies des plantes ornementales cultivées en serre		✓
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> AFS009	Maladies des pois, fruits, légumes, fleurs, plantes ornementales		✓
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	Maladies des semences de céréales (autres que pythiacées)	✓	
<i>Pseudomonas</i> sp. DSMZ 13134	Nombreuses maladies du sol en particulier le rhizoctone brun des pommes de terre	✓	
<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-10	Nombreux usages (dont moisissure bleue, pourriture grise, pourriture aigre, moisissure verte) sur fruits et tubercules après récolte		✓
<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-11	Nombreux usages (dont moisissure bleue, pourriture grise, pourriture aigre, moisissure verte) sur fruits et tubercules après récolte		✓
<i>Streptomyces</i> K61	Maladies du sol dont fusariose	✓	✓
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108	Nombreux usages (dont pourriture des racines causés par divers champignons tels que Fusarium et Rhizoctonia, Oïdium et Maladie des feuilles) sur sols, gazons, plantes cultivées en serre		✓

Les autorisations de mise sur le marché ne sont pas toujours les mêmes en France et aux Etats-Unis. Chez les *Bacillus*, 14 souches appartenant à 5 espèces (*i.e.* *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. subtilis*) ont été approuvées par l'EPA aux Etats-Unis. Parmi elles figurent les 5 souches de *Bacillus* également autorisées en France (**Tableau 1**). En ce qui concerne les bactéries du genre *Pseudomonas*, 5 souches appartenant aux espèces *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* et *P. syringae* sont approuvées aux Etats-Unis. En France seules deux souches sont autorisées : *P. chlororaphis* MA342 et *P. sp* DSMZ 13134 (**Tableau 1**).

La plupart des bactéries énoncées ci-dessus, qualifiées de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), sont appliquées au niveau des racines, certaines en revanche sont appliquées sur fruits après récolte. Les bactéries PGPR se développent au niveau des racines où elles agissent sur plusieurs niveaux : stimulation de la croissance des plantes, élicitation de leurs défenses, compétition spatiale et nutritionnelle ainsi que sécrétion de métabolites secondaires à l'encontre des phytopathogènes (Backer et al. 2018). Les souches *P. syringae* ESC-10 et ESC-11 sont appliquées directement sur fruits après récolte où elles permettent une protection efficace contre différents champignons phytopathogènes, notamment via la sécrétion de syringomycine, un lipopeptide de la famille des syringomycines (détaillé dans la partie « Lipopeptides » du manuscrit).

A l'inverse des bactéries utilisées entières, peu de substances naturelles d'origine bactérienne sont actuellement autorisées pour un usage antifongique.

En France, aucune substance d'origine bactérienne n'est autorisée pour un tel usage, les seules substances d'origine microbienne antifongiques autorisées étant les cérévisanes. Comme annoncé ci-dessus, ce sont des parois de levures qui stimulent les défenses des plantes, notamment contre l'oïdium, le mildiou ou la pourriture grise.

Aux Etats-Unis, trois substances d'origine bactérienne ont été approuvées par l'EPA pour le biocontrôle de maladies fongiques (Source EPA) :

1) L'harpine qui est une protéine retrouvée chez la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora* et utilisée pour lutter contre diverses maladies fongiques. Elle agit en induisant chez la plante, le phénomène de Résistance Systémique Acquise qui est une réaction immunitaire généralisée se déclarant en réponse à la présence de protéines pathogènes (Dong et al. 1999). Il existe également l'harpine $\alpha\beta$ qui est une protéine constituée de 4 fragments issus de plusieurs harpines. Ces deux substances actives sont produites par une souche atténuée d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée (*E. coli* K12).

2) La natamycine qui est une molécule antifongique synthétisée par la bactérie actinomycète *Streptomyces natalensis* utilisée pour le traitement des cultures de champignons comestibles contre divers champignons pathogènes. Son mode d'action consiste à perturber le fonctionnement de la membrane cellulaire des champignons pathogènes en se liant aux ergostérols présents sur cette dernière (te Welscher et al. 2008).

3) Les rhamnolipides, des glycolipides aux propriétés biosurfactantes composés d'un acide gras lié à un ou deux rhamnoses et produits par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Ils sont utilisés pour la protection de diverses cultures (agriculture, horticulture, gazons) contre les oomycètes tels que *Pythium*, *Oïdium* et *Phytophthora*. Leur action consiste essentiellement à lyser les zoospores de ces espèces fongiques en pénétrant et perturbant leur membrane plasmique (Vatsa et al. 2010). Ils sont commercialisés sous le nom Zonix™ par la société américaine Jeneil Biosurfactant Company.

Comme nous venons de le voir, très peu de métabolites bactériens sont actuellement autorisés pour le biocontrôle de maladies fongiques. Pourtant, les lipopeptides, notamment ceux produits par les bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, ont montré des activités très intéressantes contre divers champignon phytopathogènes. Ils sont d'ailleurs produits par un grand nombre de souches bactériennes actuellement autorisées (e.g. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *P. syringae*) et seraient en grande partie responsables de leurs activités antifongiques (Ongena and Jacques 2008; Geudens and Martins 2018).

2. Les *Pseudomonas*

2.1. Présentation du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* appartiennent au règne des bactéries, à la division des protéobactéries, à la classe des gammaprotéobactéries, à l'ordre des pseudomonadales et à la famille des pseudomonadaceae.

La première description de ce genre bactérien fut donnée par Migula en 1894. Il définissait ces bactéries comme des cellules avec des organes de motilité polaire.

Une présentation des caractéristiques microbiologiques des *Pseudomonas* est développée dans le Manuel de Bactériologie Systématique de Bergey (Palleroni 2015). Les *pseudomonas* sont des bacilles Gram négatif, droits ou légèrement courbés, dont la largeur est de 0,5µm à 1µm et la longueur de 1,5µm à 5µm. Elles sont mobiles à ciliature polaire grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles et sont généralement non sporulantes. Ces bactéries sont catalase positive et généralement oxydase positive. Aérobie, elles ont un métabolisme strictement respiratoire où l'oxygène est l'accepteur final d'électrons. Certaines d'entre elles se développent également en anaérobiose grâce à la synthèse d'une nitrate réductase leur permettant d'utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons. La plupart des *Pseudomonas* ont une température optimale de croissance de 28°C.

Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans l'environnement naturel (mer, rivière, glacier, sols, sédiments, rhizosphère, phyllosphère) dans de nombreuses régions du globe. En fonction des espèces, elles peuvent également être retrouvées dans le domaine agroalimentaire où elles font partie de la flore d'altération des aliments, dans les stations d'épuration ou encore dans le domaine médical pour les pathogènes retrouvés dans les échantillons cliniques (Peix et al. 2009, 2018).

Les *Pseudomonas* ont plusieurs applications telles que la dépollution où elles agissent en dégradant les hydrocarbures et le biocontrôle. Dans le cadre du biocontrôle, elles sont utilisées comme stimulateurs de défenses des plantes et/ou comme antagonistes des bio-agresseurs. Comme nous l'indiquions précédemment, plusieurs études ont montré que les lipopeptides étaient les principales molécules impliquées dans cet antagonisme. Toutefois plusieurs autres molécules produites par certaines espèces de *Pseudomonas* ont également montré des activités

antimicrobiennes intéressantes : le 2,4-duacétylphloroglucinol, les phénazines, la pyolutéorine, les pyrrolnitrines ou encore le cyanure d'hydrogène (Couillerot et al. 2009).

Selon les critères taxonomiques actuels, plus de 190 espèces bactériennes sont considérées comme des espèces de *Pseudomonas*. Bien que certaines espèces ne respectant plus ces critères aient été retirées, ce nombre augmente de manière continue. Ces dix dernières années, plus de 70 nouvelles espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées (Peix et al. 2009, 2018).

2.2. Le complexe *Pseudomonas syringae*

L'espèce *Pseudomonas syringae* a pour la première fois été isolée en 1899 à partir de lésions d'un lilas malade par Beijerinck avant d'être nommée et caractérisée par Van Hall en 1902. Suite à cette découverte, la plupart des études réalisées sur les *P. syringae* ont porté sur leurs interactions avec les plantes, si bien qu'elles ont longtemps été exclusivement considérées comme des bactéries phytopathogènes épiphytes capables de se développer à la surface des végétaux, notamment au niveau de la phyllosphère. Ces dernières années, la description écologique du complexe *P. syringae* a bien évolué. Il est reconnu comme étant composé de souches ubiquitaires, retrouvées à la surface des organes des végétaux mais également dans des milieux terrestres non agricoles et des milieux aqueux (Morris et al. 2013).

La classification des souches à l'intérieur de ce complexe a longtemps reposé sur leurs caractéristiques phénotypiques. Depuis l'avènement de la génétique, d'autres méthodes telles que l'hybridation ADN-ADN, le ribotypage ou l'analyse phylogénétique de séquences multi locus (MLSA – Multi Locus Sequence Analysis), ont permis de redéfinir cette classification. Cette dernière méthode qui est la plus utilisée, repose sur l'analyse des séquences de plusieurs gènes de ménage (housekeeping genes), conservés au sein du génome : *cts*, *gapA*, *gyrB*, *rpoD*, *pgi*, *pfk* et *acn1* (Sarkar and Guttman 2004).

En 2014, les travaux de Berge et al., ont ainsi montré que les souches du complexe *P. syringae* étaient phylogénétiquement réparties dans 13 phylogroupes eux-mêmes sous-divisés en 23 clades (**Figure 2**). Les auteurs ont également montré qu'il était possible de se baser exclusivement sur l'analyse de la séquence du gène *cts* codant pour la citrate synthase, pour parvenir à une telle classification (Berge et al. 2014). Récemment, Hall et al., (2019) ont mis en évidence un 24^{ème} clade : le clade 02f (Hall et al. 2019). Notons que ce complexe bactérien inclut des espèces génétiquement proches de *P. syringae* telles que *P. viridiflava* et *P. cichorii* (Gomila et al. 2017).

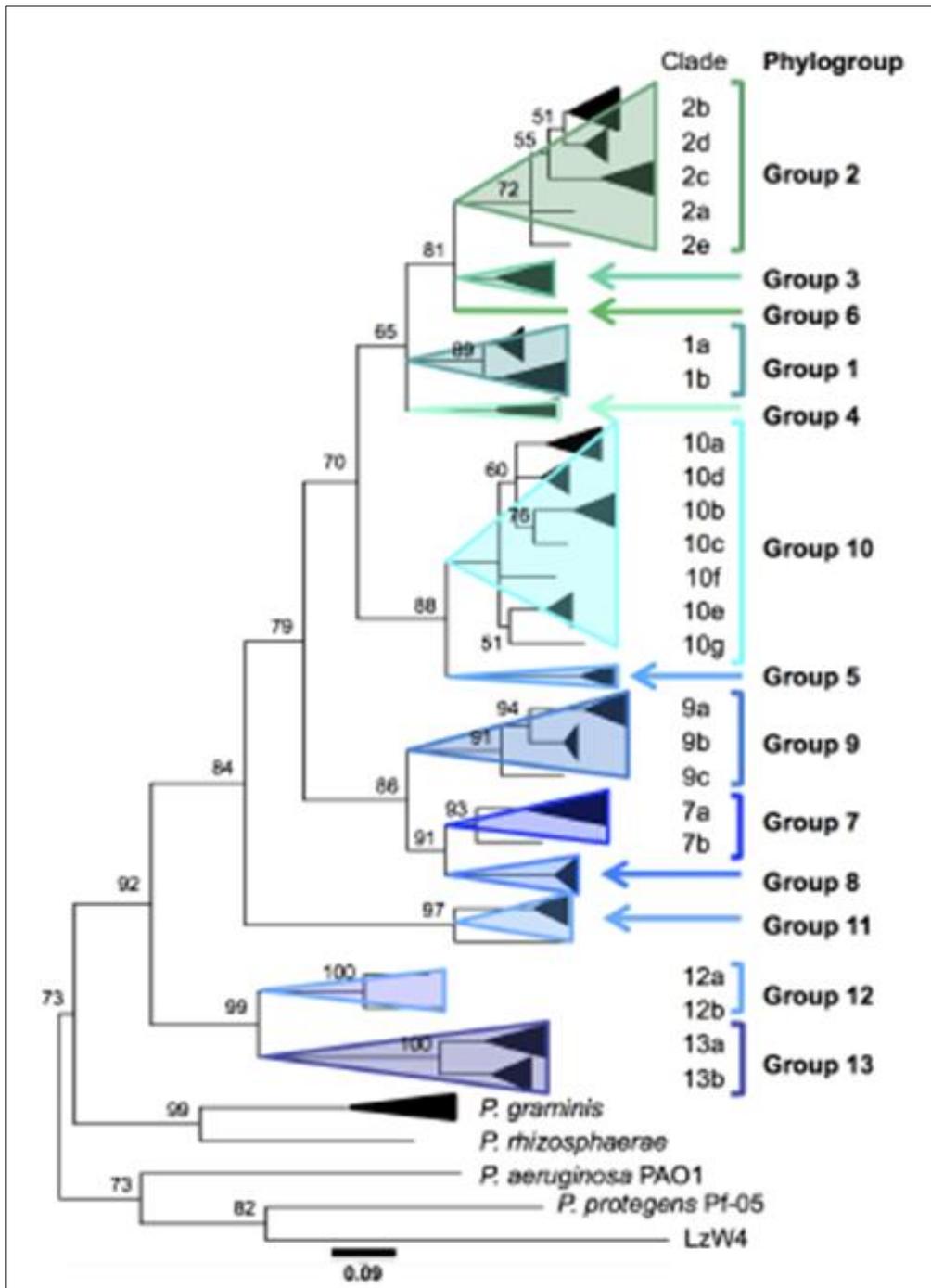


Figure 2 : Arbre phylogénétique construit à partir de l'analyse des séquences des gènes de ménage *cts*, *gyrB*, *gapA* et *rpoD* de 216 souches de *P. syringae* (Berge et al., 2014)

Dans la suite de cette partie, nous décrirons 2 caractères représentatifs des *Pseudomonas syringae* que sont leurs pouvoirs glaçogène et pathogène.

- **Le pouvoir glaçogène**

L'eau ultrapure, exempte de toute particule, peut demeurer à l'état liquide jusqu'à -40°C. Dans l'environnement naturel, l'eau n'est toutefois jamais totalement pure, elle contient en effet diverses particules organiques ou inorganiques. Certaines d'entre elles sont des noyaux de cristallisation ou noyaux glaçogènes capables de catalyser la prise en glace de l'eau à des températures avoisinant les 0°C : elles ont un pouvoir glaçogène (Gaignard and Luisetti 1993).

Les noyaux de cristallisation les plus efficaces proviennent de microorganismes dont de nombreuses bactéries de l'espèce *P. syringae*. Chez cette dernière, c'est une protéine présente sur la membrane externe, capable d'entraîner la formation de cristaux de glace à des températures de l'ordre de -2°C à -8°C, qui est responsable de cette activité. Elle est codée par le gène *ina* pour *Ice Nucleation Activity* (Gaignard and Luisetti 1993; Hirano and Upper 2000; Morris et al. 2013).

Le pouvoir glaçogène est étroitement lié à l'activité phytopathogène des bactéries pour les espèces de plantes sensibles au froid. Il permet en effet d'altérer physiquement les tissus des végétaux et également de faciliter la pénétration des bactéries au niveau des tissus ainsi détériorés (Lindow 1983).

- **Le pouvoir pathogène**

L'activité phytopathogène des *P. syringae* s'exerce essentiellement par l'intermédiaire de protéines effectrices, dites effecteurs de type III qui agissent en modulant les fonctions de la plante et en favorisant la prolifération bactérienne. Ces effecteurs sont injectés au niveau du cytoplasme des cellules végétales au moyen de systèmes de sécrétion de type III. Ces systèmes de sécrétion sont codés par des clusters de gènes nommés *hrp* pour *hypersensitive response and pathogenicity*, les gènes codant pour les effecteurs étant situés de part et d'autre de ces clusters (Alfano and Collmer 2004).

Dans certains cas, la pénétration de la protéine effectrice au niveau de la cellule hôte induit une résistance chez la plante qui se traduit par une réponse d'hypersensibilité. Cette dernière correspond à une nécrose programme des tissus végétaux dont le but est d'empêcher la propagation du pathogène. Ce type de réponse a lieu lorsque la protéine effectrice qui est codée par un gène *avr* (avirulence) est reconnue par une protéine de résistance chez la plante, codée

par le gène de résistance polymorphe R. On parle alors de résistance gène pour gène (Jones and Dangl 2006).

Les *P. syringae* phytopathogènes peuvent produire un panel d'autres molécules qui amplifient le pouvoir pathogène des souches, sans toutefois en être à l'origine. Ces molécules sont des polysaccharides extracellulaires, des enzymes comme les pectinases, impliquées dans la dégradation des parois cellulaires, des phytohormones ou encore des phytotoxines telles que la coronatine, la phaséolotoxine, la persicomycine, la tabtoxine, la tagetitoxine et les lipopeptides appartenant aux familles des syringomycines et des syringopeptines. Les fonctions de ces toxines sont très diverses. La coronatine par exemple, est impliquée dans la formation de chloroses, dans l'inhibition de l'élongation racinaire et dans la stimulation de la production d'éthylène alors que la phaséolotoxine est impliquée dans l'inhibition de l'OCTase, une enzyme impliquée dans le cycle de l'urée (Bender et al. 1999). Nous reviendrons sur le mode d'action des lipopeptides dans la partie suivante.

Les *Pseudomonas syringae* phytopathogènes ont historiquement été divisés en pathovars, certains de ces pathovars étant spécifiques d'une unique espèce végétale tandis que d'autres, comme le pathovar *syringae*, peuvent être pathogènes de nombreux hôtes (Gaignard and Luisetti 1993). A ce jour, plus de 60 pathovars sont répertoriés (Gomila et al. 2017). Des maladies causées par *P. syringae* sont recensées sur de nombreux types de cultures. Ces bactéries touchent aussi bien les arbres fruitiers (*e.g.* pommier, abricotier, pêcher) que les plantes ornementales dont le lilas et les cultures maraîchères incluant les légumineuses, les cucurbitacées et les solanacées. Elles provoquent également des maladies sur les grandes cultures céréalières dont le blé, le pathovar *P. syringae* pv. *atrofaciens* étant responsable de la bactériose des glumes de blé.

Enfin, il est important de préciser que toutes les souches de *Pseudomonas syringae* ne sont pas des phytopathogènes. De nombreuses études ont en effet montré que des souches appartenant à ce complexe bactérien, étaient présentes à la surface des plantes, uniquement en tant que commensaux (Xin et al. 2018).

Pour clôturer cette partie, rappelons que les *P. syringae* sont des bactéries qui ont démontrés d'excellentes activités antifongiques, notamment via la production de lipopeptides dont ceux appartenant aux familles des syringomycines et des syringopeptines.

3. Les lipopeptides

Les lipopeptides sont des molécules amphiphiles composées d'un acide gras hydrophobe, lié à une chaîne peptidique hydrophile (**Figure 3**). Leur production a été montrée chez plusieurs microorganismes dont les bactéries des genres *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Bacillus* ou encore *Pseudomonas* (Raaijmakers et al. 2010).

Ce sont des métabolites secondaires synthétisés via une voie de synthèse non ribosomique, par des complexes multienzymatiques appelés NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase). Conséquence de ce mode de synthèse, les structures des lipopeptides peuvent être très variables. Ils peuvent être cycliques ou linéaires, composés d'acides aminés protéinogènes et non protéinogènes, de conformation L ou D et ont des acides gras de différentes tailles et différents niveaux de saturation et d'hydroxylation (**Figure 3**). La plupart d'entre eux sont toutefois cycliques, c'est pourquoi ils sont souvent nommés CLPs pour Cyclic LipoPeptides.

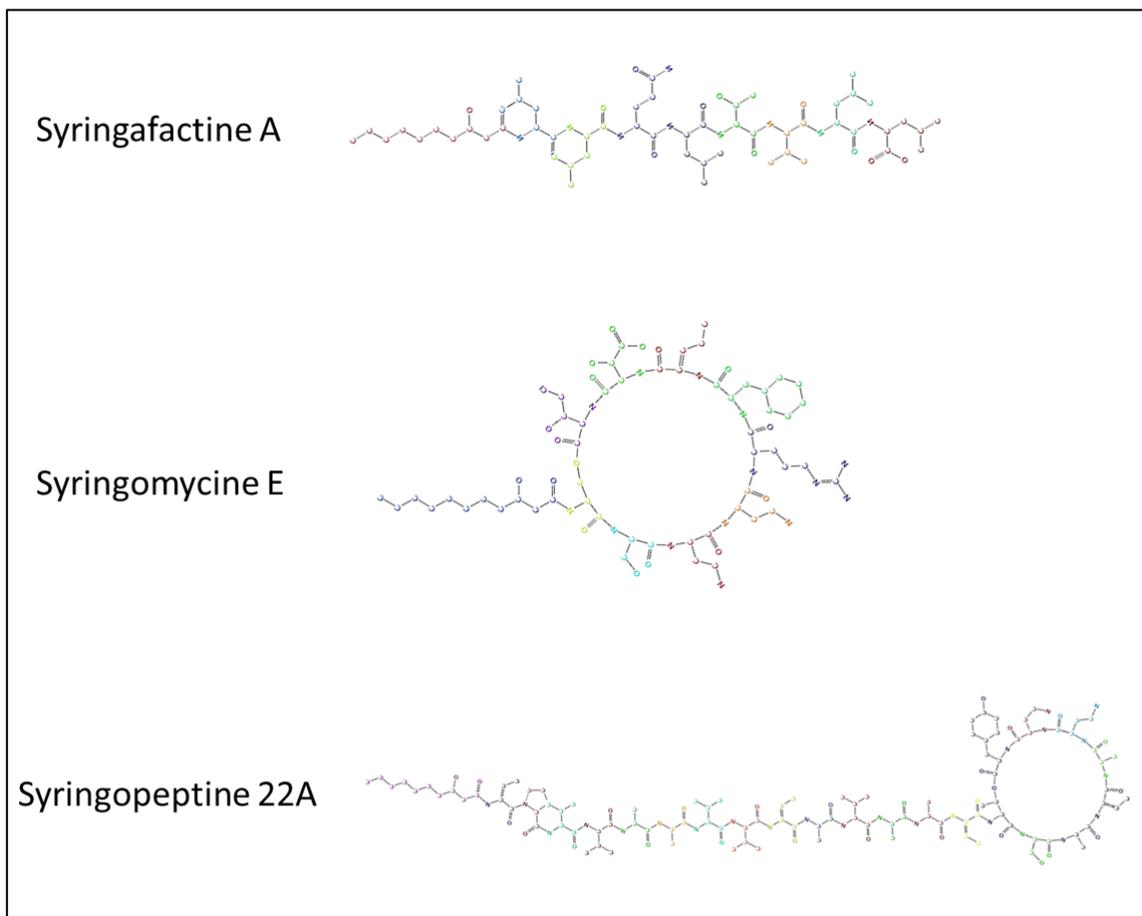


Figure 3 : Structures de lipopeptides produits par des souches du complexes *P. syringae*

En raison de l'importante diversité structurale des lipopeptides, notamment chez *Pseudomonas* et *Bacillus*, ces molécules ont été classées en différentes familles, parfois appelées groupes, selon trois critères : le nombre d'acides aminés (ou monomères) présents au niveau de la chaîne peptidique, la taille du cycle peptidique et la taille de l'acide gras. A l'intérieur même de ces familles, il co-existe plusieurs lipopeptides que l'on pourrait appeler sous-familles, bien qu'aucune nomenclature consensuelle n'ait été établie à ce sujet. Ces sous-familles qui sont issues de synthétases NRPS différentes, diffèrent par la taille de l'acide gras et par la composition en acides aminés de la chaîne peptidique. Notons enfin que pour une même sous-famille, il peut exister plusieurs variants, issus d'une même synthétase NRPS dont les différences sont observées au niveau de l'acide gras et/ou au niveau d'un à deux acides aminés de la chaîne peptidique.

La diversité de structure à l'échelle de la famille, de la sous-famille et du variant est à l'origine d'une importante diversité d'activités biophysiques (émulsifiante, désémulsifiante, moussante, hydratante, détergente, dispersante, etc.) et biologiques (antimicrobienne, antitumorale, hémolytique, biocontrôle, etc.)(Mnif and Ghribi 2015).

3.1. La synthèse NRPS

C'est au cours des années 1960, faisant suite à des recherches sur la biosynthèse de la gramicidine S, un décapeptide cyclique, que la première preuve de l'existence d'un mode de synthèse ne dépendant pas de l'intervention des ribosomes a vu le jour. Ces recherches ont montré que des cultures de *Bacillus brevis* traitées avec des dérivés de pyrimidine et avec un analogue d'acide aminé naturel, le 5-fluoro-tryptophane, n'étaient plus capables de se développer et de synthétiser des protéines mais toujours capables de produire de la gramicidine S. La biosynthèse de la gramicidine S était alors permise par un mécanisme différent de celui de la synthèse des protéines (Winnick et al. 1961). En 1968, l'équipe de Fritz Lipmann parvenait à extraire et purifier partiellement les enzymes responsables de la synthèse de la gramicidine S et décidait de les appeler NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase)(Gevers et al. 1968). En 1971, cette même équipe définissait pour la première fois le mécanisme de synthèse NRPS via l'étude de la gramicidine S et de la tyrocidine, un autre décapeptide cyclique produit par *Bacillus brevis* (Lipmann et al. 1971). Seize ans plus tard, Marahiel et ses collègues séquençaient le premier gène codant pour une NRPS : le gène *tycA* de la tyrocidine synthétase (Weckermann et al. 1988). Cette voie de synthèse particulière est principalement retrouvée chez les bactéries comme *Streptomyces*, *Bacillus* ou *Pseudomonas* et les champignons comme *Penicillium* (Süssmuth and Mainz 2017). Elle est toutefois également retrouvée chez d'autres organismes comme la mouche *Drosophila melanogaster* ou le nématode *Caenorhabditis elegans*. Chez la mouche, c'est une NRPS partielle qui a été observée. Nommée Ebony, cette NRPS n'est pas impliquée dans la synthèse de métabolites mais joue un rôle primordiale dans la synthèse de β -alanalyl-dopamine à partir de β -alanine (Richardt et al. 2003). Chez le nématode, c'est une synthétase hybride NRPS/PKS qui a été identifiée, les synthétases PKS pour polycétide synthase (de l'anglais polyketide synthase), étant d'autres complexes multienzymatiques permettant la production de métabolites secondaires par voie non ribosomique. Cette synthétase hybride est responsable de la production des némamides, des métabolites ayant un rôle signal dans le développement du nématode (Shou et al. 2016).

Les gènes NRPS sont organisés en opérons ou clusters. Les différentes enzymes codées par ces gènes sont organisées en modules, où chaque module est responsable de l'incorporation d'un acide aminé (ou monomère) dans la chaîne peptidique en cours d'élongation (Finking and Marahiel 2004; Süssmuth and Mainz 2017). Les modules sont eux-mêmes constitués de différents domaines possédant des activités enzymatiques spécifiques.

Quatre domaines indispensables, dits essentiels, sont retrouvés chez toutes les NRPS : le domaine d'adénylation (A), le domaine de thiolation (T), le domaine de condensation (C) et le domaine de thioestérase (Te) (Süssmuth and Mainz 2017).

- Domaine d'adénylation (A)

Composé d'environ 550 acides aminés, le domaine d'adénylation (A) sélectionne le monomère à incorporer et l'active en le transformant en aminoacyl-adenylate. Cette réaction nécessite la présence de Mg^{2+} et consomme une molécule d'ATP (**Figure 4**). Généralement, la sélection des monomères par les domaines A est très spécifique. Certains domaines d'adénylation présentent toutefois une flexibilité leur permettant de sélectionner des acides aminés structuralement proches (*e.g.* Leucine et Isoleucine) ce qui mène à la production de plusieurs variants par une même synthétase.

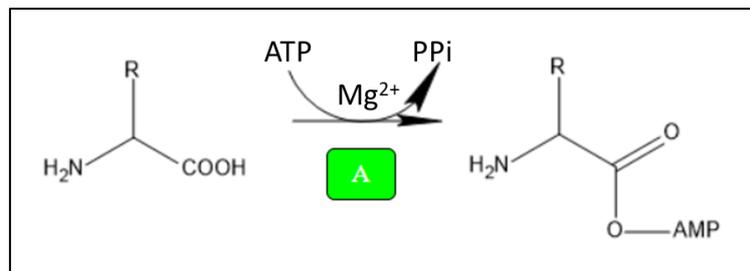


Figure 4 : Réaction d'activation du monomère par le domaine A

A Domaine A

- Domaine de thiolation (T)

Le domaine de thiolation (T) aussi appelé Peptidyl Carrier Protein (PCP) est composé d'une centaine d'acides aminés. Afin d'être fonctionnel, ce domaine doit d'abord se voir greffer un groupement 4'-phosphopantéthéinyl par le biais d'une phosphopantéthéinyl transférase. Il passe alors de sa forme inactive dite apo-forme à sa forme active dite, holo-forme. Le domaine T est alors capable de fixer le monomère (ou le peptide en cours d'élongation) à la synthétase, au moyen d'une liaison thioester (**Figure 5**).

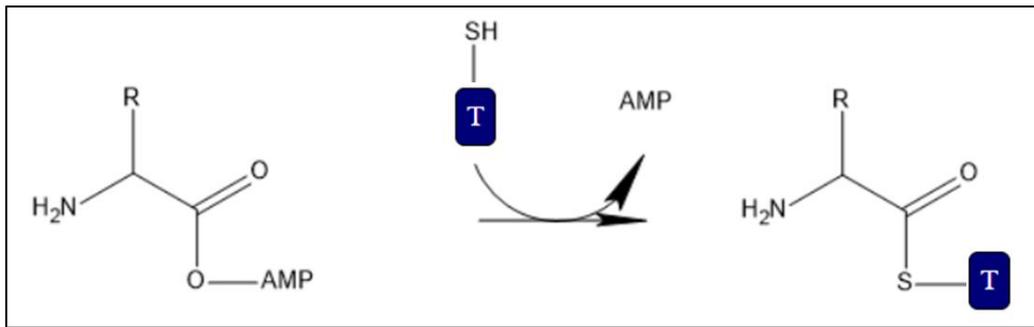


Figure 5 : Réaction de fixation du monomère au domaine T

T Domaine T

- Le domaine de condensation (C)

Composé d'environ 450 acides aminés, le domaine de condensation (C) réalise la liaison peptidique entre le monomère fixé sur un domaine T et le monomère (ou la chaîne peptidique en cours d'élongation) fixé sur le domaine T situé en aval (*Figure 6*).

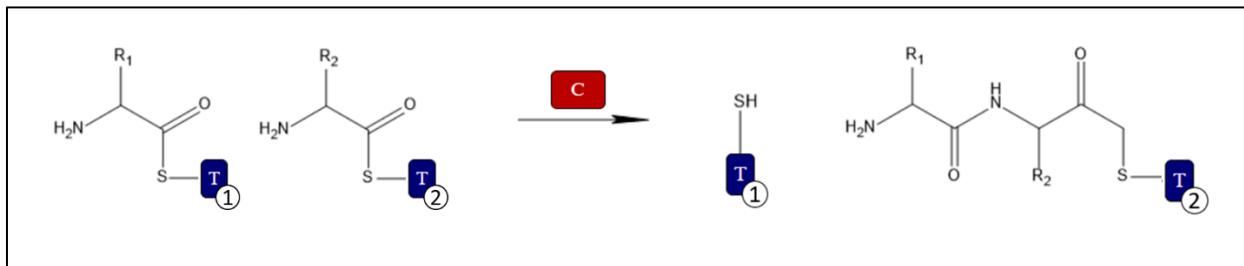


Figure 6 : Réaction de catalyse de la liaison peptidique entre deux monomères par le domaine C

T Domaine T **C** Domaine C

Il existe plusieurs sous-types de domaines C :

- Le domaine C_{starter} aussi appelé domaine de N-acétylation qui est caractéristique des synthétases de lipopeptides. Présent en début de synthétase, son rôle est d'incorporer le lipide du côté N-Terminal de la molécule. Notons qu'un domaine C_{starter} est capable d'incorporer des lipides de structures variables (taille, saturation, hydroxylation).
- Le domaine ^LC_L qui réalise une liaison peptidique entre deux monomères de conformation L.
- Le domaine ^DC_L qui catalyse la liaison peptidique entre un monomère de conformation D et un monomère de conformation L. Ce domaine est toujours accompagné d'un domaine E en charge de l'épimérisation du monomère de conformation L vers la

conformation D. Ces deux domaines ne sont jamais retrouvés au sein des synthétases de lipopeptides de *Pseudomonas*.

- Le domaine C/E pour condensation/epimerization qui est caractéristique des synthétases de lipopeptides chez les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Il présente une double activité qui est la réalisation de la liaison peptidique entre deux monomères et l'épimérisation, du monomère situé en amont, de la conformation L vers la conformation D (Balibar et al. 2005). Il s'agit en somme d'une combinaison des domaines E et ^DC_L qui sont retrouvés chez d'autres organismes.

- Le domaine de thioestérase (Te)

Composé de 280 acides aminés, le domaine de thioestérase (Te) est uniquement présent au niveau du dernier module du complexe multienzymatique. Son rôle est de libérer le peptide et dans certains cas de le cycliser. Pour cela, le peptide est d'abord lié par le biais d'une liaison ester avec le domaine Te puis libéré par une réaction d'hydrolyse (**Figure 7**).

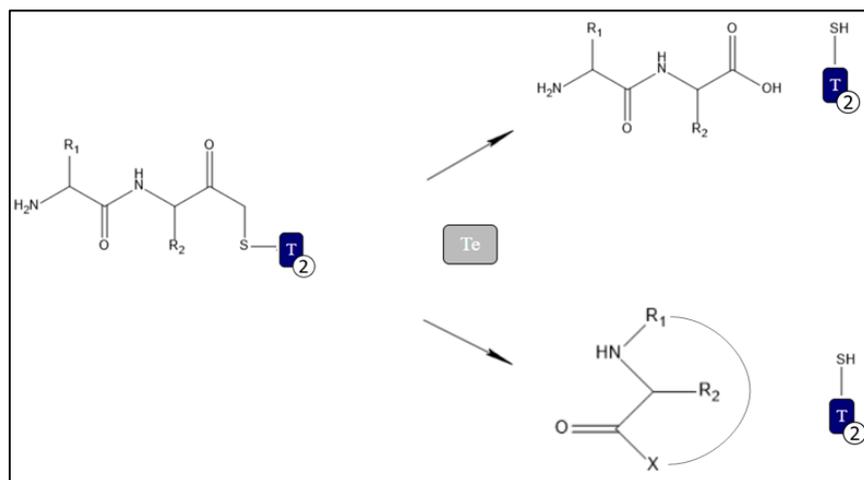


Figure 7 : Réaction de libération du peptide néoformé par le domaine Te



Dans le cas particulier des lipopeptides chez *Pseudomonas*, il y a souvent un tandem de thioestérase en fin de synthétase (deux domaines Te). La présence d'un deuxième domaine Te permettrait d'améliorer l'efficacité de la cyclisation (Roongsawang et al. 2007) et d'augmenter le taux de libération des peptides (Berti et al. 2007). La présence de ce domaine supplémentaire n'est pas systématique.

Les peptides issus de la synthèse NRPS présentent une incroyable diversité de structures. Cette diversité est due au fait qu'à l'inverse de la synthèse ribosomique n'utilisant que les 20 acides aminés protéogéniques, les NRPS peuvent incorporer de nombreux acides aminés non protéogéniques. A ce jour, plus de 500 monomères sont ainsi répertoriés. De plus, les peptides produits par les NRPS peuvent être branchés, partiellement ou totalement cycliques ou encore polycycliques. Les peptides non ribosomiques sont recensés sur la base de données NORINE, qui est entièrement dédiée à ce type de molécules (Caboche et al. 2008; Flissi et al. 2020).

La grande majorité des lipopeptides sont produits selon un mode de biosynthèse dit linéaire au cours duquel chaque module incorpore un monomère et n'est utilisé qu'une seule fois au cours de la synthèse. Cette biosynthèse suit une loi de colinéarité c'est-à-dire que le nombre et l'ordre des modules définit directement la séquence peptidique du peptide final. Ce mode de synthèse est illustré avec la cichofactine A, lipopeptide linéaire de 8 acides aminés identifiée chez *P. cichorii* SF1-54 dans la **Figure 8**.

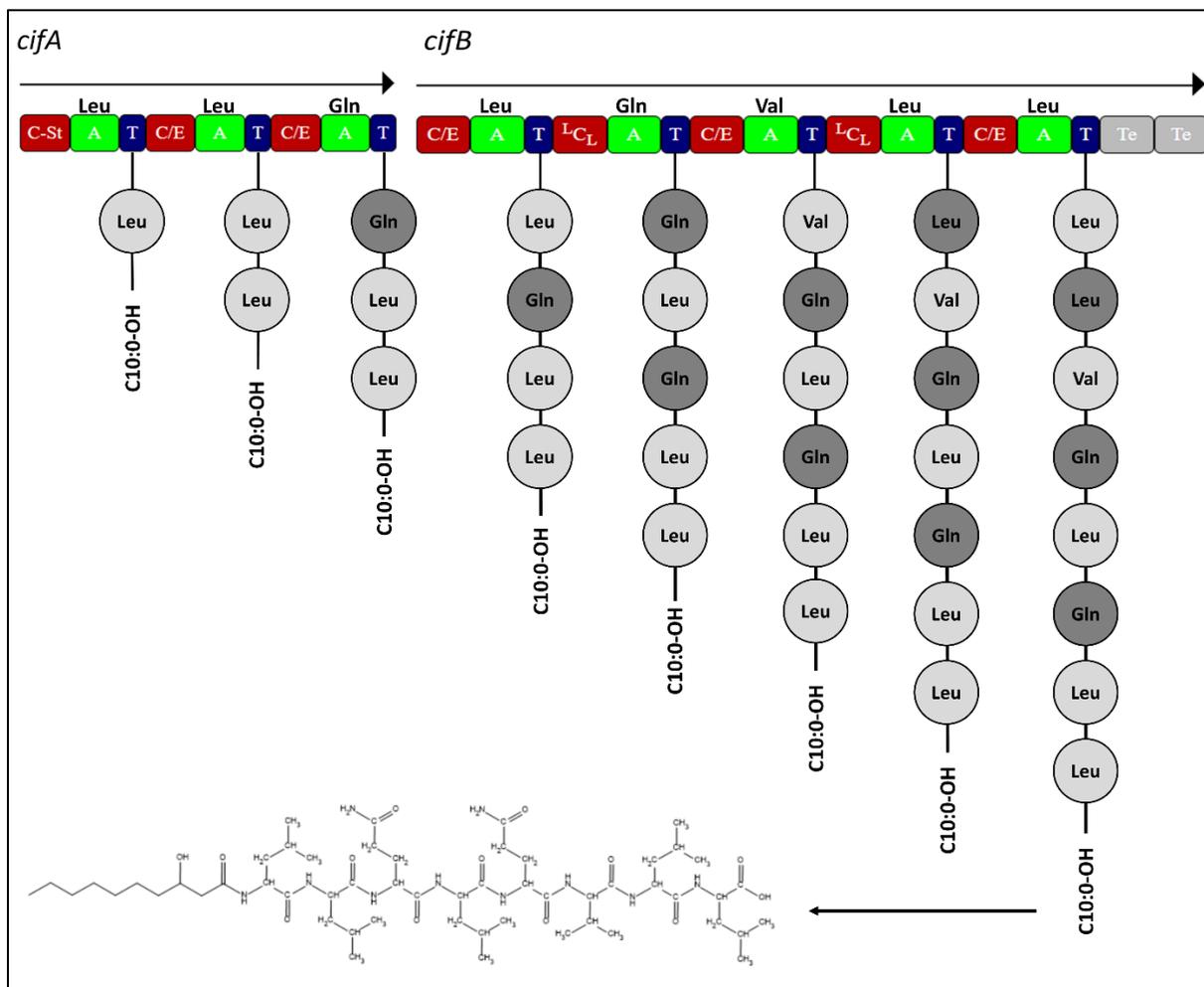


Figure 8 : Biosynthèse de la cichofactine A chez *P. cichorii* SF1-54

● Isométrie D ○ Isométrie L

La synthétase responsable de la synthèse de la cichofactine A est composée de 8 modules donnant lieu à un lipopeptide à 8 acides aminés. Le premier module est composé d'un domaine Cstarter responsable de l'incorporation de l'acide gras et le dernier module est composé d'un tandem de thioestérase (Te), responsable de la libération du lipopeptide linéaire. Certains modules contiennent des domaines C/E d'où la présence d'acides aminés de conformation D dans la structure du lipopeptide. Cependant dans le cas des cichofactines, la partie responsable de l'épimérisation pour les deux premiers domaines C/E, a été démontrée non fonctionnelle, c'est pourquoi les deux premiers acides aminés sont de conformation L bien que des domaines C/E soient présents (Götze et al. 2019).

Dans certains cas, les lipopeptides sont produits selon un mode de biosynthèse non linéaire au cours duquel l'organisation des modules au niveau de la synthétase ne correspond pas à l'ordre des acides aminés retrouvé dans le peptide final. C'est notamment le cas de la syringomycine E, produite par *P. syringae* pv. *syringae* B301D dont la biosynthèse est illustrée en **Figure 9**.

Le cluster de biosynthèse de la syringomycine E est composé de deux gènes NRPS nommés *syrB1* et *syrE* flanqués de trois gènes *syrP*, *syrB2* et *syrC* codant pour des enzymes impliquées dans la structuration du lipopeptide.

Le mode de synthèse de ce lipopeptide est non linéaire car le gène *syrB1* responsable de l'incorporation du 9^{ème} monomère est situé en amont du gène *syrE* impliqué dans l'incorporation des 8 premiers monomères. Une autre particularité de la synthétase de syringomycine est la présence de modules fractionnés. En effet, le gène *syrE* code pour les domaines C et T de ce qui pourrait être un 9^{ème} module, exempt de domaine A, ce dernier étant en réalité codé par *syrB1*.

Les différentes étapes de la biosynthèse de la syringomycine E sont les suivantes (Guenzi et al. 1998; Gross and Loper 2009) :

- Incorporation du premier monomère, la L-Sérine qui est également acylée (acide gras en C12:0-OH(3)) par le domaine C-starter. Notons qu'un domaine C/E est présent à la suite du domaine A incorporant la sérine, pourtant une L-sérine est observée dans la structure finale du lipopeptide (Balibar et al. 2005)
- Incorporation des monomères 2 à 8, quatre d'entre eux étant non usuels :
 - o Les monomères 3 et 4 sont des acides 2,4-diaminobutyriques (Dab)
 - o Le monomère 7 est l'acide 2,3-dehydro-2-aminobutyrique (dhAbu). D'après Grgurina et al., (1999), il serait obtenu après déshydratation d'une thréonine.
 - o Le monomère 8 est l'acide hydroxyaspartique (OH-Asp). Il est obtenu après hydroxylation, par la protéine SyrP, de l'acide aspartique incorporé par le 8^{ème} module de SyrE (Singh et al. 2008)
- Incorporation du 9^{ème} monomère : la 4-Chloro-Thréonine. Elle est issue de la thréonine incorporée au niveau de SyrB1, qui subit une chloration par l'enzyme SyrB2 puis qui est transportée en fin de synthétase par SyrC (Vaillancourt et al. 2005; Singh et al. 2007)
- Cyclisation et libération de la syringomycine E par le domaine Te

3.2. Les lipopeptides de *Pseudomonas*

La première découverte d'un lipopeptide produit par une souche du genre *Pseudomonas*, la viscosine, remonte à 1951 par Groupé et al., bien qu'à cette époque sa structure ne fut pas élucidée (Groupé et al. 1951). Depuis cette découverte, le nombre d'études visant à rechercher et caractériser de nouveaux lipopeptides produits par ce genre bactérien, n'a pas cessé d'augmenter. A ce jour, plus de 120 lipopeptides, produits par différentes souches de *Pseudomonas*, ont été caractérisés. Ces derniers présentent une grande variété de structure, tant au niveau de l'acide gras que de la partie peptidique. L'acide gras dont la taille varie entre 5 et 18 atomes de carbones, peut être saturé ou monoinsaturé et présenter une à deux hydroxylations. Les parties peptidiques, constituées de 8 à 25 monomères d'isoméries D, L ou achiraux, peuvent être linéaires ou cycliques. La prise en compte de ces différences a d'abord permis de classer les lipopeptides de *Pseudomonas* en 4 familles (viscosines, amphisines, syringomycines et tolaasines) (Raaijmakers et al. 2006) puis en 6 familles (viscosines, amphisines, putisolvines, syringomycines, tolaasines et syringopeptines) (Roongsawang et al. 2011). Aujourd'hui, faisant suite à la découverte de nombreux nouveaux lipopeptides, Geudens et Martins proposent une classification des lipopeptides cycliques ou CLPs en 14 familles, basée sur le nombre de monomères de la chaîne peptidique, la longueur du cycle et la longueur de la chaîne d'acide gras : bananamides (Nguyen et al. 2016), pseudofactines (Janek et al. 2010), syringomycines (Penner et al. 1969; Segre et al. 1989), viscosines (Groupé et al. 1951; Laycock et al. 1991), orfamides (Gross et al. 2007), amphisines (Sørensen et al. 2001), putisolvines (Kuiper et al. 2004), entolysines (Vallet-Gely et al. 2010), xantolysines (Li et al. 2013), tolaasines (Nutkins et al. 1991), fuscopeptines (Ballio et al. 1996), corpeptines (Emanuele et al. 1998), syringopeptines 22 (Ballio et al. 1991) et syringopeptines 25 (Ballio et al. 1991; Geudens and Martins 2018). A ces 14 familles s'ajoutent deux familles de lipopeptides linéaires que sont les syringafactines (Berti et al. 2007) et les corrugatines (Risse et al. 1998).

Chez les lipopeptides de *Pseudomonas*, c'est le nom de la première molécule découverte au sein d'une famille, qui donne son nom à cette famille et qui devient alors la molécule type de cette dernière. La **Figure 10** présente les structures des molécules types de chacune des 16 familles de lipopeptides répertoriées.

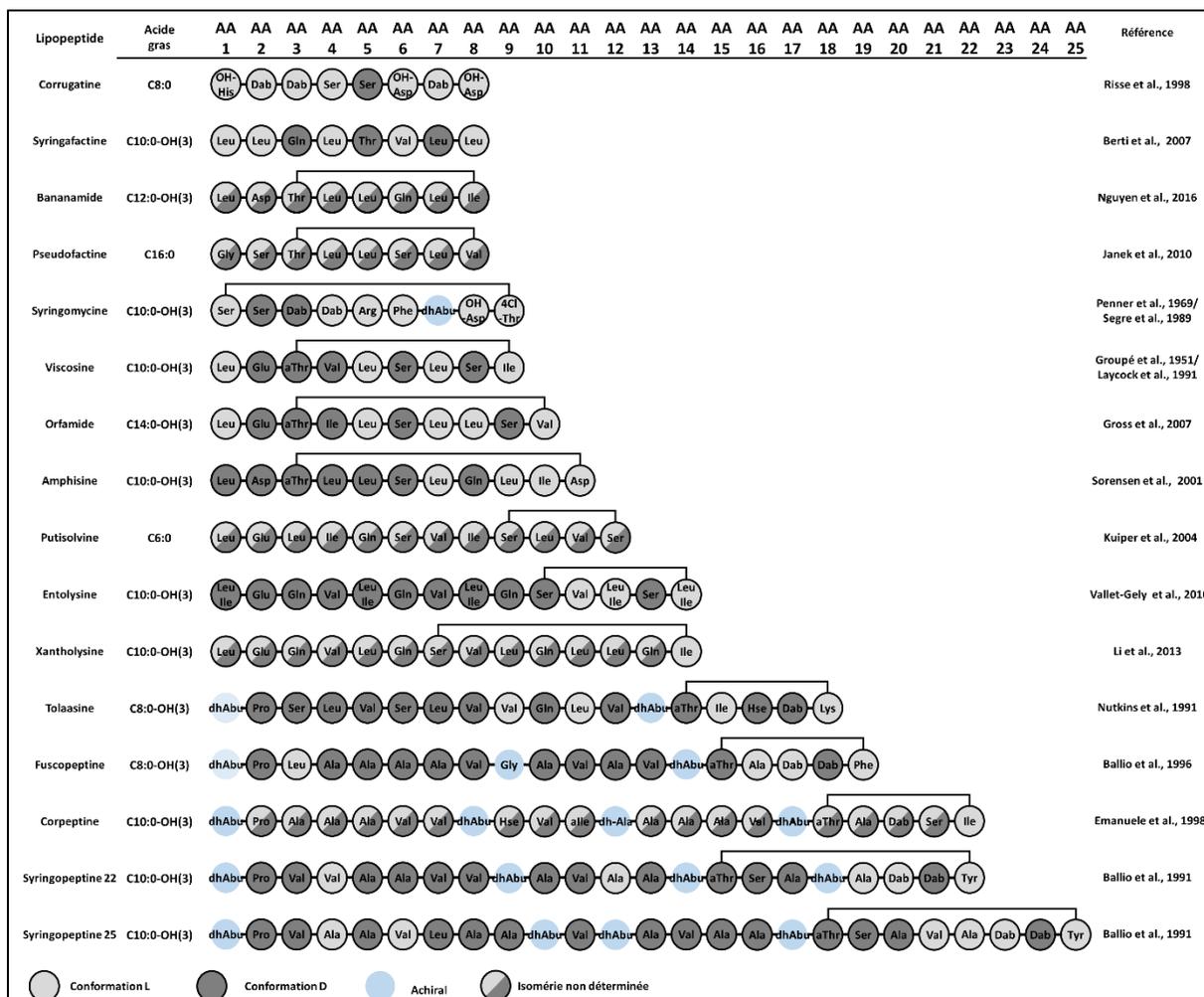


Figure 10 : Structure des molécules types de chaque famille de lipopeptides de *Pseudomonas* (adapté de Geudens et Martins, 2018)

Comme nous l'évoquions précédemment, au sein de chaque famille, la biodiversité structurale des lipopeptides a permis d'établir une hiérarchie supplémentaire sur deux niveaux. Aucune nomenclature n'a toutefois été établie pour définir les noms de ces deux niveaux. Dans ce manuscrit nous appellerons le premier niveau « Sous-famille » et le deuxième niveau « Variants ».

Les sous-familles d'une famille donnée varient au niveau de l'acide gras et/ou de la chaîne peptidique (un ou plusieurs acides aminés de différence). Elles sont issues de synthétases différentes et ne sont jamais co-produites par une même souche.

Les variants d'une même sous-famille varient, quant à eux, au niveau de l'acide gras et/ou de la chaîne peptidique (généralement un acide aminé de différence). Issus d'une même synthétase, ils peuvent être produits par une même souche. Les différences de structures entre les variants sont expliquées, d'une part, par l'absence de spécificité du domaine Cstarter, capable d'incorporer différentes chaînes d'acides gras et, d'autre part, par la flexibilité de certains domaines A (généralement un) de la synthétase qui sont capables d'incorporer des monomères structurellement proches (*e.g.* leucine, isoleucine ou valine).

Pour résumer, il existe plusieurs familles de lipopeptides, chacune d'entre elle est composée de plusieurs sous-familles, elles-mêmes représentées par plusieurs variants. Une souche donnée est capable de co-produire des lipopeptides appartenant à plusieurs familles différentes. Dans ce cas elle produira, pour chacune de ces familles, une unique sous-famille et un à plusieurs variants de cette sous-famille.

La classification en sous-familles et variants est ci-après détaillée pour les cinq familles de lipopeptides répertoriées chez le complexe *Pseudomonas syringae* à savoir syringafactine, syringomycine, corpeptine, syringopeptine 22 et syringopeptine 25.

Les lipopeptides de la famille des syringafactines sont composés d'un acide gras mono-hydroxylé de 10 à 12 atomes de carbones lié à une chaîne peptidique linéaire de 8 monomères (**Figure 11**). Cette famille est constituée de trois sous-familles : syringafactine (Berti et al. 2007), cichofactine (Pauwelyn et al. 2013) et virginiafactine (Götze et al. 2019), possédant chacune plusieurs variants dont les structures diffèrent au niveau de l'acide gras ou de l'acide aminé numéro 6. Seules les syringafactines et les cichofactines sont produites par des souches du complexe *P. syringae*.

	Lipopeptide	Masse exacte (Da)	Acide gras	AA 1 AA 2 AA 3 AA 4 AA 5 AA 6 AA 7 AA 8								Référence
				AA 1	AA 2	AA 3	AA 4	AA 5	AA 6	AA 7	AA 8	
Variants de la sous-famille des syringafactines	Syringafactine A	1081,74	C10:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Leu	Berti et al., 2007
	Syringafactine D	1109,77	C12:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	
	Syringafactine B	1095,75	C10:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	
	Syringafactine E	1123,78	C12:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	
	Syringafactine C	1095,75	C10:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	
	Syringafactine F	1123,78	C12:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	
Variants de la sous-famille des cichofactines	Cichofactine A	1108,75	C10:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Gln	Val	Leu	Leu	Pauwelyn et al., 2013
	Cichofactine B	1136,75	C12:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Gln	Val	Leu	Leu	
Variants de la sous-famille des virginiafactines	Virginiafactine A	1067,72	C10:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Leu	Leu	Götze et al., 2019
	Virginiafactine C	1095,75	C12:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	
	Virginiafactine B	1081,74	C10:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	
	Virginiafactine D	1109,77	C12:0-OH(3)	Leu	Leu	Gln	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	

Figure 11 : Structures des lipopeptides de la famille des syringafactines

Les lipopeptides de la famille des syringomycines sont constitués d'un acide gras mono ou dihydroxylé de 10 à 16 atomes de carbone. Leur chaîne peptidique cyclisée au niveau de la sérine en position 1 est composée de 9 monomères dont plusieurs sont non usuels (**Figure 12**). Parmi les 8 sous-familles recensées dans cette famille, 4 sont produites par des souches du complexe *P. syringae* (syringomycine, syringotoxine, syringastatine et pseudomycine).

Lipopeptide	Masse exacte (Da)	Acide gras	AA									Référence	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Syringomycine A1 Syringomycine E Syringomycine G	1196,56 1224,59 1252,62	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3) C14:0-OH(3)	Ser	Ser	Dab	Dab	Arg	Phe	dhAbu	OH-Asp	4Cl-Thr	Penner et al., 1969/ Segre et al., 1989	
Syringotoxine B	1135,55	C14:0-OH(3)	Ser	Dab	Gly	Hse	Orn	aThr	dhAbu	OH-Asp	4Cl-Thr		Gross and Devay 1977/ Ballio et al., 1990
Syringostatine A Syringostatine B	1178,59 1194,59	C14:0-OH(3) C14:0-OH(3,4)	Ser	Dab	Dab	Hse	Orn	aThr	dhAbu	OH-Asp	4Cl-Thr		
Pseudomycine A Pseudomycine B Pseudomycine C Pseudomycine C'	1222,58 1206,59 1250,62 1234,62	C14:0-OH(3,4) C14:0-OH(3) C16:0-OH(3,4) C16:0-OH(3)	Ser	Dab	Asp	Lys	Dab	aThr	dhAbu	OH-Asp	4Cl-Thr	Harrison et al., 1991/ Ballio et al., 1994	
Cormycine A	1273,60	C16:0-OH(3,4)	Ser	Orn	Asn	Hse	His	aThr	dhAbu	OH-Asp	4Cl-Thr		Scaloni et al., 2004
Thanamycine	1290,57	C16:0-OH(3,4)	Ser	OH-Orn	Asp	Hse	His	aThr	dhAbu	OH-Asp	4Cl-Thr	Mendes et al., 2011/ Johnston et al., 2015	
Nunamycine	1137,53	C14:0-OH(3)	Ser	Dab	Gly	Hse	Dab	Thr	Thr	OH-Asp	4Cl-Thr	Michelsen et al., 2015	
Brasmycine	≈ 1268	?	Ser	Orn	Asp	NRP	His	Thr	Thr	OH-Asp	4Cl-Thr	Zhao et al., 2019	

Figure 12 : Structures des lipopeptides de la famille des syringomycines

Les lipopeptides de la famille des corpeptines sont constitués d'un acide gras saturé ou mono-insaturé, mono-hydroxylé de 10 à 12 atomes de carbone. Leur chaîne peptidique, composée de 22 acides aminés dont plusieurs sont non usuels, comporte un cycle de 5 monomères prenant effet au niveau de l'allo-thréonine en position 18 (**Figure 13A**). Un des lipopeptides de cette famille, la sclérosine, est toutefois totalement linéaire (Berry et al. 2010, 2012). Parmi les différentes sous-familles de cette famille, cicho-peptine et cichorinotoxine sont produites par des souches du complexe *P. syringae* (*P. cichorii* SF1-54 et *P. cichorii* YM8705 respectivement).

Les syringopeptines 22 sont constituées d'un acide gras mono-hydroxylé de 10 à 14 atomes de carbone. La chaîne peptidique, composée de 22 acides aminés dont plusieurs sont non usuels comporte une partie cyclique de 8 monomères prenant effet au niveau de l'allo-thréonine en position 15 (**Figure 13B**). Les différentes sous-familles ont la particularité de toutes posséder deux variants ayant la même séquence peptidique mais un acide gras différent. Les syringopeptines 22 connues sont toutes produites par des souches de *Pseudomonas syringae* : *P. syringae* pv. *syringae* B301D et B3A : syringopeptines22, SC1 : syringopeptines SC, B728a et Y37 : syringopeptine 22phV et *P. syringae* pv. *lachrymans* 508 : syringopeptine 508.

Enfin, la famille des syringopeptines 25, qui est composée des plus longs lipopeptides connus à ce jour, tous microorganismes confondus, est représentée par une seule sous-famille possédant trois variants (**Figure 13C**). Ces variants ont un acide gras mono-hydroxylé de 10 à 12 atomes de carbone. La partie peptidique de 25 acides aminés, dont plusieurs sont non protéinogènes, comporte un cycle de 8 monomères prenant effet au niveau de l'allo-thréonine en position 18. La production des syringopeptines 25A et 25B est exclusivement connue chez *Pseudomonas syringae* (e.g. *P. syringae* pv. *syringae* B427 et B359 chez qui leur structure a été élucidée (Ballio et al., 1991). Le variant syringopeptine 25A [Phe25] a, quant à lui, été détecté chez *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB3869.

Certains monomères non usuels sont souvent retrouvés chez les lipopeptides produits par *P. syringae*. Parmi eux, l'acide hydroxy-aspartique (OH-Asp) et la 4-Chloro-Thréonine (4Cl-Thr) sont caractéristiques des syringomycines. L'acide 2,3-dehydro-2-aminobutyrique (dhAbu obtenu après déshydratation d'une thréonine) et l'acide 2,4-diaminobutyrique (Dab) sont retrouvés chez les syringomycines, les corpeptines et les syringopeptines 22 et 25 (Grgurina and Mariotti 1999; Götze and Stallforth 2019).

Lipopeptide	Masse exacte (Da)	Acide gras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Référence	
Corpeptine A	2049,21	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Hse	Val	alle	dh-Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Ile					Emmanuel et al., 1998
Corpeptine B	2120,22	C12:1(5)-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Hse	Val	alle	dh-Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Ile					Berry et al., 2010/ Berry et al., 2012
Sclérosine	2121,23	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Leu/Ile	Ala	Val	Val	dhAbu	Thr	Val	Leu/Ile	dh-Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	dhAbu	Ala	Dab	Ser	Val-OH					Berry et al., 2010/ Berry et al., 2012
Thanapeptine	2094,21	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Thr	Val	Leu/Ile	dh-Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Leu/Ile					Van der Voort et al., 2015
Nunapeptine	2036,17	C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	dhAbu	Ser	Val	Ile	dh-Ala	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	Thr	Ala	Dab	Ser	Ile					Michelsen et al., 2015
Cichopeptine A	2064,20	C12:1-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	Gly	Val	Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Leu/Ile					Huang et al., 2015
Cichopeptine B	2050,18	C12:1-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	Gly	Val	Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Val					Huang et al., 2015
Cichorinotoxine	2068,19	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	dhAbu	Ala	Val	Ile	Ser	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Val					Komatsu et al., 2019
Braspeptine	≈ 2175	?	dhAbu	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	dhAbu	Hse	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Dab	Val	NRP	Thr	Ala	Dab	Ser	Val					Zhao et al., 2019
Syringopeptine 22A	2143,20	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Ballio et al., 1991
Syringopeptine 22B	2171,24	C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Isogai et al., 1995
Syringopeptine SC1	2157,22	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	dh-Ala	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Isogai et al., 1995
Syringopeptine SC2	2185,25	C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	dh-Ala	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Isogai et al., 1995
Syringopeptine 22phVA	2129,19	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Grgurina et al., 2002
Syringopeptine 22phVB	2157,22	C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Grgurina et al., 2002
Syringopeptine 508A	2187,27	C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Grgurina et al., 2005
Syringopeptine 508B	2215,30	C14:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr					Grgurina et al., 2005
Syringopeptine 25A	2398,36	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	dhAbu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr		Ballio et al., 1991
Syringopeptine 25B	2426,39	C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	dhAbu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr		Ballio et al., 1991
Syringopeptine 25A [Phe25]	2382,37	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	dhAbu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Phe		Scaloni et al., 1997

Conformation L

Conformation D

Isomérisie non déterminée

Achirale

Isomérisie déterminée par bioinformatique

Structure et isomérisie déterminées par bioinformatique uniquement

Figure 13 : Structure des lipopeptides des familles des corpeptines (A), des syringopeptines 22 (B) et des syringopeptines 25 (C)

3.3. Les activités des lipopeptides de *Pseudomonas*

Du fait de leur variabilité de structures, les lipopeptides de *Pseudomonas* couvrent un large éventail d'activités qui inclut l'interaction avec les surfaces, l'action sur les composés exogènes, l'interaction avec les autres organismes et l'interaction avec les membranes végétales (**Figure 14**).

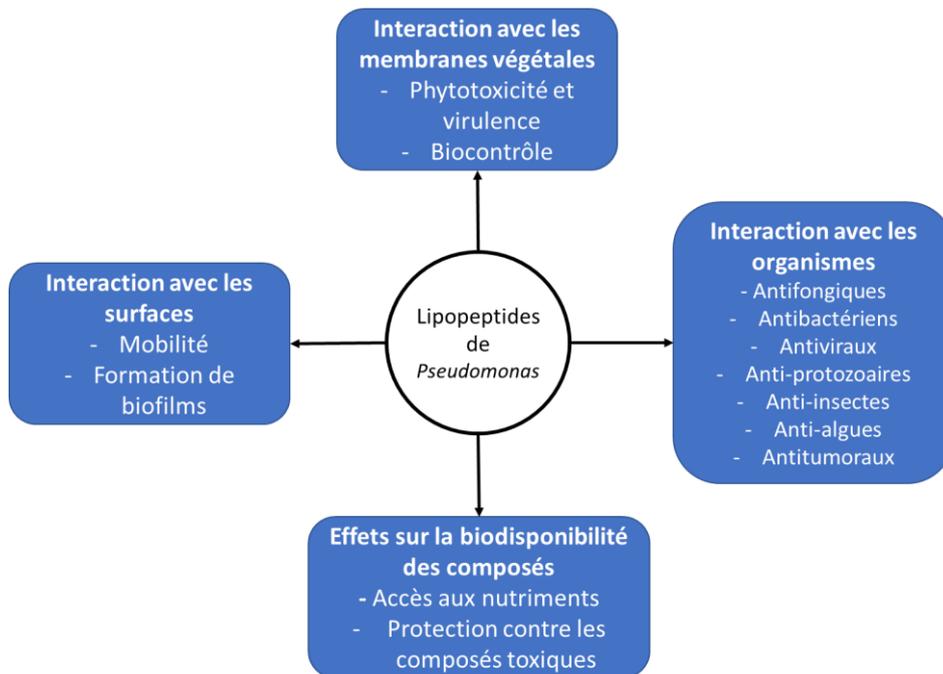


Figure 14 : Fonctions biologiques des lipopeptides de *Pseudomonas*

- **Interaction avec les surfaces**

Le caractère amphiphile des lipopeptides leur confère des propriétés tensioactives, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité de réduire la tension de surface entre deux liquides ou entre un liquide et un solide. Ces propriétés, couplées à l'activité des flagelles chez *Pseudomonas*, permettent aux souches productrices de se déplacer sur les surfaces solides au moyen de différents mécanismes tels que le swarming (traduction française : fourmillement) (Geudens and Martins 2018; Götze and Stallforth 2019). Certains lipopeptides tels que les tolaasines I et II et les sessilines ne sont toutefois pas impliqués dans ce mécanisme (Götze and Stallforth 2019). Les lipopeptides sont également des agents mouillants, capables, par exemple, de modifier la viscosité à la surface des feuilles des végétaux et ainsi favoriser la mobilité bactérienne (Lindow and Brandl 2003; D'aes et al. 2010).

Les lipopeptides de *Pseudomonas* sont également impliqués dans la régulation des biofilms en favorisant (e.g. Massetolide A, sessilines, xantholysines) ou en inhibant (e.g. viscosine, White Line Inducing Principle-WLIP, orfamide B, arthrofactine, putisolvines, cichofactines) leur production (Geudens and Martins 2018; Götze and Stallforth 2019). Les mécanismes mis en jeu dans cette régulation n'ont pas encore été élucidés. Toutefois, les différentes activités observées seraient dues aux propriétés physicochimiques variables des lipopeptides et de leurs effets au niveau du substrat et/ou de la surface cellulaire des souches productrices (de Bruijn et al. 2008; Raaijmakers et al. 2010).

- **Effets sur la biodisponibilité des composés**

Grâce à leurs activités biosurfactantes et bioémulsifiantes, les lipopeptides facilitent l'accès des souches qui les produisent aux nutriments environnants en accroissant la mouillabilité des surfaces et en solubilisant les composés carbonés hydrophobes peu solubles (Ron and Rosenberg 2001; Dubern et al. 2005). Certains lipopeptides comme les syringafactines ont également des propriétés hygroscopiques qui leur permettent d'augmenter la disponibilité de l'eau dans des atmosphères à forte humidité relative, ce qui contribue au développement et à l'expansion des bactéries, notamment à la surface des tissus végétaux (Burch et al. 2014; Hernandez and Lindow 2019).

Par leurs propriétés biosurfactantes, les lipopeptides jouent aussi un rôle important dans la protection des bactéries contre les composés toxiques tels que les métaux lourds et les hydrocarbures via leur encapsulation dans des micelles (D'aes et al. 2010).

- **Interaction avec les autres organismes**

L'activité antivirale est une des propriétés des lipopeptides de *Pseudomonas*. Elle a pour la première fois été mise en évidence en 1951 lorsque l'équipe de Groupé montrait que la viscosine était capable d'inhiber et d'inactiver plusieurs virus humains à enveloppe dont ceux de la bronchite et de la grippe A (Groupé et al. 1951). Comme montré chez la surfactine, un lipopeptide produit par *Bacillus*, les lipopeptides seraient capables de perturber l'enveloppe de ces virus, menant ainsi à leur destruction (Raaijmakers et al. 2006).

Parmi les activités des lipopeptides des *Pseudomonas* on recense également (Geudens and Martins 2018; Götze and Stallforth 2019) :

- La lyse des protozoaires causée par certains lipopeptides des familles des viscosines, des amphisines et des syringomycines
- L'activité insecticide des orfamides A et B et des sessilines (familles des tolaasines) qui survient lors de l'ingestion de ces lipopeptides par les insectes cibles
- L'inhibition de croissance de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* causée par l'orfamide A
- L'activité amibicide de la jessenipeptine (famille des tolaasines) à l'encontre de *Dictyostelium discoideum*, espèce d'amibe modèle de laboratoire (Arp et al. 2018)
- L'activité anti-tumorale qui a par exemple été montrée avec la viscosine et la pseudofactine II.

Certains lipopeptides de *Pseudomonas* ont également montré des propriétés antibactériennes. A titre d'exemple, les syringopeptines 22A et 25A, ainsi que les corpeptines, les tolaasines et le WLIP (famille des viscosines), sont actifs contre *Bacillus megaterium*. Les syringopeptines et les viscosines (excepté le WLIP et les massetolides) sont également actives contre plusieurs souches de *Staphylococcus aureus*. Dans la plupart des cas, les lipopeptides testés ont en revanche été incapables d'inhiber la croissance des bactéries Gram-. Cette inactivité est généralement attribuée à la présence de la membrane externe qui agit comme un rempart, empêchant les lipopeptides d'atteindre la membrane interne et de perturber son organisation (Raaijmakers et al. 2010; Geudens and Martins 2018). La tolaasine I et les xantholysines A et C ont toutefois montré des activités contre des bactéries Gram- telles que *Escherichia coli* ou certaines espèces de *Pseudomonas* (Lo Cantore et al. 2006; Molina-Santiago et al. 2015).

Enfin, de nombreux lipopeptides identifiés chez le genre *Pseudomonas*, possèdent des propriétés antifongiques. Ces propriétés peuvent se traduire de différentes manières : inhibition de croissance mycélienne, inhibition de la germination ou lyse des spores, modifications morphologiques telles que renflements des hyphes ou augmentation des ramifications. Ainsi, plusieurs lipopeptides des familles des viscosines, des amphisines, des orfamides, des putisolvines et des tolaasines se sont révélés actifs contre un ou plusieurs champignons tels que *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* ou encore *Pythium ultimum* (Geudens and Martins 2018). Les lipopeptides produits par les souches du complexe *P. syringae* présentent aussi des activités antifongiques intéressantes. Les lipopeptides appartenant aux familles des syringomycines et des syringopeptines (22 et 25) se sont, en effet, avérés très efficaces contre plusieurs champignons (*Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, etc.) (Lavermicocca et al. 1997; De Lucca et al. 1999; Woo et al. 2002; Fiore et al. 2008b; Kawasaki et al. 2016). A noter que des variations d'activité peuvent être observées entre différentes sous-familles d'une même famille et entre les variants d'une même sous-famille. D'après l'équipe de Balleza, ces différences sont dues à la fois à la composition en acides aminés et à la taille de l'acide gras des lipopeptides (Balleza et al. 2019).

En ce qui concerne leur mécanisme d'action, les lipopeptides, grâce à leur nature amphiphile, sont capables de s'insérer dans la bicouche lipidique engendrant ainsi la formation de pores au niveau de la membrane plasmique. Ces pores étant perméables aux cations monovalents et divalents, il en résulte une augmentation de l'influx d'ions H^+ et Ca^{2+} et de l'efflux d'ions K^+ ayant pour conséquence première, la chute du gradient de pH transmembranaire. Dans un second temps, l'influx non contrôlé d'ions Ca^{2+} induit diverses voies de signalisation faisant intervenir le calcium et menant à la mort cellulaire (Geudens and Martins 2018). Chez les champignons, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium induit également une inactivation des microtubules en charge du maintien des mitochondries, ayant pour conséquence une déformation des hyphes. Cela a par exemple été montré avec le viscosinamide (famille des viscosines) chez *Rhizoctonia solani* (Hansen et al. 2000). La présence de certaines molécules au niveau de la bicouche lipidique jouerait également un rôle primordial dans l'activité des lipopeptides. Il a par exemple été montré que l'activité de la syringomycine E contre *Saccharomyces cerevisiae* dépendait de la présence de sphingolipides hydroxylés en C4 au niveau de la membrane plasmique de la levure (Kaulin et al. 2005).

Enfin, la structure des lipopeptides joue indéniablement un rôle dans leur activité. Agner et al., (2000) montraient par exemple que la syringopeptine 22A possédait une capacité à former des pores bien plus importante que celle de la syringomycine E (Agner et al. 2000).

- Interaction avec les membranes des végétaux

Les lipopeptides produits par les souches de *Pseudomonas* jouent un rôle clé dans les interactions plantes/bactéries. Certains sont des facteurs de virulence de souches phytopathogènes tandis que d'autres exercent une activité de biocontrôle à l'encontre des bio-agresseurs des plantes.

Les lipopeptides, agents de virulence, agissent en améliorant la colonisation des tissus végétaux par les souches phytopathogènes comme cela a été montré pour la viscosine produite par *P. fluorescens* 5064 (Hildebrand et al. 1998) et, pour nombre d'entre eux, en exerçant une activité phytotoxique au niveau des membranes végétales. Le mode d'action de l'activité phytotoxique est très similaire à celle observée pour l'activité antimicrobienne décrite ci-dessus. Elle consiste en la formation de canaux ioniques au niveau des membranes plasmiques, entraînant une fuite d'ions et donc une chute du gradient de pH ainsi qu'une libération non contrôlée de métabolites végétaux. Il en résulte une nécrose des tissus végétaux attaqués. A ce jour, les lipopeptides ayant montré de telles activités appartiennent aux familles des syringafactines (*i.e.* cichofactine)(Pauwelyn et al. 2013), syringomycines (Sinden et al. 1971; Gonzalez et al. 1981; Isogai et al. 1989; Harrison et al. 1991; Scaloni et al. 2004), fuscopeptines (Ballio et al. 1996), corpeptines (Huang et al. 2015; Strano et al. 2015) et syringopeptines 22 et 25 (Vassilev et al. 1996; Hutchison and Gross 1997; Grgurina et al. 2002).

Précisons qu'il a été montré avec la syringomycine et la syringopeptine, que les lipopeptides sont des agents de virulence qui amplifient l'affection causée par la souche phytopathogène mais qu'ils n'en sont pas directement responsables, la maladie ayant toujours lieu en leur absence (Scholz-schroeder et al. 2001a). Par ailleurs, l'activité phytotoxique des lipopeptides est très dépendante de leur concentration. Certaines souches de *P. syringae* non pathogènes produisent de la syringomycine dans des quantités suffisantes pour induire une faible libération de métabolites végétaux sans pour autant causer de symptômes nécrotiques (Lindow and Brandl 2003).

D'autres lipopeptides, produits par des souches de *Pseudomonas* évoluant dans la rhizosphère, ont montré des activités de biocontrôle. Ils permettent en effet de protéger les racines des plantes contre les agents phytopathogènes bactériens ou fongiques.

Certains lipopeptides tels que le massetolide A (familles des viscoïnes) produit par *P. fluorescens* SS101 exercent cette protection de manière indirecte en élicitant les défenses de la plante (Tran et al. 2007). On parle alors de Résistance Systémique Induite (RSI ou ISR de l'anglais Induced Systemic Resistance). Ce mécanisme qui fait intervenir des phytohormones telles que l'acide jasmonique ou l'éthylène, permet à la plante d'éveiller son système de défense en prévision d'une attaque ultérieure.

D'autres lipopeptides exercent ce biocontrôle de manière directe au moyen de leurs activités antimicrobiennes. Par exemple, les poaeamides (familles des orfamides) produits chez *P. poae* RE*1-1-14 protègent les racines de la betterave à sucre contre divers champignons tels que *Rhizoctonia solani* ou *Pythium ultimum* (Zachow et al. 2015). La nunamycine (famille des syringomycines) et la nunapeptine (famille des corpeptines) produites par la souche *P. fluorescens* In5 offrent une protection aux pommes de terre contre *Rhizoctonia solani* et *Pythium aphanidermatum* respectivement (Michelsen et al. 2015).

4. Le patho-système blé-septoriose

4.1. Le marché du blé tendre

D'après l'OAA (Organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) ou FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 214 291 888 hectares de blé ont été récoltés à travers le monde en 2018, soit une production de 734 045 174 tonnes de blé. L'Europe est le deuxième producteur mondial derrière l'Asie avec 33% de part de production (*Figure 15*)(FAO 2018).

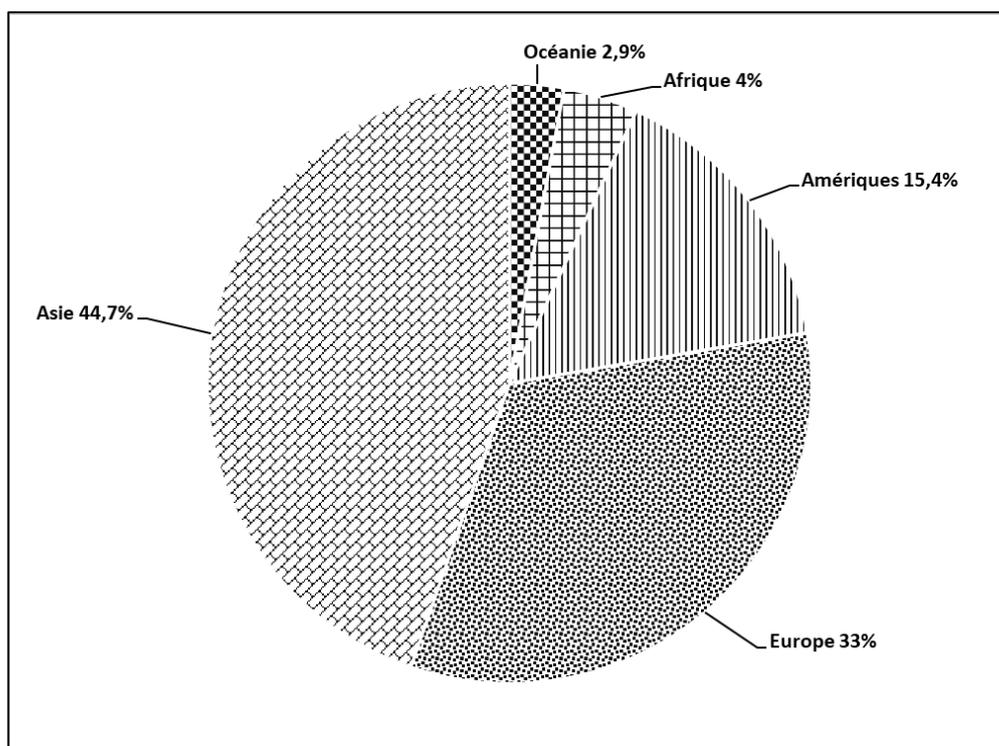


Figure 15 : Répartition de la production de blé mondiale par continent (Source FAO, 2018)

Parmi les pays européens, la France est le 1^{er} producteur et exportateur de céréales. Ce sont 9,5 millions d'hectares qui sont cultivés en moyenne chaque année, 53% des cultures étant dédiées au blé tendre (FranceAgriMer, Février 2018). Concernant le blé, la France a été le 5^{ème} producteur mondial en 2017 avec 36 924 938 tonnes produites dont plus de 4 millions de tonnes produites dans la région Hauts-de-France, région la plus productrice (FranceAgrimer, Février 2018 ; FAO, 2017).

4.2. La septoriose du blé

La culture du blé est entravée par plusieurs maladies cryptogamiques qui se développent dans différents endroits du globe en fonction du type de climat et qui peuvent toucher un ou plusieurs organes de la plante. Parmi ces maladies on recense les rouilles, la fusariose, l'helminthosporiose, l'oïdium, la pyriculariose et la septoriose, cette dernière étant économiquement la plus préjudiciable (Figuerola et al. 2018).

La septoriose du blé englobe deux maladies causées par deux champignons phytopathogènes distincts : *Stagonospora nodorum* (= *Septoria nodorum* ou *Phaeosphaeria nodorum*) qui s'attaque aux feuilles et aux épis et *Zymoseptoria tritici* (= *Septoria tritici* ou *Mycosphaerella graminicola*) atteignant exclusivement les feuilles, ce deuxième champignon étant de loin le plus répandu (ARVALIS 2013).

Les paragraphes qui vont suivre ont pour but de présenter l'incidence économique de la septoriose du blé puis de présenter les symptômes de la maladie et le cycle infectieux du champignon.

- **Incidence économique**

La septoriose causée par *Zymoseptoria tritici* (connue en anglais sous le nom « *Septoria tritici blotch* ») engendre des pertes de rendement considérables pouvant atteindre 50% des récoltes, notamment lorsqu'aucun traitement fongicide n'est employé et que des variétés de blé sensibles sont utilisées. En France, les traitements antifongiques destinés à la lutte contre ce champignon ont un coût annuel de près de 500 millions d'euros et représentent près de 70% des traitements effectués sur blé. En dépit de cette lutte chimique, une diminution de rendement de 5% à 10% est en moyenne observée chaque année, ce qui équivaut à des pertes allant de 350 à 700 millions d'euros (Fones and Gurr 2015).

- **Symptômes**

La maladie se manifeste initialement par l'apparition de taches jaunes appelées chloroses au niveau des feuilles. Ces taches vont s'agrandir en prenant des formes rondes, ovales ou allongées tout en évoluant vers une couleur brunâtre ce qui est signe de la présence de lésions nécrotiques. Au niveau des nécroses, le pathogène prolifère sous forme de petites pustules noires visibles à l'œil nu, les pycnides, à l'intérieur desquelles sont produites les pycnidiospores (reproduction asexuée du champignon) (**Figure 16**). Il y a ensuite coalescence des zones nécrotiques, qui dans les cas sévères, peuvent recouvrir la totalité de la feuille (Kema et al. 1996; ARVALIS 2013).

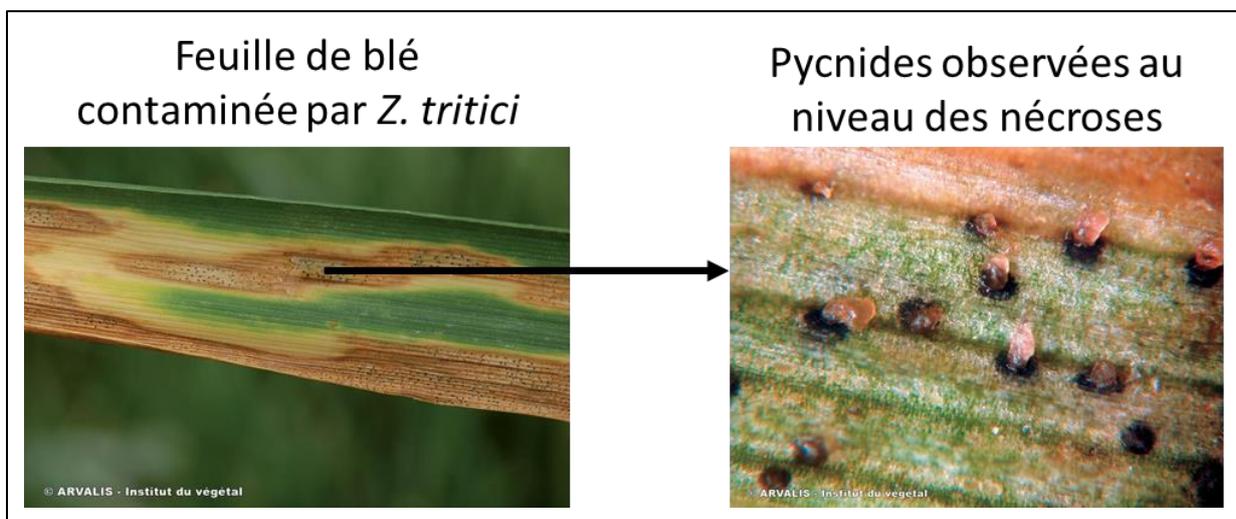


Figure 16 : Feuille de blé infectée par le champignon phytopathogène *Zymoseptoria* (ARVALIS 2013)
Les tissus sont touchés sont chlorosés (couleur jaune) ou nécrosés (couleur brune) avec présence de pycnides à la surface de la feuille

- **Cycle infectieux de la maladie**

Le champignon *Zymoseptoria tritici* est un ascomycète qui se reproduit de manière asexuée ou sexuée. La reproduction asexuée se fait par l'intermédiaire des pycnidiospores qui se multiplient à l'intérieur des pycnides. Les pycnidiospores se disséminent essentiellement de manière locale grâce aux éclaboussures, en cas de pluie. La reproduction sexuée se fait par l'intermédiaire des ascospores qui se multiplient dans des structures appelées périthèces. A l'inverse des pycnidiospores, elles peuvent être disséminées sur des centaines de kilomètres par voie aérienne (Steinberg 2015).

Ce champignon phytopathogène est hémibiotrophe, son cycle d'infection se divise donc en deux phases : une phase de latence dite biotrophe d'environ 10 à 15 jours au cours de laquelle le champignon se développe dans les tissus foliaires sans causer de symptômes puis une phase nécrotrophe avec mort des cellules végétales. Le cycle infectieux de *Z. tritici* est illustré dans la **Figure 17**.

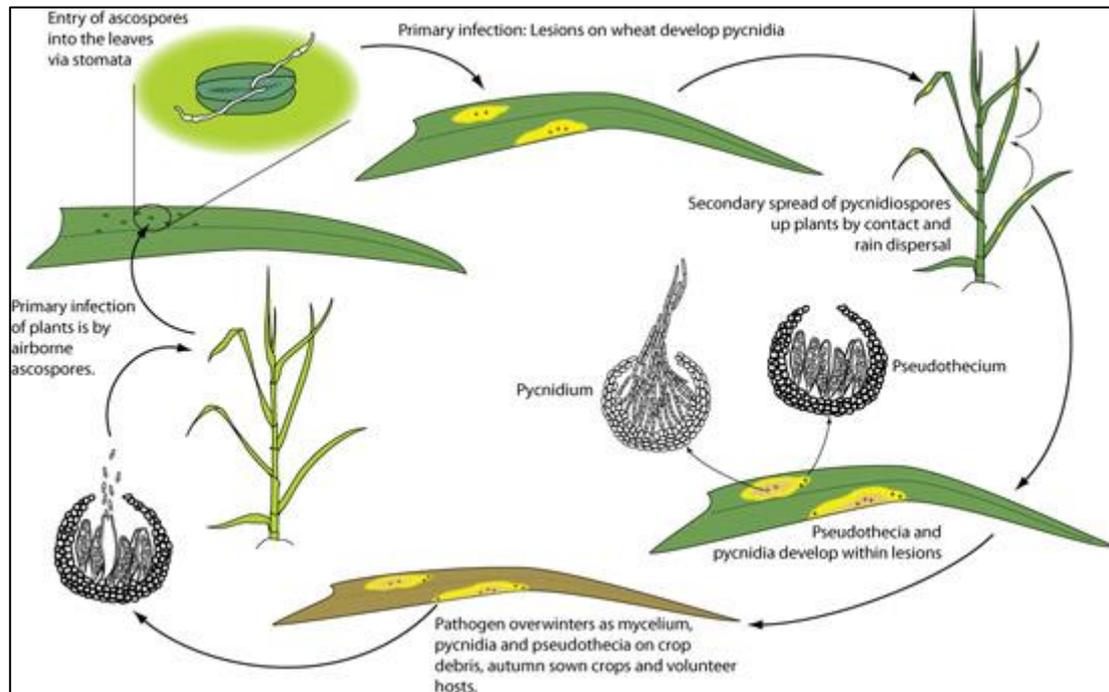


Figure 17 : Cycle infectieux de *Zymoseptoria tritici* sur blé (Ponomarenko et al. 2011)

L'infection par *Z. tritici* débute par la germination d'ascospores (arrivées par voie aérienne) ou de pycnidiospores (issues des débris des cultures précédentes et dispersées par la pluie) au niveau des feuilles de blé. Cette germination est conditionnée par une humidité relative élevée et une température avoisinant les 20°C (Magboul et al. 1992). Les hyphes (=filaments mycéliens) issus de la germination infiltrent les cavités sous-stomatiques en passant essentiellement par les stomates puis les colonisent progressivement avant d'envahir les régions intercellulaires environnantes (Kema et al. 1996). Cette colonisation est rapidement suivie par la formation des pycnides et l'entrée du champignon en phase nécrotique au cours de laquelle la biomasse fongique augmente rapidement. Lorsque la présence d'eau est suffisante, les pycnides gonflent puis libèrent les pycnidiospores qu'elles contiennent dans une gelée protectrice appelée « cirrhe ». Ces dernières sont disséminées sur les feuilles adjacentes grâce aux éclaboussures de pluie (Eyal et al. 1987). Notons que dans certains cas, la formation des pycnides est suivie par la formation des périthèces à l'intérieur desquelles sont produites les ascospores (Kema et al. 1996).

4.3.Moyens de luttres contre la septoriose

Aujourd'hui, la lutte contre la septoriose du blé repose essentiellement sur la sélection de variétés de blé résistantes et l'utilisation de fongicides chimiques.

La résistance du blé contre *Zymoseptoria tritici* peut être qualitative ou quantitative (Ponomarenko et al. 2011; Brown et al. 2015). La résistance qualitative dépend de quelques gènes majeurs qui confèrent une résistance totale à la plante, 21 d'entre eux ayant été découverts à ce jour. Ce type de résistance étant très spécifique du champignon pathogène ciblée, elle est souvent rapidement contournée par ce dernier. La résistance quantitative permet quant à elle de réduire l'incidence de la maladie à défaut de l'enrayer. Elle est contrôlée par plusieurs secteurs génomiques appelées Quantitative Trait Loci (QTL) et meta-QTL, 89 d'entre eux ayant été identifiés chez le blé. Moins spécifique que la résistance qualitative, elle est moins exposée à l'adaptation du pathogène. Une liste des variétés résistantes à la septoriose est disponible sur le site internet d'Arvalis, l'Institut du Végétal (<http://www.fiches.arvalis-infos.fr/>).

Les fongicides chimiques les plus utilisés sont les inhibiteurs de la déméthylation (Demethylation Inhibitors DMIs), les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (Succinate Dehydrogenase Inhibitors SDHIs) et les fongicides à action multisites (Torriani et al. 2015). Cependant, l'utilisation massive de ces produits, en préventif ou en curatif, favorise l'émergence de souches de *Zymoseptoria tritici* résistantes, ce qui réduit grandement leur efficacité en champs. Ces produits conventionnels présentent également le désavantage de générer des impacts sévères sur la biodiversité et la santé humaine. Pour ces raisons, certains d'entre eux sont progressivement retirés du marché des produits phytopharmaceutiques. C'est le cas de l'époxiconazole de la famille des azoles et du chlorothalonile de la famille des organochlorés qui ont longtemps été utilisés dans la lutte contre la septoriose du blé.

A ce jour, il existe peu de solutions de biocontrôle comme alternatives aux pesticides chimiques pour lutter contre la septoriose du blé. En France, seules deux molécules figurent sur la liste des produits phytopharmaceutiques autorisés (Source E-Phy) :

- Les laminarines commercialisées sous les noms IODUS 2 CEREALES et VACCIPLANT sont des polysaccharides issus d'algues brunes dont l'action consiste à stimuler les défenses naturelles des céréales

- Le soufre commercialisé sous plusieurs noms tels qu'HELIOSOUFRE S ou ACTIOL est un composé minéral utilisé pour son action fongicide. Il est notamment utilisé en compléments des fongicides conventionnels.

Aucune solution de biocontrôle à base de microorganismes n'a pour le moment obtenue d'autorisation de mise sur le marché. Pourtant, de nombreuses recherches scientifiques ont montré que des microorganismes ou des extraits de culture de microorganismes pouvaient être efficaces dans la lutte contre *Zymoseptoria tritici* (Binalf and Shifa 2018). Les souches concernées appartiennent essentiellement aux genres *Trichoderma* (Perelló et al. 2009; Stocco et al. 2015), *Paenibacillus* (Samain et al. 2017), *Bacillus* (Alippi et al. 2000; Kildea et al. 2008), *Lactobacillus* (Lynch et al. 2016) et *Pseudomonas* (Levy et al. 1988, 1989, 1992; Flaishman et al. 1990, 1996).

Chez *Bacillus* et *Pseudomonas*, les lipopeptides sont considérés comme étant les principales molécules responsables des activités antifongiques observées (Ongena and Jacques 2008; Geudens and Martins 2018). Ainsi, les lipopeptides produits chez *Bacillus subtilis* ont montré des effets intéressants contre la septoriose du blé. Mejri et al., (2017) ont montré que la surfactine, la fengycine et la mycosubtiline, appliquées sur feuilles de blé avant infection, étaient toutes capables de réduire l'incidence de la maladie, par rapport à un témoin non traité. La mycosubtiline, le lipopeptide le plus efficace, présente un effet fongicide direct alors que les deux autres lipopeptides stimuleraient les défenses des plantes (Mejri et al. 2017). Les auteurs ont également montré qu'une synergie mycosubtiline/fengycine permettait d'obtenir un effet optimal avec une réduction des symptômes allant jusqu'à 82%. Plus tard, Le Mire et al., (2018), a confirmé l'activité de la surfactine et montré qu'elle stimulait la défense du blé via l'activation des voies de signalisation dépendant de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique (Le Mire et al. 2018).

Ces activités observées pour les lipopeptides de *Bacillus* sont certainement transposables aux lipopeptides de *Pseudomonas* dont beaucoup ont montré des activités antifongiques très intéressantes (Geudens and Martins 2018).

Objectifs de la thèse

La situation agricole actuelle, présentée dans l'introduction bibliographique, fait état d'un besoin grandissant d'identifier de nouvelles solutions de biocontrôle pour compléter, voire remplacer, l'utilisation des pesticides chimiques de synthèse.

En réponse à ce besoin, ces travaux de thèse ont eu pour objectif d'évaluer le potentiel de biocontrôle de souches appartenant au complexe *P. syringae*, bactéries connues pour leurs activités antifongiques sur plusieurs pathosystèmes. Ces travaux ont été scindés en deux axes :

1. L'élucidation de la diversité structurale des lipopeptides du complexe *P. syringae*, incluant l'identification de nouveaux lipopeptides, car ces molécules sont connues comme étant impliquées dans les activités antifongiques de ces souches
2. L'évaluation de l'application des souches de *P. syringae* en biocontrôle

Concernant le premier axe de recherche, deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour identifier et élucider la diversité structurale des lipopeptides produits :

- des analyses bioinformatiques visant à déterminer, *in silico*, le potentiel de synthèse des souches via la recherche des séquences signatures des domaines enzymatiques des NRPSs
- des analyses de spectrométrie de masse ayant pour but de déterminer la production effective des souches, *in vitro*

La fréquence de production des différents lipopeptides et le lien entre les profils de production des souches et leur classification phylogénétique, ont également été étudiés.

Le deuxième axe de recherche a, dans un premier temps, porté sur l'estimation de l'activité antifongique des souches *in vitro* et leur capacité à excréter des molécules actives, en cultures liquides. Dans un second temps, l'évaluation de l'effet de protection (absence de phytotoxicité, réduction de la maladie) des souches antifongiques a été réalisée, *in planta*, sur plants de blé.

En recoupant les informations obtenues au travers de ces deux axes, l'objectif était de confirmer l'implication des lipopeptides dans les activités antifongiques, d'identifier les profils de production des souches antifongiques et de faire un lien avec leur classification phylogénétique. *In fine*, le but était d'identifier de nouveaux lipopeptides antifongiques, utilisables en biocontrôle, notamment dans le cadre de la lutte contre la septoriose du blé.

Matériels et Méthodes

1. Souches et milieux

1.1. Diversité de la collection de *Pseudomonas*

Les 709 souches de *Pseudomonas* utilisées dans ce travail ont été fournies par l'équipe de Cindy Morris de l'Unité de Recherche de Pathologie Végétale de l'INRAE d'Avignon (84140, Montfavet, France) (**Tableau 2**). Ce sont des souches du complexe *P. syringae* (*i.e.* *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. cannabina*, *P. viridiflava*) issues de la collection décrite par Berge et al. (2014). Elles ont été prélevées dans différents sites (principalement en France) et différents environnements : milieux aqueux et biofilms épilithiques (59,8%), milieux neigeux (16,9%), plantes (9%), eaux de précipitations (7,3%) et débris de feuilles (7%). Ces souches sont réparties dans les 13 phylogroupes et 23 des 24 clades identifiés chez *P. syringae* : 01a, 01b, 02a, 02b, 02c, 02d, 02e, 03, 04, 05, 06, 07a, 07b, 08, 09a, 09b, 09c, 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10f, 10g, 10f, 11, 12a, 12b, 13a et 13b (Parkinson et al. 2011; Berge et al. 2014). Seul le clade 02f identifié par Hall et al. (2019), n'est pas représenté. La collection couvre donc une grande partie de la diversité phylogénétique connue chez *P. syringae*.

Tableau 2 : Liste des souches de *Pseudomonas* utilisées dans cette étude

PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine
01a	AI009	Nouvelle-Zélande	01a	SZB0007	Fr (Sauze, 06)	02b	AI0024	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0586	Fr (Ceillac, 05)
01a	AI0047	Nouvelle-Zélande	01a	SZB0015	Fr (Sauze, 06)	02b	AI0027	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0587	Fr (Ceillac, 05)
01a	AI0074	Nouvelle-Zélande	01a	SZB0069	Fr (Sauze, 06)	02b	AI0042	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0588	Fr (Ceillac, 05)
01a	AI0082	Nouvelle-Zélande	01b	CC1416	USA (Gallatin Cy, MT)	02b	AI0061	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0633	Fr (Ceillac, 05)
01a	AI0089	Nouvelle-Zélande	01b	CC1427	USA (Park Cy, MT)	02b	AI0064	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0644	Fr (Ceillac, 05)
01a	CC1594	Fr (St Saturnin les Avignon, 84)	01b	CC1429	USA (Park Cy, MT)	02b	AI0066	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0701	Fr (Ceillac, 05)
01a	CC1630	USA (Bozeman, Montana)	01b	CC1430	USA (Park Cy, MT)	02b	AI0068	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0902	Fr (Ceillac, 05)
01a	CCV0461	Fr (Vars, 05)	01b	CC1432	USA (Park Cy, MT)	02b	AI0073	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0938	Fr (Ceillac, 05)
01a	CCV0467	Fr (Vars, 05)	01b	CC1544	Fr (Lac de forêtant, 05)	02b	AI0075	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0956	Fr (Ceillac, 05)
01a	CCV0491	Fr (Vars, 05)	01b	CC1556	Fr (Col Vieux, 05)	02b	AI0077	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0977	Fr (Ceillac, 05)
01a	CCV0502	Fr (Vars, 05)	01b	CC1558	Fr (Col Vieux, 05)	02b	AI0083	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0977	Fr (Ceillac, 05)
01a	CCV0611	Fr (Vars, 05)	01b	CC1673	Fr	02b	AI0084	Nouvelle-Zélande	02b	CCV0088	Fr (Vars, 05)
01a	CLA0235	Fr (Lautaret, 05)	01b	CC1675	Fr (Ceillac, 05)	02b	AI0116	Nouvelle-Zélande	02b	CCV0096	Fr (Vars, 05)
01a	CMO0002	Fr (Montfavet, 84)	01b	CC1676	Fr	02b	AI0127	Nouvelle-Zélande	02b	CCV0135	Fr (Vars, 05)
01a	CMO0017	Fr (Montfavet, 84)	01b	CCE0245	Fr (Ceillac, 05)	02b	AI0130	Nouvelle-Zélande	02b	CCV0139	Fr (Vars, 05)
01a	CMO0050	Fr (Montfavet, 84)	01b	CEB0020	Fr (Ceillac, 05)	02b	AI0131	Nouvelle-Zélande	02b	CCV0169	Fr (Vars, 05)
01a	CMW0036	Fr (Caumont sur Durance, 84)	01b	CFBP7285	Italie (Veneto)	02b	AI0134	Nouvelle-Zélande	02b	CCV0177	Fr (Vars, 05)
01a	CST0002	Fr (Saint-Saturnin, 84)	01b	CFBP7286	Italie (Lazio)	02b	BOW0004	Fr (Montfavet, 84)	02b	CCV0208	Fr (Vars, 05)
01a	CST0094	Fr (Saint-Saturnin, 84)	01b	CLA0509	Fr (Lautaret, 05)	02b	CC0001	Fr (Montauban, 82)	02b	CCV0416	Fr (Vars, 05)
01a	CSZ0223	Fr (Sauze, 06)	01b	CSZ0174	Fr (Sauze, 06)	02b	CC0023	Maroc (Agadir)	02b	CCV0420	Fr (Vars, 05)
01a	CSZ0259	Fr (Sauze, 06)	01b	CSZ0343	Fr (Sauze, 06)	02b	CC0024	Maroc (Agadir)	02b	CCV0523	Fr (Vars, 05)
01a	CSZ0279	Fr (Sauze, 06)	01b	JD20	Japon	02b	CC0037	Fr (Toulouse, 31)	02b	CCV0553	Fr (Vars, 05)
01a	CSZ0292	Fr (Sauze, 06)	01b	JD22	USA	02b	CC0125	Fr (Castelnau, 46)	02b	CCV0609	Fr (Vars, 05)
01a	CSZ0326	Fr (Sauze, 06)	01b	KW30	Japon (Shizuoka)	02b	CC0354	Fr (SRPV 31)	02b	CCV0623	Fr (Vars, 05)
01a	CSZ0350	Fr (Sauze, 06)	01b	PA429	Japon	02b	CC0412	Fr (Quercy, 46)	02b	CFBP1392	UK
01a	GAW0231	Fr (Gadagane, 84)	01b	PA459	Japon	02b	CC1434	Fr (Vaucluse, 84)	02b	CFBP1906	Fr
01a	GAW0236	Fr (Gadagane, 84)	01b	SZ0129	Fr (Sauze, 06)	02b	CC1493	Fr (La Clusaz, 74)	02b	CFBP2256	Grèce
01a	KG0004	Italie (Viterbo)	01b	SZB0063	Fr (Sauze, 06)	02b	CC1494	Fr (La Clusaz, 74)	02b	CLA0071	Fr (Lautaret, 05)
01a	LAB0040	Fr (Lautaret, 05)	01b	SZB0070	Fr (Sauze, 06)	02b	CC1543	Fr (Lac de forêtant, 05)	02b	CLA0217	Fr (Lautaret, 05)
01a	LAB0041	Fr (Lautaret, 05)	01b	TA0011	Fr (Tarn, 48)	02b	CC440	Fr (Pernes les Fontaines, 84)	02b	CMO0043	Fr (Montfavet, 84)
01a	LAB0076	Fr (Lautaret, 05)	01b	USA0001	USA (Pine creek)	02b	CC457	Fr (Plan de Robion, 84)	02b	CMO0047	Fr (Montfavet, 84)
01a	LAB0081	Fr (Lautaret, 05)	01b	USA0003	USA (Pine creek)	02b	CCE0044	Fr (Ceillac, 05)	02b	CMO0071	Fr (Montfavet, 84)
01a	LAB0129	Fr (Lautaret, 05)	01b	USA0019	USA (Pine creek)	02b	CCE0045	Fr (Ceillac, 05)	02b	CMO0078	Fr (Montfavet, 84)
01a	SZ0014	Fr (Sauze, 06)	01b	USA0031	USA (Cascade creek)	02b	CCE0065	Fr (Ceillac, 05)	02b	CMW0002	Fr (Caumont sur Durance, 84)
01a	SZ0015	Fr (Sauze, 06)	01b	USA0041	USA (Cascade creek)	02b	CCE0067	Fr (Ceillac, 05)	02b	CMW0031	Fr (Caumont sur Durance, 84)
01a	SZ0049	Fr (Sauze, 06)	01b	USA007	USA (Pine creek)	02b	CCE0101	Fr (Ceillac, 05)	02b	CST0007	Fr (Saint-Saturnin, 84)
01a	SZ0120	Fr (Sauze, 06)	01b	USA0090	USA (Pilgrim creek)	02b	CCE0160	Fr (Ceillac, 05)	02b	CST0069	Fr (Saint-Saturnin, 84)
01a	SZ0134	Fr (Sauze, 06)	02a	GAW0216	Fr (Gadagane, 84)	02b	CC0183	Fr (Ceillac, 05)	02b	CST0089	Fr (Saint-Saturnin, 84)
01a	SZ0149	Fr (Sauze, 06)	02a	LYR0044	Fr (Montfavet, St Paul, 84)	02b	CCE0215	Fr (Ceillac, 05)	02b	CST0092	Fr (Saint-Saturnin, 84)
01a	SZB0003	Fr (Sauze, 06)	02b	AI0015	Nouvelle-Zélande	02b	CCE0234	Fr (Ceillac, 05)	02b	CSZ0133	Fr (Sauze, 06)

PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine
02b	CSZ0140	Fr (Sauze, 06)	02c	CCE0147	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0658	Fr (Mézel, 04)	03	JD17	USA
02b	CSZ0177	Fr (Sauze, 06)	02c	CCE0161	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0659	Fr (Mézel, 04)	03	JD18	Malawi
02b	CSZ0185	Fr (Sauze, 06)	02c	CCE0236	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0670	Italie (Abruze, campina parc)	03	LYR0002	Fr (Montfavet, St Paul, 84)
02b	CSZ0188	Fr (Sauze, 06)	02c	CCE0243	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1428	USA (Park Cy, MT)	04	CC1513	Fr (Col Vieux, 05)
02b	CSZ0215	Fr (Sauze, 06)	02c	CCE0593	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1435	Fr (Vaucluse, 84)	04	CC1629	USA (Bozeman, Montana)
02b	CSZ0250	Fr (Sauze, 06)	02c	CCE0595	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1448	Fr (Vaucluse, 84)	04	CLA0282	Fr (Lautaret, 05)
02b	CSZ0255	Fr (Sauze, 06)	02c	CCE0621	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1470	Fr (Ardèche, 07)	04	CLA0494	Fr (Lautaret, 05)
02b	CVB0004	Fr (Vars, 05)	02c	CCE0647	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1475	Fr (Villard-de-Lans, 38)	04	JD12	Japon (Hokkaidou)
02b	CVB0007	Fr (Vars, 05)	02c	CCE0661	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1497	Fr (Villard-de-Lans, 38)	05	CCE0217	Fr (Ceillac, 05)
02b	CVB0012	Fr (Vars, 05)	02c	CCE0666	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1498	Fr (Villard-de-Lans, 38)	05	JD14	USA
02b	CVB0016	Fr (Vars, 05)	02c	CCE0760	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1499	Fr (Saint-Saturnin, 84)	05	JD15	?
02b	CVB0031	Fr (Vars, 05)	02c	CCE0766	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC1671	Fr	06	CFBP2067	Mexique
02b	CVB0034	Fr (Vars, 05)	02c	CCE0767	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC94	Fr (Moissac, 82)	07a	BS0001*	Italie (Brescia)
02b	CVB0037	Fr (Vars, 05)	02c	CCV0056	Fr (Vars, 05)	02d	CCE0290	Fr (Ceillac, 05)	07a	BS0002*	Italie (Brescia)
02b	CVB0047	Fr (Vars, 05)	02c	CCV0060	Fr (Vars, 05)	02d	CCV0093	Fr (Vars, 05)	07a	BS0004*	Italie (Brescia)
02b	CVB0052	Fr (Vars, 05)	02c	CCV0102	Fr (Vars, 05)	02d	CCV0098	Fr (Vars, 05)	07a	BS0005*	Italie (Brescia)
02b	CVB0064	Fr (Vars, 05)	02c	CCV0425	Fr (Vars, 05)	02d	CMO0001	Fr (Montfavet, 84)	07a	CAW00011	Fr (Montfavet, 84)
02b	CVB0066	Fr (Vars, 05)	02c	CCV0460	Fr (Vars, 05)	02d	CMO0070	Fr (Montfavet, 84)	07a	CC0657	Fr (Mézel, 04)
02b	GAB0016	Fr (Gadagane, 84)	02c	CCV0568	Fr (Vars, 05)	02d	CMO0072	Fr (Montfavet, 84)	07a	CC0663	Fr (Valbonne, 06)
02b	GAB0024	Fr (Gadagane, 84)	02c	CCV0612	Fr (Vars, 05)	02d	CMO0100	Fr (Montfavet, 84)	07a	CC1492	Fr (La Clusaz, 74)
02b	GAB0029	Fr (Gadagane, 84)	02c	CMO0007	Fr (Montfavet, 84)	02d	CMW0023	Fr (Caumont sur Durance, 84)	07a	CC1582	Fr (Clusieux, 05)
02b	GAB0032	Fr (Gadagane, 84)	02c	CMW0018	Fr (Caumont sur Durance, 84)	02d	CMW0026	Fr (Caumont sur Durance, 84)	07a	CCE0284	Fr (Ceillac, 05)
02b	GAW0057	Fr (Gadagane, 84)	02c	CSP0001	Fr (Savines, 05)	02d	CST0006	Fr (Saint-Saturnin, 84)	07a	CCE0291	Fr (Ceillac, 05)
02b	GAW0081	Fr (Gadagane, 84)	02c	CSP0002	Fr (Savines, 05)	02d	CST0034	Fr (Saint-Saturnin, 84)	07a	CCE0316	Fr (Ceillac, 05)
02b	GAW0133	Fr (Gadagane, 84)	02c	CSP0003	Fr (Savines, 05)	02d	CST0075	Fr (Saint-Saturnin, 84)	07a	CCE0322	Fr (Ceillac, 05)
02b	GAW0162	Fr (Gadagane, 84)	02c	CSP0004	Fr (Savines, 05)	02d	CST0086	Fr (Saint-Saturnin, 84)	07a	CCE0324	Fr (Ceillac, 05)
02b	GAW0220	Fr (Gadagane, 84)	02c	CSP0006	Fr (Savines, 05)	02d	CST0087	Fr (Saint-Saturnin, 84)	07a	CCE0327	Fr (Ceillac, 05)
02b	GAW0233	Fr (Gadagane, 84)	02c	CSP0009	Fr (Savines, 05)	02d	CST0090	Fr (Saint-Saturnin, 84)	07a	CCE0328	Fr (Ceillac, 05)
02b	JD06	Fr	02c	CST0018	Fr (Saint-Saturnin, 84)	02d	CSZ0081	Fr (Sauze, 06)	07a	CCV0050	Fr (Vars, 05)
02b	JD23	Japon (Tochigi)	02c	CST0041	Fr (Saint-Saturnin, 84)	02d	GAB0002	Fr (Gadagane, 84)	07a	CCV0172	Fr (Vars, 05)
02b	JT7	Italie (Viterbo)	02c	CST0077	Fr (Saint-Saturnin, 84)	02d	GAB0003	Fr (Gadagane, 84)	07a	CCV0178	Fr (Vars, 05)
02b	LAB0003	Fr (Lautaret, 05)	02c	CSZ0216	Fr (Sauze, 06)	02d	GAB0012	Fr (Gadagane, 84)	07a	CCV0180	Fr (Vars, 05)
02b	LAB0086	Fr (Lautaret, 05)	02c	CVB0002	Fr (Vars, 05)	02d	GAB0019	Fr (Gadagane, 84)	07a	CCV0188	Fr (Vars, 05)
02b	LAB0092	Fr (Lautaret, 05)	02c	CVB0003	Fr (Vars, 05)	02d	GAB0023	Fr (Gadagane, 84)	07a	CEB0022	Fr (Ceillac, 05)
02b	LAB0127	Fr (Lautaret, 05)	02c	CVB0042	Fr (Vars, 05)	02d	GAB0042	Fr (Gadagane, 84)	07a	CEB0023	Fr (Ceillac, 05)
02b	LAB0159	Fr (Lautaret, 05)	02c	CVB0065	Fr (Vars, 05)	02d	GAB0050	Fr (Gadagane, 84)	07a	CEB0024	Fr (Ceillac, 05)
02b	LNW0001	Fr (Logis-Neuf, 84)	02c	CVB0071	Fr (Vars, 05)	02d	GAW0001	Fr (Gadagane, 84)	07a	CEB0029	Fr (Ceillac, 05)
02b	LNW0002	Fr (Logis-Neuf, 84)	02c	GAB0021	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0006	Fr (Gadagane, 84)	07a	CEB0041	Fr (Ceillac, 05)
02b	LNW0034	Fr (Logis-Neuf, 84)	02c	GAW0052	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0023	Fr (Gadagane, 84)	07a	CEB0085	Fr (Ceillac, 05)
02b	LNW0041	Fr (Logis-Neuf, 84)	02c	GAW0053	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0026	Fr (Gadagane, 84)	07a	CMA0031	Maroc (Agadir)
02b	LYR0016	Fr (Montfavet, St Paul, 84)	02c	GAW0082	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0031	Fr (Gadagane, 84)	07a	CMO0103	Fr (Montfavet, 84)
02b	SZ0002	Fr (Sauze, 06)	02c	GAW0120	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0037	Fr (Gadagane, 84)	07a	CMO0110	Fr (Montfavet, 84)
02b	SZ0005	Fr (Sauze, 06)	02c	GAW0128	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0049	Fr (Gadagane, 84)	07a	CMW0005	Fr (Caumont sur Durance, 84)
02b	SZ0006	Fr (Sauze, 06)	02c	GAW0155	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0089	Fr (Gadagane, 84)	07a	CMW0006	Fr (Caumont sur Durance, 84)
02b	SZ0007	Fr (Sauze, 06)	02c	GAW0205	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0090	Fr (Gadagane, 84)	07a	CMW0028	Fr (Caumont sur Durance, 84)
02b	SZ0038	Fr (Sauze, 06)	02c	GAW0227	Fr (Gadagane, 84)	02d	GAW0226	Fr (Gadagane, 84)	07a	CST0072	Fr (Saint-Saturnin, 84)
02b	SZ0043	Fr (Sauze, 06)	02c	LAB0024	Fr (Lautaret, 05)	02d	JAW0002	Fr (Montfavet, 84)	07a	CST0079	Fr (Saint-Saturnin, 84)
02b	SZ0048	Fr (Sauze, 06)	02c	LAB0071	Fr (Lautaret, 05)	02d	JAW0003	Fr (Montfavet, 84)	07a	CSZ0283	Fr (Sauze, 06)
02b	SZ0085	Fr (Sauze, 06)	02c	P7W0013	Fr (Montfavet, 84)	02d	JD08	USA	07a	CSZ0284	Fr (Sauze, 06)
02b	SZ0089	Fr (Sauze, 06)	02c	SZ0030	Fr (Sauze, 06)	02d	LNW0011	Fr (Logis-Neuf, 84)	07a	CSZ0285	Fr (Sauze, 06)
02b	SZ0092	Fr (Sauze, 06)	02c	SZ0037	Fr (Sauze, 06)	02d	LNW0018	Fr (Logis-Neuf, 84)	07a	CSZ0297	Fr (Sauze, 06)
02b	SZ0109	Fr (Sauze, 06)	02c	SZ0045	Fr (Sauze, 06)	02d	LNW0020	Fr (Logis-Neuf, 84)	07a	CSZ0341	Fr (Sauze, 06)
02b	SZ0113	Fr (Sauze, 06)	02c	SZ0051	Fr (Sauze, 06)	02d	LNW0021	Fr (Logis-Neuf, 84)	07a	CSZ0342	Fr (Sauze, 06)
02b	SZ0116	Fr (Sauze, 06)	02c	SZ0093	Fr (Sauze, 06)	02d	LNW0026	Fr (Logis-Neuf, 84)	07a	GAW0092	Fr (Gadagane, 84)
02b	SZB0005	Fr (Sauze, 06)	02c	SZ0124	Fr (Sauze, 06)	02d	LNW0030	Fr (Logis-Neuf, 84)	07a	JT6*	Italie (Viterbo)
02b	SZB0017	Fr (Sauze, 06)	02c	SZ0142	Fr (Sauze, 06)	02d	SZB0004	Fr (Sauze, 06)	07a	LAB0001	Fr (Lautaret, 05)
02b	T3W0005	Fr (Avignon, 84)	02c	TA0034	Fr (Tarn, 48)	02d	SZB0060	Fr (Sauze, 06)	07a	LAB0006	Fr (Lautaret, 05)
02b	T3W0006	Fr (Avignon, 84)	02c	UB0015	Fr (Vars, 05)	02d	T3W0001	Fr (Avignon, 84)	07a	LAB0008	Fr (Lautaret, 05)
02b	T3W0028	Fr (Avignon, 84)	02c	UB0167	Fr (Vars, 05)	02d	T3W0004	Fr (Avignon, 84)	07a	LAB0020	Fr (Lautaret, 05)
02b	TA0001	Fr (Tarn, 48)	02c	UB0186	Fr (Vars, 05)	02d	T3W0014	Fr (Avignon, 84)	07a	LAB0023	Fr (Lautaret, 05)
02b	UB0305	Fr (Ubaye, 05)	02c	UB0193	Fr (Vars, 05)	02d	T3W0016	Fr (Avignon, 84)	07a	LAB0062	Fr (Lautaret, 05)
02b	UB0410	Fr (Vars, 05)	02c	UB0194	Fr (Vars, 05)	02d	UB0248	Fr (Ubaye, 05)	07a	LAB0123	Fr (Lautaret, 05)
02b	UB0415	Fr (Vars, 05)	02c	UB0217	Fr (Vars, 05)	02d	UB303	Fr (Ubaye, 05)	07a	LAB0124	Fr (Lautaret, 05)
02b	UB0419	Fr (Vars, 05)	02c	UB0218	Fr (Vars, 05)	02d	USA0005	USA (Pine creek)	07a	LAB0126	Fr (Lautaret, 05)
02b	UB0429	Fr (Vars, 05)	02c	UB0222	Fr (Vars, 05)	02d	USA0009	USA (Pine creek)	07a	LAB0162	Fr (Lautaret, 05)
02b	USA0087	USA (Pilgrim creek)	02c	UB0223	Fr (Vars, 05)	02d	USA0017	USA (Pine creek)	07a	LAB0163	Fr (Lautaret, 05)
02b	USA0088	USA (Pilgrim creek)	02c	UB0234	Fr (Vars, 05)	02d	USA0096	USA (Pilgrim creek)	07a	LNW0006	Fr (Logis-Neuf, 84)
02b	VI0016	Fr (Viaur, 12)	02c	UB0313	Fr (Ubaye, 05)	02d	USA0098	USA (Pilgrim creek)	07a	LNW0019	Fr (Logis-Neuf, 84)
02c	AI0019	Nouvelle-Zélande	02c	UB0330	Fr (Ubaye, 05)	02d	USA0011	USA (Pine creek)	07a	LYR0042	Fr (Montfavet, St Paul, 84)
02c	AI0053	Nouvelle-Zélande	02c	UB0368	Fr (Ubaye, 05)	02d	VI0008	Fr (Viaur, 12)	07a	LYR0045	Fr (Montfavet, St Paul, 84)
02c	CC1502	Italie (Chianale)	02c	UB0382	Fr (Ubaye, 05)	02d	VI0009	Fr (Viaur, 12)	07a	SZB0012	Fr (Sauze, 06)
02c	CC1503	Italie (Lac Longet)	02c	USA0052	USA (Cascade creek)	02d	VI0011	Fr (Viaur, 12)	07a	SZB0035	Fr (Sauze, 06)
02c	CC1504	Italie (Lac Longet)	02d	AI0003	Nouvelle-Zélande	02d	VI0015	Fr (Viaur, 12)	07a	TA0002	Fr (Tarn, 48)
02c	CC1631	USA (Bozeman, Montana)	02d	CAW0019	Fr (Montfavet, 84)	02d	VI0017	Fr (Viaur, 12)	07a	TA0020	Fr (Tarn, 48)
02c	CCE0020	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0170	Fr (Orange, 84)	02e	USA0035	USA (Cascade creek)	07a	TA043	Fr (Tarn, 48)
02c	CCE0021	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0301	Fr (Quercy, 46)	02e	USA0050	USA (Cascade creek)	07b	Fmu-107*	Chine
02c	CCE0024	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0393	Fr (Quercy, 46)	03	CMO0010	Fr (Montfavet, 84)	08	CMO0085	Fr (Montfavet, 84)
02c	CCE0027	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0403	Fr (Quercy, 46)	03	JD01	Inde	08	CST0099	Fr (Saint-Saturnin, 84)
02c	CCE0097	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0406	Fr (Quercy, 46)	03	JD03	USA (Wisconsin)	08	GAW0197	Fr (Gadagane, 84)
02c	CCE0098	Fr (Ceillac, 05)	02d	CC0654	Fr (Mézel, 04)	03	JD04	Japon (Nagano)	08	GAW0203	Fr (Gadagane, 84)

PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine	PG	Nom de la souche	Pays (et ville) d'origine
08	LYR0041	Fr (Montfavet, St Paul, 84)	10a	CCE0655	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCV0103	Fr (Vars, 05)	10f	CCE0153	Fr (Ceillac, 05)
09a	AI0012	Nouvelle-Zélande	10a	CCE0664	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCV0128	Fr (Vars, 05)	10g	CCV0213	Fr (Vars, 05)
09a	AI0041	Nouvelle-Zélande	10a	CCE0727	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCV0137	Fr (Vars, 05)	11	83.1*	USA (Arizona)
09a	AI0045	Nouvelle-Zélande	10a	CCE0728	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCV0522	Fr (Vars, 05)	11	CFBP4407	Fr (Lot-et-Garonne, 47)
09a	AI0095	Nouvelle-Zélande	10a	CCE0731	Fr (Ceillac, 05)	10b	CEB0005	Fr (Ceillac, 05)	12a	GAW0112	Fr (Gadagane, 84)
09a	AI0105	Nouvelle-Zélande	10a	CCE0764	Fr (Ceillac, 05)	10b	CEB0007	Fr (Ceillac, 05)	12b	GAW0113	Fr (Gadagane, 84)
09a	CC1417	USA (Gallatin Cy, MT)	10a	CCE0769	Fr (Ceillac, 05)	10b	CLA0175	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0076	Fr (Ceillac, 05)
09a	CC1418	USA (Gallatin Cy, MT)	10a	CCE0909	Fr (Ceillac, 05)	10b	CLA0189	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0118	Fr (Ceillac, 05)
09a	CC1419	USA (Gallatin Cy, MT)	10a	CCE0911	Fr (Ceillac, 05)	10b	CLA0192	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0151	Fr (Ceillac, 05)
09a	CC1420	USA (Gallatin Cy, MT)	10a	CCE0913	Fr (Ceillac, 05)	10b	CLA0200	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0237	Fr (Ceillac, 05)
09a	CC1524	Fr (Col de Vars, 05)	10a	CCE0968	Fr (Ceillac, 05)	10b	CLA0201	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0636	Fr (Ceillac, 05)
09a	CC1532	Fr (Lac de Bès, 05)	10a	CCV0094	Fr (Vars, 05)	10b	CLA0206	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0641	Fr (Ceillac, 05)
09a	CCV0059	Fr (Vars, 05)	10a	CCV0132	Fr (Vars, 05)	10b	CLA0207	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0646	Fr (Ceillac, 05)
09a	CMW0004	Fr (Caumont sur Durance, 84)	10a	CCV0206	Fr (Vars, 05)	10b	CLA0209	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0667	Fr (Ceillac, 05)
09a	CMW0012	Fr (Caumont sur Durance, 84)	10a	CEB0081	Fr (Ceillac, 05)	10b	CLA0214	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0668	Fr (Ceillac, 05)
09a	CMW0033	Fr (Caumont sur Durance, 84)	10a	CEB0083	Fr (Ceillac, 05)	10b	CLA0219	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0675	Fr (Ceillac, 05)
09a	GAW0048	Fr (Gadagane, 84)	10a	CSZ0172	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0239	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0676	Fr (Ceillac, 05)
09a	LAB0005	Fr (Lautaret, 05)	10a	CSZ0179	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0251	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0677	Fr (Ceillac, 05)
09a	LAB0007	Fr (Lautaret, 05)	10a	CSZ0181	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0252	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0681	Fr (Ceillac, 05)
09a	LAB0122	Fr (Lautaret, 05)	10a	CSZ0221	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0275	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0878	Fr (Ceillac, 05)
09a	LAB0160	Fr (Lautaret, 05)	10a	CSZ0260	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0283	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0889	Fr (Ceillac, 05)
09a	LNW0029	Fr (Logis-Neuf, 84)	10a	CSZ0286	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0284	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0915	Fr (Ceillac, 05)
09a	LNW0042	Fr (Logis-Neuf, 84)	10a	CSZ0293	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0316	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0918	Fr (Ceillac, 05)
09a	UB0169	Fr (Vars, 05)	10a	CSZ0296	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0326	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCE0950	Fr (Ceillac, 05)
09a	USA0053	USA (Cascade creek)	10a	CSZ0298	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0499	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCV0055	Fr (Vars, 05)
09a	USA0091	USA (Pilgrim creek)	10a	CSZ0315	Fr (Sauze, 06)	10b	CLA0500	Fr (Lautaret, 05)	13a	CCV0100	Fr (Vars, 05)
09b	AI0008	Nouvelle-Zélande	10a	CSZ0316	Fr (Sauze, 06)	10b	CSZ0253	Fr (Sauze, 06)	13a	CCV0104	Fr (Vars, 05)
09b	CMW0010	Fr (Caumont sur Durance, 84)	10a	CSZ0321	Fr (Sauze, 06)	10b	CSZ0287	Fr (Sauze, 06)	13a	CCV0170	Fr (Vars, 05)
09b	CMW0038	Fr (Caumont sur Durance, 84)	10a	CSZ0329	Fr (Sauze, 06)	10b	CSZ0290	Fr (Sauze, 06)	13a	CSZ0137	Fr (Sauze, 06)
09b	TA0006	Fr (Tarn, 48)	10a	CSZ0338	Fr (Sauze, 06)	10b	CSZ0335	Fr (Sauze, 06)	13a	CSZ0143	Fr (Sauze, 06)
09c	CMW0020	Fr (Caumont sur Durance, 84)	10a	SZ0119	Fr (Sauze, 06)	10b	CSZ0346	Fr (Sauze, 06)	13a	CSZ0240	Fr (Sauze, 06)
10a	CC1583	Fr (Col Vieux, 05)	10a	SZ0123	Fr (Sauze, 06)	10b	CVB0040	Fr (Vars, 05)	13a	CSZ0256	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0060	Fr (Ceillac, 05)	10a	SZB0001	Fr (Sauze, 06)	10b	CVB0067	Fr (Vars, 05)	13a	CSZ0288	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0075	Fr (Ceillac, 05)	10a	SZB0008	Fr (Sauze, 06)	10b	CVB0070	Fr (Vars, 05)	13a	CSZ0289	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0084	Fr (Ceillac, 05)	10a	UB0370	Fr (Ubaye, 05)	10b	CVB0091	Fr (Vars, 05)	13a	CSZ0291	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0103	Fr (Ceillac, 05)	10a	UB0417	Fr (Vars, 05)	10b	CVB0095	Fr (Vars, 05)	13a	CSZ0313	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0114	Fr (Ceillac, 05)	10a	USA0046	USA (Cascade creek)	10b	LAB0067	Fr (Lautaret, 05)	13a	CSZ0317	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0125	Fr (Ceillac, 05)	10a	USA0102	USA (Pilgrim creek)	10b	TA0003	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0318	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0126	Fr (Ceillac, 05)	10a	USA0106	USA (Pilgrim creek)	10b	TA0005	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0319	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0179	Fr (Ceillac, 05)	10b	AI0029	Nouvelle-Zélande	10b	TA0008	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0320	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0180	Fr (Ceillac, 05)	10b	CC1464	USA (Montana)	10b	TA0009	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0322	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0181	Fr (Ceillac, 05)	10b	CC1466	USA (Montana)	10b	TA0014	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0323	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0182	Fr (Ceillac, 05)	10b	CC1490	Fr (La Clusaz, 74)	10b	TA0018	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0324	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0184	Fr (Ceillac, 05)	10b	CC1557	Fr (Col Vieux, 05)	10b	TA0019	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0325	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0185	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0066	Fr (Ceillac, 05)	10b	TA0022	Fr (Tarn, 48)	13a	CSZ0327	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0186	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0113	Fr (Ceillac, 05)	10c	CC1586	USA (Hyalite Lake MT)	13a	CSZ0328	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0187	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0242	Fr (Ceillac, 05)	10d	CCE0064	Fr (Ceillac, 05)	13a	SZ0131	Fr (Sauze, 06)
10a	CCE0188	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0608	Fr (Ceillac, 05)	10d	CCE0095	Fr (Ceillac, 05)	13b	CCV0567	Fr (Vars, 05)
10a	CCE0189	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0637	Fr (Ceillac, 05)	10d	CCE0099	Fr (Ceillac, 05)	13b	CLA0302	Fr (Lautaret, 05)
10a	CCE0191	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0645	Fr (Ceillac, 05)	10d	CCE0100	Fr (Ceillac, 05)			
10a	CCE0192	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0656	Fr (Ceillac, 05)	10d	CCE0643	Fr (Ceillac, 05)			
10a	CCE0193	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0735	Fr (Ceillac, 05)	10d	CCE0706	Fr (Ceillac, 05)			
10a	CCE0194	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0887	Fr (Ceillac, 05)	10d	CCE0974	Fr (Ceillac, 05)			
10a	CCE0209	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0888	Fr (Ceillac, 05)	10d	CEB0089	Fr (Ceillac, 05)			
10a	CCE0221	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0910	Fr (Ceillac, 05)	10d	CVB0092	Fr (Vars, 05)			
10a	CCE0238	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0910	Fr (Ceillac, 05)	10e	CCE0244	Fr (Ceillac, 05)			
10a	CCE0248	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0944	Fr (Ceillac, 05)	10e	CCV0202	Fr (Vars, 05)			
10a	CCE0278	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCE0971	Fr (Ceillac, 05)	10e	CCV0210	Fr (Vars, 05)			
10a	CCE0287	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCV0061	Fr (Vars, 05)	10e	CCV0214	Fr (Vars, 05)			
10a	CCE0594	Fr (Ceillac, 05)	10b	CCV0080	Fr (Vars, 05)	10e	SZB0071	Fr (Sauze, 06)			

Prélevées sur plante

Prélevées en milieux aqueux

Prélevées sur débris de feuilles

Prélevées en eaux de précipitations

Prélevées en milieux neigeux

* *P. viridiflava*

† *P. cannabina*

* *P. cichorii*

1.2. Culture et conservation des souches

Les bactéries sont conservées à -20°C (court terme) ou -80°C (long terme) dans des tubes de glycérol à 40%. En milieu solide, les souches sont cultivées sur :

- Milieu Tryptic Soy Agar (TSA : peptone de caséine pancréatique 15 g/L, peptone de soja papainique 5 g/L, chlorure de sodium 20 g/L, agar 20 g/L, pH final 7,3 +/- 0,2, autoclavage : 121°C, 20 minutes, 1 bar)
- Milieu Potato Dextrose Agar (PDA : extrait de pomme de terre 4 g/L, dextrose 20 g/L, agar 15 g/L, pH final : 5,6 +/- 0,2, autoclavage : 121°C, 20 minutes, 1 bar).
- Milieu Syringomycin Recovery Medium Agar (SRM Agar). Il est composé d'une solution de base (D-Glucose 10 g/L, D-Fructose 1 g/L, L-Histidine 4 g/L, K₂HPO₄ 70 mg/L, KH₂PO₄ 54 mg/L, MgSO₄·7H₂O 200 mg/L, agar 15 g/L, pH final 7.0 +/- 0,2, autoclavage 121°C, 20 minutes, 1 bar). A cette solution de base sont ajoutés 10 mL/L d'une solution d'arbutine à 2,7 g/100mL et 0,5 mL/L d'une solution de FeCl₃ à 270 mg/10mL.

Le milieu TSA, non sélectif, est utilisé pour cultiver et isoler les souches bactériennes. Les boîtes de TSA inoculées sont incubées pendant 48h à 25°C.

Les milieux PDA et SRM ont été choisis pour étudier la production de lipopeptides en milieu solide. Le milieu PDA est utilisé car c'est sur ce même milieu que sont réalisés les tests d'activité antifongique. Le milieu SRM a quant à lui été optimisé pour la production de syringomycine (Gross 1985). Les boîtes inoculées sont incubées pendant 72h à 25°C.

En milieu liquide, les souches sont cultivées en Tryptic Soy Broth (TSB : peptone pancréatique de caséine 17 g/L, peptone papainique de soja 3 g/L, chlorure de sodium 5 g/L, K₂HPO₄ 2,5 g/L, glucose 2,5 g/L, pH final 7,3 +/- 0,2, autoclavage : 121°C, 20 minutes, pression 1 bar) ou en milieu SRM (Composition identique au SRM Agar, sans agar).

Une préculture en milieu TSB ou SRM est préparée à partir d'une colonie isolée sur TSA en veillant à respecter un ratio 1/5 entre le volume de milieu et le volume de la fiole de culture utilisée. Après incubation pendant 16h à 25°C (TSB) ou 24h à 25°C (SRM) sous agitation de 160 rpm et mesure de la DO à 600nm, la préculture est utilisée pour ensemencher une nouvelle fiole de milieu à DO initiale 0,1 (TSB) ou 0,2 (SRM). La nouvelle culture est incubée pendant 72h à 25°C et sous agitation de 160 rpm. En fin de culture, la DO à 600nm est de nouveau mesurée.

2. Production de lipopeptides en milieu liquide

2.1.Préparation des surnageants de culture

Les cultures liquides (milieux TSB ou SRM) âgées de 72h sont ajustées à pH 7,0 +/- 0,2. Cette neutralisation est effectuée pour s'affranchir de l'influence du pH sur les champignons au cours des tests d'activités antifongiques. Les cultures sont ensuite centrifugées à 10 000 rpm à température ambiante pendant 15 minutes. Le surnageant de culture est passé sur un filtre de 0,2µm de porosité en PES (Polytéthersulfone) pour éliminer toute cellule bactérienne résiduelle. Les surnageants sont ensuite conservés à 4°C pour une utilisation le jour même ou à -20°C pour une conservation plus longue.

2.2.Semi-purification par ultrafiltration/diafiltration

L'ultrafiltration est une méthode de séparation physique utilisant une membrane. Elle permet de séparer les molécules d'un mélange en fonction de leur taille.

Les surnageants filtrés sont déposés dans des tubes d'ultrafiltration Vivaspin® 20 (Sartorius, Slonehouse, UK) contenant une membrane en PES de seuil de coupure 10 kDa. Les tubes sont centrifugés 30 minutes à 4000g à température ambiante. Les lipopeptides présents en concentration supérieure à la Concentration Micellaire Critique (CMC, concentration à laquelle ils sont capables de former des complexes micellaires dont la taille dépasse les 10 000 Da), sont retenus et concentrés au niveau du rétentat.

Les rétentats obtenus sont ensuite soumis à une étape de diafiltration dont le but est d'éliminer les peptides de petite taille et les sels résiduels pour purifier le rétentat d'ultrafiltration. Pour cela, le surnageant traité est dilué dans un volume d'eau ultrapure égal au volume de l'échantillon initial puis de nouveau centrifugé à 4000g à température ambiante.

3. Détection et analyse de la structure chimique des lipopeptides

3.1. Analyses MALDI-ToF

La spectrométrie de masse MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) est utilisée ici pour détecter les lipopeptides produits par les souches de *Pseudomonas* et caractériser leur structure. C'est une technique d'analyse qui consiste à ioniser les molécules présentes dans un mélange (source MALDI) puis à les séparer en fonction de leur rapport masse/charge noté m/z (analyseur ToF).

Les colonies bactériennes issues de culture de 72h sur milieu PDA ou SRM sont déposées en frottis sur la cible MALDI ground steel (Bruker Daltonik, Bremen, Allemagne) puis lavées deux fois avec 1 μ L d'une solution H₂O:Acide trifluoroacétique (TFA) 99,9/0,1 (v/v). Un μ L d'une solution acide formique:H₂O 70/30 (v/v) est ensuite ajouté sur chaque dépôt. Après séchage, ces derniers sont recouverts avec 1 μ L d'une solution saturée de matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (10mg/L dissous dans un mélange H₂O:acetonitrile:TFA, 50/47,5/2,5 v/v/v). Une solution de calibration est préparée à partir du Peptide Calibration Standard II kit de Bruker Daltonik dont la gamme s'étend de 700 Da à 3200 Da (Bradykinine 1-7, l'Angiotensine I, Angiotensine II, Substance P, Bombésine, Substrat de Rénine, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, Somatostatine). Un volume de 0,5 μ L de cette solution est mélangé avec 0,5 μ L de la solution de matrice décrite précédemment, puis déposé sur la cible MALDI.

Les analyses sont réalisées avec le spectromètre de masse Autoflex Speed MALDI-ToF/ToF de Bruker Daltonik contrôlé avec le logiciel FlexControl™ 3.4 de Bruker Daltonik. Pour chaque échantillon, les mesures sont effectuées en mode réflectron positif dans la gamme de masse 800-5000 m/z . Chaque spectre de masse est le résultat de l'accumulation de 2000 tirs de lasers dont l'intensité est comprise entre 50 et 70%. Les paramètres de l'appareil sont les suivants : voltages 1 et 2 de la source d'ions fixés respectivement à 19kV et 16,6kV, voltages 1 et 2 du réflectron fixés respectivement à 21kV et 9,5kV, voltage de la lentille fixé à 8kV, délai d'extraction fixé à 120ns. La fragmentation des ions d'intérêt MALDI-ToF/ToF est réalisée en mode LIFT (voltages sources 1 et 2 : 6kV et 5,3 kV, voltages réflectrons 1 et 2 : 27 kV et 11,7 kV, voltage lentille : 3kV).

Les spectres de masse obtenus sont visualisés avec le logiciel FlexAnalysis™ 3.4 de Bruker Daltonik. Ils représentent l'intensité des molécules ionisées détectées en fonction de leur rapport m/z. En fonction de la composition du milieu de culture et du traitement effectué avant l'analyse, une molécule présente dans un échantillon peut être protonée (H^+), sodée (Na^+) ou potassée (K^+) :

- Ionisation H^+ (notée $[M+H]^+$) : masse de la molécule + 1 Da
- Ionisation Na^+ (notée $[M+Na]^+$) : masse de la molécule + 23 Da
- Ionisation K^+ (notée $[M+K]^+$) : masse de la molécule + 39 Da

Ce sont les écarts de masse entre les différents pics qui permettent d'assigner chaque masse à une forme ionisée (*e.g.* 22 Da d'écart entre $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$). Il est ensuite possible de déduire la masse de la molécule non ionisée (*e.g.* à partir du m/z $[M+H]^+$, il faut retirer 1 Da pour obtenir la masse de la molécule non ionisée).

3.2. Analyses HPLC-ESI-MS

La séparation des molécules a été effectuée à l'aide d'un système de chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) (Acquity H-Class, Waters, Massachusetts, USA). La colonne utilisée est une phase inverse C18 (Uptisphere TP18, 250 x 3.0 mm, 5 μ m, Interchim, Montluçon, France). Pour chaque échantillon à tester (surnageant de culture ou rétentat d'ultrafiltration), 10 μ L sont injectés puis l'élution et la séparation des molécules sont effectuées dans les conditions détaillées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Conditions chromatographiques pour l'élution et la séparation des molécules

Temps (min)	Débit (mL/min)	% Eau	% Acétonitrile
0	0,6	95	5
5	0,6	95	5
40	0,6	0	100
45	0,6	0	100
46	0,6	95	5
56	0,6	95	5

Les analyses de masse sont effectuées avec le spectromètre de masse Synapt G2-Si (Waters, Massachusetts, USA) qui est de type ESI-Quadripôle/Temps de vol (ESI-Q/ToF, ElectroSpray Ionisation-Quadrupole/Time of flight). Il est utilisé en mode positif et sensitif. La source d'ion est réglée à un voltage de 3kV et une température de désolvatation de 300°C. Le mode DDA dans la gamme 200 – 1500 m/z est utilisé pour les mesures MS et MS/MS. La fragmentation est effectuée par CID (Collision Induced Dissociation), avec une affectation de 10 à 15 V pour les ions de masse moléculaire faible et de 20 à 100 V pour les ions de masse moléculaire haute.

4. Analyse des génomes bactériens

4.1.Extraction et séquençage de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée avec le kit Promega « Wizard Genomic DNA purification Kit » (Promega Madison, USA) selon le protocole dédié aux bactéries Gram (-) sans utilisation d'Éthylène-Diamine-TétraAcétique (EDTA). L'ADN extrait est élué dans une solution à 10mM de Tris-HCl à pH 8,5. Il est dosé au fluoromètre Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) avec le kit « Qubit® dsDNA HS Assay Kits » (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) selon les instructions du fournisseur. L'ADN génomique est ensuite dilué dans un volume de 100µL pour atteindre une concentration finale entre 1 et 30 ng/µL.

Le séquençage de l'ADN génomique est réalisé par l'entreprise MicrobesNG (Birmingham, Royaume-Uni - <https://microbesng.com/>) (couverture de 30X). Brièvement, les bibliothèques d'ADN génomiques sont préparées avec le kit Nextera XT Library Prep (Illumina, San Diego, USA) selon les instructions du fournisseur puis séquencées avec le système Illumina HiSeq pour l'obtention de séquences appairées de 250pb. L'assemblage *de novo* des génomes bactériens est réalisé avec le logiciel SPAdes 3.7 (Bankevich et al. 2012).

4.2.Outils bioinformatiques pour l'annotation des génomes

Le génome des souches a été analysé avec le logiciel AntiSMASH, version 5.0 disponible à l'adresse suivante : <https://antismash.secondarymetabolites.org>. (Blin et al. 2019).

A partir des séquences d'ADN génomique soumises au format FASTA, le logiciel détecte les clusters de gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires dont les clusters de gènes NRPS pour lesquels le logiciel présente l'enchaînement des domaines détectés : C, A, T, Te, etc.

La prédiction des monomères incorporés par les domaines A est effectuée avec le code de Stachelhaus et le programme NRSPredictor2, inclus dans le logiciel AntiSMASH (Stachelhaus et al. 1999; Röttig et al. 2011) :

- Le code de Stachelhaus est constitué de 10 acides aminés correspondant à des sites actifs impliqués dans l'incorporation de l'acide aminé et situés à des positions précises sur la séquence protéique du domaine A. Un ou plusieurs codes spécifiques de chaque acide

aminé incorporé ont été définis (*e.g.* alanine : DLLFGIAVLK / isoleucine : DGFFLGVVYK ou DAFFYGITFK). Ces codes sont recherchés par le logiciel AntiSMASH lors de l'analyse de la séquence protéique des domaines A afin de prédire l'incorporation d'un unique acide aminé. Cette prédiction est accompagnée d'un pourcentage de fiabilité (Stachelhaus code match).

- Le programme NRPSPredictor2 est basé sur une méthode d'apprentissage appelée Support Vector Machine (SVM) qui donne une prédiction du monomère incorporé sur 4 niveaux : 1) classe physicochimique du monomère (hydrophile, hydrophobe-aliphatique, hydrophobe-aromatique), 2) un cluster de 7 monomères appelé « Large Clusters » auquel appartiendrait l'acide aminé incorporé, 3) un cluster de 5 monomères appelé « Small Clusters » auquel appartiendrait le monomère incorporé, 4) la prédiction d'un seul monomère appelée « Single AA ».

L'analyse des domaines C est effectuée avec le logiciel Natural Product Domain Seeker (NaPDoS) (Ziemert et al. 2012). Il prédit les sous-types de domaines C et E détectés (E, ^LC_L, ^DC_L, dual C/E ou encore Cstarter) par comparaison phylogénétique avec des séquences de domaines C et E connus. Cela permet ensuite de déterminer l'isomérisation des acides aminés incorporés (*e.g.* un acide aminé incorporé en amont d'un domaine dual C/E sera épimérisé et donc de conformation D) (Caradec et al. 2014). Ce logiciel est directement intégré à AntiSMASH mais également disponible à l'adresse suivante : <http://napdos.ucsd.edu> (Ziemert et al. 2012).

Les prédictions effectuées sur les domaines A et C permettent de prédire la structure du métabolite potentiellement construit par une synthétase donnée et de la comparer aux structures connues dont celles présentes sur la base de données NORINE (Caboche et al. 2008). C'est une base de données entièrement dédiée aux peptides d'origine non-ribosomique. Elle en recense 1730 à ce jour, 303 étant des lipopeptides. Chaque peptide possède une fiche d'identité sur laquelle on retrouve notamment sa famille et sa classe, son activité, sa formule brute, sa masse, sa structure et l'organisme qui le produit. Cette base de données est disponible sur le site de la plateforme NORINE à l'adresse suivante : <https://bioinfo.lifl.fr/norine/> (Flissi et al. 2020).

Enfin, les séquences d'ADN génomique de certaines souches productrices de lipopeptides connues ont été récupérées sur les bases de données publiques telle que GenBank disponible sur la plateforme du NCBI (National Center for Biotechnology Information) pour les comparer

aux séquences d'ADN génomiques obtenues dans ce travail. Les numéros d'accès de ces séquences peuvent être directement soumis à AntiSMASH.

5. Tests d'activités antifongiques *in vitro*

Des tests d'activité antifongique *in vitro* ont été réalisés pour évaluer l'effet antagoniste des colonies bactériennes et des surnageants de culture contre trois champignons.

Les colonies bactériennes ont été testées contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* sous forme de mycélium et *Zymoseptoria tritici* sous forme de spores. Les surnageants de culture bactériens ont été testés contre *B. cinerea* et *Z. tritici* sous forme de spores.

5.1. Champignons cibles

Les trois champignons cibles sont des phytopathogènes responsables de maladies cryptogamiques des grandes cultures. Leurs caractéristiques sont détaillées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Caractéristiques des champignons cibles

Souche	Cultures concernées	Type de maladie	Type de pathogénèse
<i>Botrytis cinerea</i> BC1	Plus de 200 espèces végétales dont la vigne, les cultures fruitières et maraichères	Pourriture grise	Nécrotrophe
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> SS44	400 espèces végétales, dont le colza, le tournesol, les légumineuses fourragères et les cultures maraichères	Pourriture blanche/ Sclérotiniose	Nécrotrophe
<i>Zymoseptoria tritici</i> TO2596	Blé	Septoriose	Hémibiotrophe

Ils sont cultivés sur milieu PDA :

- *S. sclerotiorum* 72h, 25°C
- *B. cinerea* 72h, 25°C ou 10 jours, 18°C, alternance 16h jour / 8h nuit pour favoriser la sporulation (**Figure 18**)
- *Z. tritici* 5 jours, 18°C, obscurité

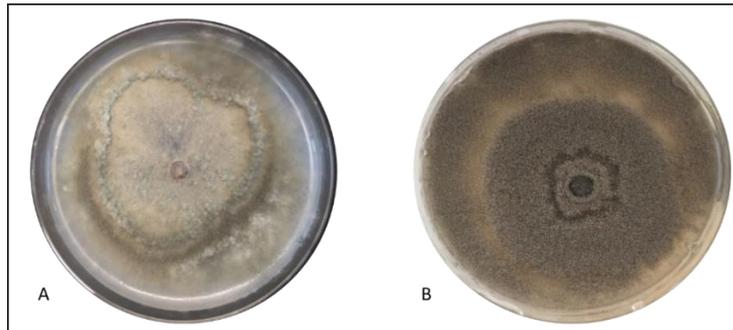


Figure 18 : Cultures de *Botrytis cinerea* de 72h à 25°C (A) et 10 jours, 18°C, alternance 16h jour/ 8h nuit (B)

Les suspensions de spores de *B. cinerea* sont obtenues en grattant la surface d'une culture sporulée après ajout de 10mL d'eau distillée stérile. Les suspensions de spores de *Z. tritici* sont obtenues en mélangeant vigoureusement plusieurs mycéliums de 5 jours dans 100mL d'eau distillée stérile.

Les suspensions ainsi obtenues sont passées sur des filtres en tissu Miracloth (pores de diamètre 22µm à 25µm (Merck, Darmstadt, Allemagne) afin d'éliminer le mycélium. La concentration en spores est déterminée par comptage en cellule de Malassez avant ajustement par dilution dans de l'eau distillée stérile à $1 \cdot 10^6$ spores/mL pour tester l'activité antifongique des colonies bactériennes et $5 \cdot 10^5$ spores/mL pour tester l'activité antifongique des surnageants de culture.

5.2. Activité antifongique des colonies bactériennes

Cible : *Botrytis cinerea* ou *Sclerotinia sclerotiorum*

Trois colonies bactériennes sont repiquées à 15 millimètres du bord d'une boîte de PDA. Après 48h d'incubation à 25°C, un disque de mycélium frais (Ø 5mm) est déposé au centre de la boîte de PDA. Une nouvelle incubation est effectuée pendant 4 jours à 25°C. Un disque de mycélium frais inoculé sur PDA sans bactérie est utilisé comme témoin de développement du champignon. Les souches sont testées en duplicat.

Après 4 jours d'incubation, les souches sont évaluées comme suit : (-) le champignon touche ou recouvre la colonie, (+) le rayon d'inhibition est supérieur à 0mm et inférieur à 3mm, (++) le rayon d'inhibition est supérieur à 3mm et inférieur à 5mm, (+++), le rayon d'inhibition est supérieur à 5mm.

Cible : *Zymoseptoria tritici*

Le protocole utilisé est adapté de celui utilisé par Lynch et al. (2016). Une suspension de spores fraîche de *Zymoseptoria tritici* à 1×10^6 spores/mL est mélangée à du milieu PDA en surfusion à 45°C (ratio 1 : 10). Le mélange spores/milieu PDA est coulé en boîtes de Petri standard de 92mm de diamètre puis trois colonies bactériennes sont repiquées à 15 millimètres du bord. Les souches sont testées en duplicat. Les boîtes sont incubées pendant 48h à 25°C pour permettre la croissance bactérienne puis pendant 8 jours à 18°C pour favoriser le développement du champignon. Une boîte de Petri contrôle sans bactérie est incubée en parallèle. Après un total de 10 jours, les diamètres d'inhibition sont mesurés et évalués de la même manière que pour les tests d'activité antifongiques décrits précédemment (-, +, ++, +++).

5.3. Activité antifongique des surnageants de culture

Ces tests consistent à déterminer l'effet du surnageant de culture sur la croissance du champignon en milieu solide. Les surnageants de culture sont mélangés à du milieu PDA en surfusion. Après solidification, une suspension de spores est déposée en surface.

Différents volumes de surnageants purs sont mélangés avec des milieux PDA en surfusion enrichis en agar. La concentration en agar du PDA dépend de la dilution du surnageant testée, la concentration finale après ajout du surnageant devant toujours être égale à 15g/L (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Volumes de surnageants purs à ajouter aux milieux PDA en fonction de la dilution du surnageant à tester

Dilution du surnageant à testée	Volume de surnageant (mL)	PDA		Concentration en agar finale (g/L)
		Volume de PDA (mL)	Concentration en agar	
Demi	10	10	30g/L	15
Quart	5	15	20g/L	15
Dixième	2	18	16,7g/L	15

Les tests sont réalisés à une concentration finale en agar de 15g/L. Pour chaque essai, le mélange surnageant/PDA est agité de manière rotative pour éviter la formation de bulles puis coulé dans deux boîtes de Petri de 52mm de diamètre.

B. cinerea

Après séchage, 10 μ L d'une suspension de spores à 5*10⁵ spores/mL sont déposés au centre de chaque boîte. Une fois les dépôts secs, les boîtes sont incubées à 25°C pendant 7 jours. Un témoin de développement du champignon sur un mélange 50/50, v/v de milieu de culture et de PDA est incubé en parallèle. Après 4 et 7 jours, la croissance du champignon est mesurée et comparée à la croissance du champignon témoin.

Z. tritici

Après séchage, 2 dépôts de 10 μ L d'une suspension de spores à 5*10⁵ spores/mL sont réalisés sur chaque boîte. Une fois les dépôts secs, les boîtes sont mises à incuber à 18°C pendant 10 jours. La croissance du champignon est mesurée horizontalement et verticalement à 7 et 10 jours et comparée à la croissance du champignon témoin incubé sur un mélange 50/50, v/v de milieu de culture et de PDA.

Pour les rétentats d'ultrafiltration dont les volumes sont plus faibles, les tests d'activité antifongique ont été miniaturisés. Ils sont réalisés en microplaques de 24 puits de 2mL. Le volume et la concentration de la suspension de spores inoculée restent inchangés.

6. Tests *in planta*

Les tests réalisés *in planta* ont visé d'une part à estimer la phytotoxicité des surnageants de culture et d'autre part à évaluer l'efficacité de ces surnageants pour la protection de plants de blé contre le pathogène *Zymoseptoria tritici*.

Ces tests ont été effectués sur des plants de blé cultivés en serre en atmosphère semi-contrôlée à partir de surnageants et surnageants ultrafiltrés issus de culture en milieu TSB ou SRM, additionnés de Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate) qui est un adjuvant utilisé pour faciliter l'adhérence et la pénétration des molécules présentes dans l'échantillon au niveau des feuilles de blé traitées.

Le cultivar de blé Alixan a été choisi car il est sensible au champignon *Zymoseptoria tritici* ce qui favorise l'apparition de la maladie lors des tests de protection des plantes. Il est par ailleurs peu sensible à l'oïdium ce qui évite les contaminations indésirables par ce champignon (ARVALIS 2013).

6.1.Préparation du blé

Le protocole pour la préparation des plants de blé est présenté en **Figure 19**. Les graines de blé sont lavées à l'eau courante puis déposées sur du papier absorbant humide. Elles sont stockées pendant 24h à 4°C puis pendant 24h à 18°C pour permettre leur pré-germination. Les graines pré-germées sont semées dans des pots en plastique remplis de terreau à raison de 7 graines par pot pour les tests de phytotoxicité et 12 graines par pot pour les tests de protection. Les pots sont placés en serre sous atmosphère semi-contrôlée (18°C, alternance 16h jour / 8h nuit) pour les tests de phytotoxicité et pour les tests de protection.

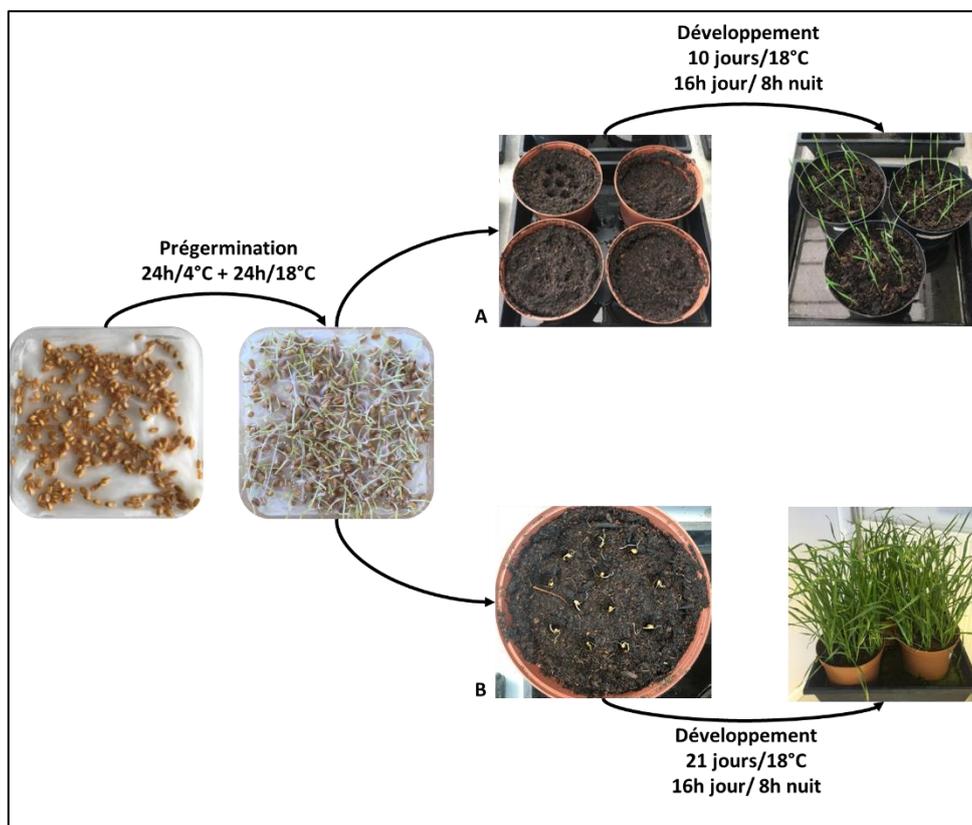


Figure 19 : Photographies illustrant le protocole de préparation des plants de blé pour les tests de phytotoxicité (A) et les tests de protection des plantes (B)

6.2. Tests de phytotoxicité

Le surnageant (ou rétentat d'ultrafiltration 2X) additionné de 0,05% (v/v) de Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) est pulvérisé sur les plants de blé âgés de 10 jours (20mL/ pot de 7 plants).

Deux contrôles sont réalisés en parallèle :

- Plant de blé non traité
- Mélange eau + Tween 20

À 1, 3, 7 et 10 jours après le traitement, les feuilles de blé sont observées. L'aspect général de la plante ainsi que les chloroses ou nécroses potentielles, signes de l'activité phytotoxique des surnageants sont notées.

6.3. Tests de protection

Le surnageant additionné de 0.05% (v/v) de Tween 20 est pulvérisé sur les plants de blé âgés de 21 jours (30 mL/ pot de 12 plants). Après 48h, une suspension de spores à 1×10^6 spores/mL de *Zymoseptoria tritici* additionnée de 0.05% (v/v) de Tween 20 est pulvérisée sur les plants de blé (30mL/ pot de 12 plants). Les plants sont recouverts de sacs plastiques pendant 2 jours. Cette étape permet d'atteindre les conditions optimales pour l'infection et le développement du champignon au niveau des feuilles de blé (humidité, confinement). Après 2 jours, les sacs sont retirés des pots.

Plusieurs contrôles sont réalisés en parallèle :

- Plants de blé non inoculés, non traités
- Plants de blé inoculés, non traités
- Plants de blé inoculés et traités avec un mélange eau + Tween 20
- Plants de blé inoculés et traités avec un mélange milieu de culture + Tween 20

Vingt-et-un jour après inoculation de la suspension de spores, les symptômes de la septoriose sont observés sur la 3^{ème} feuille de chaque plant de blé. Les observations se font de deux manières. La première manière consiste à estimer la surface foliaire infectée en repérant les taches brunes ou dorées présentes au niveau de la feuille. Cette mesure est exprimée en pourcentage par rapport à la surface foliaire totale. La deuxième manière consiste à estimer la

densité de pycnides présents au niveau des zones infectées de la feuille. Cette densité est notée entre 1 (présence de pycnides faible) et 5 (présence de pycnides forte).

7. Tests statistiques

7.1. Tableaux de contingence

Des tests exacts de Fisher ont été réalisés à partir de tableaux de contingence afin d'étudier les liens existants entre les activités antifongiques (ou leur absence) et l'appartenance des souches aux différents groupes phylogénétiques. Ces tests ont été réalisés sous XLSTAT version 2019.1.3.

7.2. Tests de significativité

Suite aux tests de protection du blé réalisés *in planta*, la significativité des différences observées entre le témoin d'infection et chaque modalité, a été déterminée avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) qui a été effectué sous XLSTAT version 2019.1.3.

Résultats et Discussion

Chapitre 1 : Diversité des lipopeptides produits par les souches du complexe *P. syringae*

Les souches du complexe *P. syringae* sont connues pour produire divers lipopeptides de structures variables qui ont été classés dans 5 familles : les syringafactines, les syringomycines, les corpeptines, les syringopeptines 22 et les syringopeptines 25.

Cependant, la production des différentes sous-familles n'a été montrée que chez un faible nombre de souches. Dans la famille des syringafactines, les syringafactines A à F ont été mises en évidence chez uniquement deux souches : *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 et *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Berti et al. 2007; Burch et al. 2014) et les cichofactines A et B chez 11 autres souches *P. cichorii* SF1-54, SF0068-02, SF0075-01, SF0057-3A1, SF0125-01, AF0089-01, LMG8401, 9D42, SPC9018, NCPPB 907 (Pauwelyn et al. 2013) et *P. cichorii* JBC1 (Götze et al. 2019). De même, les cichopeptines A et B (Huang et al. 2015) et la cichorinotoxine (Komatsu et al. 2019), trois lipopeptides de la famille des corpeptines, ont seulement été répertoriés chez *P. cichorii* SF1-54 et *P. cichorii* YM8705. La production des lipopeptides de la famille des syringomycines a été montrée chez plus de souches. La syringomycine, de la famille du même nom, a été mise en évidence par Sinden et al., (1971) chez *P. syringae* pv. *syringae* B-3, B-5 et B-124 puis chez une cinquantaine d'autres souches (Gross and DeVay 1977; Currier and Morgan 1983; Fukuchi et al. 1990; Vassilev et al. 1996; Adetuyi et al. 1995; Scaloni et al. 1997; Bull et al. 1998; Monti et al. 2001; Grgurina et al. 2002; Fiore et al. 2008b; Kawasaki et al. 2016). La syringotoxine a été découverte chez *P. syringae* Ps268 (Gross and DeVay 1977) puis également détectée chez une quinzaine d'autres souches (Gonzalez et al. 1981; Ballio et al. 1990; Monti et al. 2001). Les pseudomycines ont, quant à elles, uniquement été observées chez *P. syringae* MSU16H (Ballio et al. 1994) et les syringostatines uniquement chez *P. syringae* pv. *syringae* SY12 (Isogai et al. 1989). Dans la famille des syringopeptines 22, les syringopeptines 22A et 22B ont été mises en évidences chez seulement deux souches : *P. syringae* pv. *syringae* B301D et B3A et les syringopeptines 22phVa et 22phVb chez deux autres souches : *P. syringae* pv. *syringae* B728a et Y37 (Ballio et al. 1991; Grgurina et al. 2002). Les syringopeptines 508A, 508B et SC1, SC2 ont quant à elles uniquement été observées chez *P. syringae* pv. *syringae* 508 et SC1 (Grgurina et al. 2005; Isogai et al. 1995). Enfin, les syringopeptines 25, dont la structure a été élucidée chez *P. syringae* pv. *syringae* B359 et B427 (Ballio et al. 1991) ont également été détectées chez *P. syringae* M1 (Adetuyi et al. 1995), *P. syringae* pv. *atrofaciens* NCPPB2612 (Vassilev et al. 1996), *P. syringae* pv. *syringae*

NCPPB3869 (Scaloni et al. 1997), B382-4 et B426-2 (Monti et al. 2001), *P. syringae* pv. *lachrymans* S91 (Fogliano et al. 1999) ainsi que *P. syringae* pv. *aptata* NCPPB872 et 2664 (Monti et al. 2001).

Aussi, la production des différents lipopeptides au sein de chaque famille a été étudiée chez des souches ne représentant qu'une partie de la diversité phylogénétique du complexe *P. syringae* qui est composé de 13 phylogroupes, 7 d'entre eux étant sous-divisés en 24 clades (Berge et al. 2014; Hall et al. 2019). En effet, hormis la souche *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 du clade 01a (Sarkar et al. 2006), les souches étudiées étaient essentiellement des *P. cichorii* affiliées au phylogroupe 11 et des *P. syringae* du phylogroupe 02 (Berge et al. 2014; Ballio et al. 1991; Grgurina et al. 2002, 2005). Dans de nombreux cas, le phylogroupe d'appartenance des souches productrices de lipopeptides n'a toutefois pas été déterminé.

Le but des travaux décrits dans cette partie est donc d'explorer la diversité de production de lipopeptides d'une collection de souches représentative de la diversité phylogénétique du complexe *P. syringae*. Les objectifs sont de déterminer d'une part, si les différents lipopeptides connus dans chacune des familles sont fréquemment produits et, d'autre part, si d'autres lipopeptides sont potentiellement synthétisés.

Pour cela, une collection de 709 souches, décrite dans la publication de Berge et al., (2014) et mise à disposition par l'équipe de Cindy Morris de l'Unité de Recherche de Pathologie Végétale de l'INRAE d'Avignon, a été explorée. La capacité de production de lipopeptides par ces souches a été étudiée par spectrométrie de masse à haut débit MALDI-ToF. Les molécules détectées ont été caractérisées structurellement par une approche combinée de spectrométrie de masse et de bioinformatique afin de déterminer s'il s'agissait de lipopeptides connus ou nouveaux. Enfin, une étude des relations entre la production de lipopeptides et la classification phylogénétique des souches, a été réalisée.

1.1. Diversité des lipopeptides produits

Les 709 souches du complexe *P. syringae* ont été étudiées pour leur aptitude à la production de lipopeptide par spectrométrie de masse MALDI-ToF. La détection des lipopeptides a été effectuée dans la gamme 800-5000m/z, sur les colonies bactériennes après culture sur les milieux PDA et SRM.

Les spectres issus de ces analyses ont révélé des masses allant de 1000 à 2500 m/z comme illustré sur la **Figure 20**. Elles ont été assignées, à des lipopeptides des 5 familles identifiées chez *P. syringae* :

- m/z entre 1100 et 1220 pour les syringafactines (Berti et al. 2007)
- m/z entre 1135 et 1305 pour les syringomycines (Segre et al. 1989)
- m/z entre 1980 et 2110 pour les corpeptines (Emanuele et al. 1998)
- m/z entre 2140 et 2260 pour les syringopeptines 22 (Ballio et al. 1991)
- m/z entre 2410 et 2520 pour les syringopeptines 25 (Ballio et al. 1991)

Lorsqu'elles correspondaient à des molécules connues dans la littérature, elles ont été assignées à ces dernières. Ces assignations demeurent hypothétiques dans la mesure où une masse donnée peut correspondre à plusieurs molécules de structures différentes.

Lorsque les masses observées ne correspondaient à aucune molécule connue, elles ont été assignées à de nouveaux variants de lipopeptides connus, à de nouvelles sous-familles de l'une des 5 familles connues ou n'ont pas été assignées. Dans ce dernier cas les masses observées pourraient correspondre à de nouvelles familles de lipopeptides.

Rappelons qu'il n'a jamais été observé qu'une souche produit plusieurs sous-familles appartenant à la même famille de lipopeptide. Dans une sous-famille donnée, une souche peut en revanche produire plusieurs variants dont les écarts de masse (*i.e.* 14Da, 28Da, 16Da) sont caractéristiques. Un écart de 14 ou 28 Da peut correspondre à une différence d'un ou deux groupements CH₂ au niveau de l'acide gras et/ou de la chaîne peptidique (*e.g.* remplacement d'un résidu de valine de masse 99,1 Da par un résidu de leucine de masse 113,1 Da). Un écart de 16 Da peut, quant à lui, correspondre à l'ajout ou au retrait d'un groupement OH.

Toutes les masses observées lors des analyses et les assignations correspondantes sont listées dans le **Tableau 6**. Les masses qui n'ont pas pu être assignées sont listées à la fin du tableau.

Les masses des lipopeptides de la famille des syringafactines seront notées sous formes sodées $[M+Na]^+$ et potassées $[M+K]^+$, tandis que, pour faciliter la lecture des résultats, seules les formes protonées $[M+H]^+$ des autres molécules détectées, seront mentionnées.

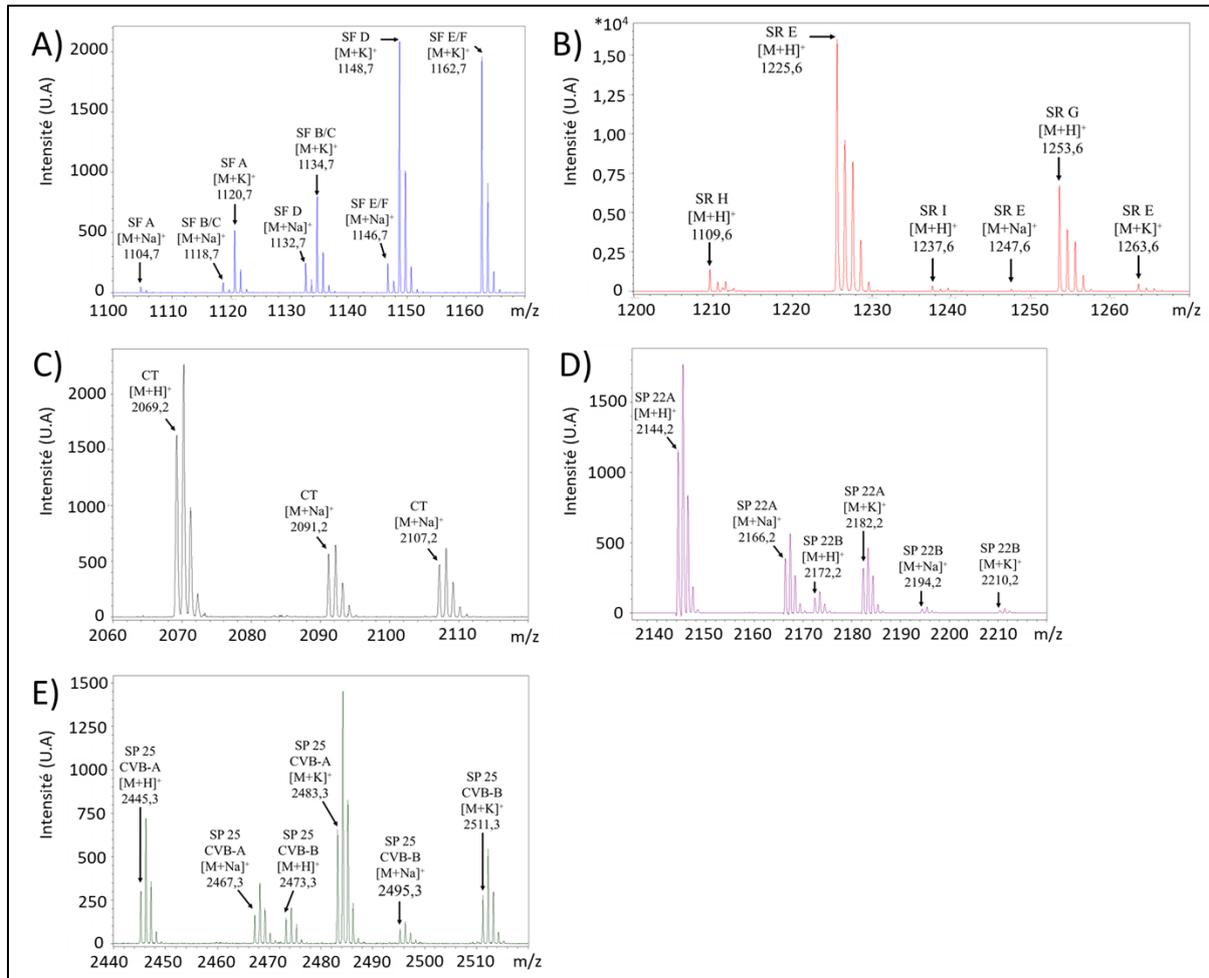


Figure 20 : Exemples de masses détectées au MALDI-ToF et assignées à différents lipopeptides des 5 familles décrites chez *P. syringae*

Avec A) Sous-familles des syringafactines, famille des syringafactines, B) Sous-famille des syringomycines, famille des syringomycines, C) Sous-famille des cichorinotoxines, famille des corpeptines, D) Sous-famille des syringopeptines 22, famille des syringopeptines 22, E) Nouvelle sous-famille des syringopeptines 25CVB, famille des syringopeptines 25

Tableau 6 : Récapitulatif des assignations sur les masses détectées par MALDI-ToF sur des colonies bactériennes

Les masses grisées sont celles qui ont été mises en évidence dans cette étude

[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	Assignation potentielle	Nombre de souches productrices	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	Assignation potentielle	Nombre de souches productrices
Famille des syringafactines					Famille des corpeptines				
548					7				
Sous-famille : syringafactine					Nouvelle sous-famille : cichopectine GAW				
ND	1104,7	1120,7	Syringafactine A	420	1983,3	ND	ND	Cichopectine GAW-A	5
ND	1118,8	1134,8	Syringafactine B/C	361	1997,3	2019,3	2035,3	Cichopectine GAW-B	3
ND	1132,8	1148,8	Syringafactine D	174	2011,3	2033,3	2049,3	Cichopectine GAW-C	5
ND	1146,8	1162,8	Syringafactine E/F	110	2025,3	2047,3	2063,3	Cichopectine GAW-D	5
Sous-famille : cichofactine					Sous-famille : cichorinotoxine				
ND	1131,8	1147,8	Cichofactine A	87	2069,2	2091,2	2107,2	Cichorinotoxine	1
ND	1159,8	1175,8	Cichofactine B	89	Nouvelle sous-famille : cichopectine 83				
ND	1145,8	1161,8	Cichofactine A [Leu/Ile6]	94	2063,3	2085,3	2101,3	Cichopectine 83-A	1
ND	1173,8	1189,8	Cichofactine B [Leu/Ile6]	94	2077,3	2099,3	2115,3	Cichopectine 83-B	1
ND	1201,8	1217,8	Cichofactine E	9	Famille des syringopeptines 22				
344					195				
Sous-famille : syringotoxine					Sous-famille : syringopeptine 22				
1136,6	1158,6	1174,6	Syringotoxine B	52	2144,2	2166,2	2182,2	Syringopeptine 22A	101
1152,6	1174,6	1190,6	Syringotoxine C	73	2172,2	2194,2	2210,2	Syringopeptine 22B	95
1164,6	ND	ND	Syringotoxine D	15	Nouvelle sous-famille : syringopeptine 22CCV				
1180,6	1202,6	1218,6	Syringotoxine E	47	2146,3	2168,3	2184,3	Syringopeptine 22CCV-A	5
Sous-famille : syringostatine					2174,4	ND	ND	Syringopeptine 22CCV-B	2
1179,6	1201,6	1217,6	Syringostatine A	33	Nouvelle sous-famille : syringopeptine 22CVB				
1195,6	1217,6	1233,6	Syringostatine B	34	2160,2	2182,2	2198,2	Syringopeptine 22CVB-A	7
1163,6	ND	ND	Syringostatine C	20	2188,2	2210,2	2226,2	Syringopeptine 22CVB-B	6
1207,6	ND	ND	Syringostatine D	24	Sous-famille : syringopeptine 508				
1223,6	1245,6	ND	Syringostatine E	24	2188,2	2210,2	2226,2	Syringopeptine 508A	82
Sous-famille : pseudomycine					2216,3	2238,3	2254,3	Syringopeptine 508B	81
1223,6	1245,6	ND	Pseudomycine A	2	Famille des syringopeptines 25				
1207,6	ND	ND	Pseudomycine B	2	147				
1251,6	1273,6	1289,6	Pseudomycine C	4	Sous-famille : syringopeptine 25				
1235,6	1257,6	1273,6	Pseudomycine C'	3	2399,4	2421,4	2437,4	Syringopeptine 25A	46
1219,6	ND	ND	Pseudomycine D	1	2427,4	2449,4	2465,4	Syringopeptine 25B	17
1263,7	1285,7	1301,7	Pseudomycine E	2	Nouvelle sous-famille : syringopeptine 25UB				
1279,7	ND	ND	Pseudomycine F	1	2412,4	2434,4	2450,4	Syringopeptine 25UB-A	10
1291,7	ND	ND	Pseudomycine G	1	Nouvelle sous-famille : syringopeptine 25TA				
Sous-famille : syringomycine					2441,4	2463,4	2479,4	Syringopeptine 25TA-A	8
1197,6	ND	ND	Syringomycine A1	61	2469,4	ND	2507,4	Syringopeptine 25TA-B	2
1225,6	1247,6	1263,6	Syringomycine E	230	Nouvelle sous-famille : syringopeptine 25USA				
1253,6	1275,6	1291,6	Syringomycine G	217	2443,5	2465,5	2481,5	Syringopeptine 25USA-A	31
1209,6	ND	ND	Syringomycine H	190	Nouvelle sous-famille : syringopeptine 25CVB				
1237,6	ND	ND	Syringomycine I	126	2445,3	2467,3	2483,3	Syringopeptine 25CVB-A	52
1281,6	ND	ND	Syringomycine J	45	2473,3	2495,3	2511,3	Syringopeptine 25CVB-B	39
Nouvelle sous-famille : syringosine					Masses non assignées				
1249,6	ND	ND	Syringosine A	2	1120,8	1142,8	1158,8		27
1265,6	1287,6	1303,6	Syringosine B	2	1134,8	1156,8	1172,8		39
1281,6	ND	ND	Syringosine C	2	1148,8	1170,8	1186,8		22
1293,7	ND	ND	Syringosine D	2	1147,7	1169,7	1185,7		25
					1161,7	1183,7	1199,7		27
					1175,7	1197,7	1213,7		26
					1189,7	1211,7	1227,7		29
					1093,7	ND	ND		3
					1121,7	1143,7	1159,7		7

Parmi les souches testées, 77,3% produisent des molécules de la famille des syringafactines. Les molécules les plus fréquemment produites sont celles dont les m/z correspondent aux formes sodées et potassées des syringafactines A, B/C, D, E/F (Berti et al. 2007). Elles sont respectivement synthétisées par 420, 361, 174 et 110 souches. A noter que les variants B et C de formules brutes identiques $C_{55}H_{101}N_9O_{13}$ ainsi que les variants E et F de formules brutes identiques $C_{57}H_{105}N_9O_{13}$ ne peuvent pas être distingués car ils possèdent les mêmes masses. Les masses des formes sodées et potassées des cichofactines A et B (Pauwelyn et al. 2013) ont été détectées chez respectivement 87 et 89 souches. 94 souches produisent également des molécules de m/z 1145,8 $[M+Na]^+$, 1161,8 $[M+K]^+$ et m/z 1173,8 $[M+Na]^+$, 1189,8 $[M+K]^+$ et 9 souches produisent des molécules de m/z 1201,8 $[M+Na]^+$, 1217,8 $[M+K]^+$ qui ont été assignées à des variants de cichofactine.

Des souches étudiées, 48,5% produisent des molécules dont les m/z correspondent à différents lipopeptides de la famille des syringomycines. Les plus fréquemment produites sont les molécules de masses identiques aux syringomycines E et G (Segre et al. 1989) et les molécules de m/z 1209,6 $[M+H]^+$ et 1237,6 $[M+H]^+$ qui ont été assignées à des variants de syringomycine. Une molécule de la même masse que la syringomycine A1 (Segre et al. 1989) et une autre molécule de m/z 1281,6 $[M+H]^+$ sont deux autres variants moins fréquemment produits par les souches testées. Les souches étudiées produisent également des molécules de masses identiques à celles de la syringotoxine B (Ballio et al. 1990) et des syringostatines A et B (Isogai et al. 1989) ainsi que des molécules qui ont été assignées à des variants de syringotoxine (m/z 1152,6 $[M+H]^+$, 1164,6 $[M+H]^+$, 1180,6 $[M+H]^+$) et à des variants de syringostatine (m/z 1163,6 $[M+H]^+$, 1207,6 $[M+H]^+$, 1223,6 $[M+H]^+$) qui diffèrent probablement par la longueur de l'acide gras. Les molécules dont les m/z correspondent aux pseudomycines A, B, C, C' (Ballio et al. 1994) et leurs variants potentiels (m/z 1219,6 $[M+H]^+$, 1263,7 $[M+H]^+$, 1279,7 $[M+H]^+$, 1291,7 $[M+H]^+$) sont produites par moins de 5 souches. Deux souches produisent quant à elles quatre molécules de m/z 1249,6 $[M+H]^+$, 1265,6 $[M+H]^+$, 1281,6 $[M+H]^+$ et 1293,7 $[M+H]^+$ ne correspondant à aucun lipopeptide connu. Ces molécules n'étant pas co-produites avec d'autres syringomycines connues, elles pourraient correspondre aux quatre variants d'une nouvelle sous-famille de syringomycine que nous proposons d'appeler syringosine.

Seulement 7 des 709 souches étudiées produisent des molécules de la famille des corpeptines (Emanuele et al. 1998). Le spectre d'une de ces souches a montré des pics de masse qui pourraient correspondre à la cichorinotoxine identifiée récemment chez *P. cichorii* YM8705 (Komatsu et al. 2019). Cinq souches produisent des molécules de m/z 1983,3 [M+H]⁺, 1997,3 [M+H]⁺, 2011,3 [M+H]⁺, 2025,3 [M+H]⁺ et 1 souche produit des molécules m/z 2063,3 [M+H]⁺, 2077,3 [M+H]⁺. Elles ont été assignées à des variants de deux nouvelles sous-familles de corpeptine que nous proposons d'appeler cicho-peptine GAW et cicho-peptine 83.

Au sein de la collection, 27,5% des souches produisent des molécules dans la gamme de masse des syringopeptines 22. Les plus fréquemment produites sont celles dont les m/z correspondent aux syringopeptines 22A et 22B (Ballio et al. 1991) détectées chez respectivement 101 et 95 souches et 508A et 508B chez respectivement 82 et 81 souches (Grgurina et al. 2005). Quatre autres molécules de m/z 2146,3 [M+H]⁺, 2174,4 [M+H]⁺ et m/z 2160,2 [M+H]⁺, 2188,2 [M+H]⁺ sont produites par moins de 10 souches. Elles correspondent probablement aux variants de deux nouvelles sous-familles de syringopeptines 22 que nous appellerons syringopeptine 22CCV et syringopeptine 22CVB.

Un total de 147 souches produit des molécules de la famille des syringopeptines 25, les plus longs lipopeptides identifiés à ce jour. Les plus fréquemment produites sont les molécules de masses identiques aux syringopeptines 25A et 25B (Ballio et al. 1991) et celles dont les m/z correspondent probablement à deux nouvelles sous-familles des syringopeptines 25 appelées syringopeptine 25USA et syringopeptine 25CVB (m/z 2443,5 [M+H]⁺ et m/z 2445,3 [M+H]⁺, 2473,3 [M+H]⁺). Trois autres molécules de m/z 2412,4 [M+H]⁺ et 2441,4 [M+H]⁺, 2469,4 [M+H]⁺ produites par respectivement 10, 8 et 2 souches, correspondent probablement à deux autres nouvelles sous-familles de syringopeptines 25 appelées syringopeptine 25UB et syringopeptine 25TA.

Enfin, d'autres masses qui n'ont pu être assignées à aucune des familles connues chez *P. syringae* pourraient correspondre à de nouveaux lipopeptides qui ne seraient ni de nouveaux variants de sous-familles connues, ni de nouvelles sous-familles de familles connues. Un premier groupe de masses (m/z 1120,8 [M+H]⁺, 1134,8 [M+H]⁺, 1148,8 [M+H]⁺) séparées les unes des autres de 14 Da ou 28 Da pourraient correspondre à 3 variants d'une même sous-famille présentant des variations au niveau de l'acide gras et/ou de la chaîne peptidique. Un deuxième groupe de masses (m/z 1147,7 [M+H]⁺, 1161,7 [M+H]⁺, 1175,7 [M+H]⁺, 1189,7 [M+H]⁺) également séparées de 14 Da ou 28 Da les unes des autres, pourrait correspondre aux 4 variants d'une seconde sous-famille. Enfin, deux molécules de m/z 1093,7 [M+H]⁺ et 1121,7

[M+H]⁺, séparées de 28 Da pourraient correspondre aux deux variants d'une troisième sous-famille dont la différence se situerait probablement au niveau de la taille de l'acide gras. Bien que dans la gamme de masse des syringafactines (m/z 1100 à 1220), ces molécules ne sont à priori pas des lipopeptides de cette famille. En effet, elles ne présentent aucune différence de masse caractéristique avec les syringafactines connues. Ces molécules n'ont pas pu être analysées de manière approfondie au cours de ce travail. Des analyses de spectrométrie de masse complémentaires devront donc être entreprises pour définir leur nature et leur composition.

En conclusion, 59 lipopeptides, appartenant à 5 familles (syringafactines, syringomycines, corpeptines, syringopeptines 22, syringopeptines 25) sont produits par les souches de la collection explorée. Trente-six d'entre eux n'ont jamais été décrits dans la littérature, qui référence actuellement 30 de ces molécules chez *P. syringae* (Götze and Stallforth 2019). Parmi les nouveaux lipopeptides, 16 seraient de nouveaux variants de lipopeptides connus de la famille des syringafactines et syringomycines et 20 seraient les variants de 9 nouvelles sous-familles appartenant aux familles des syringomycines, corpeptines et syringopeptines 22 et 25. Certaines molécules connues comme étant produites par des souches du complexe *P. syringae* n'ont en revanche pas été détectées. C'est le cas des cichozeptines A et B, produites par *P. cichorii* SF1-54 (Huang et al. 2015), des syringopeptines SC1 et SC2, produites par *P. syringae* SC1 (Isogai et al. 1995), 22phVa et 22phVb, produites par *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Grgurina et al. 2002) et de la syringopeptine 25A [Phe25], variant co-produit avec les syringopeptines 25A et 25B chez *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB3869 (Scaloni et al. 1997).

Notons également qu'une souche donnée est capable de produire des lipopeptides appartenant jusqu'à 3 familles différentes. Nous en discuterons dans la partie 1.5 des résultats.

Dans la suite du travail, présentée dans les trois parties suivantes (1.2 à 1.4), la caractérisation structurale des lipopeptides observés a été réalisée par une approche combinée de spectrométrie de masse et de bioinformatique afin de déterminer s'il s'agissait de nouveaux variants de sous-familles connues, de nouvelles sous-familles ou des lipopeptides déjà décrits dans la littérature. Notons que chacun des lipopeptides a été caractérisé au moyen de l'analyse d'une souche productrice. Nous avons fait l'hypothèse que les molécules de même masse, détectées chez d'autres souches, possédaient la même structure.

Points clés à retenir :

- *59 lipopeptides produits répartis dans 5 familles connues*
- *36 nouveaux lipopeptides non décrits dans la littérature*
 - *Nouvelles sous-familles*
 - *Nouveaux variants de sous-familles connues*
- *Plusieurs lipopeptides décrits chez *P. syringae*, non produits par les souches étudiées*

1.2. Identification de nouveaux variants de syringafactines

Dans la partie précédente, plusieurs des molécules produites par les souches étudiées ont été assignées à des variants connus de syringafactine (A à F) et des variants connus (A et B) et nouveaux de cichofactine, deux sous-familles de la famille des syringafactines.

L'étude de la structure chimique des variants de la sous-famille des syringafactines, tous déjà connus, a permis de confirmer les assignations proposées mais ne sera pas présentée ici. Seule l'étude de la structure chimique des variants de cichofactine, connus et nouveaux, sera développée dans cette partie.

La caractérisation chimique des cichofactines a été réalisée à partir d'un surnageant issu d'une culture liquide en milieu SRM, concentré 30 fois par ultrafiltration, de la souche *P. cichorii* CFBP4407. Elle produit, en milieu solide, des molécules de masses identiques aux cichofactines A et B publiées par Pauwelyn et al., 2013 ainsi que deux molécules de m/z 1145,8 $[M+Na]^+$ et 1173,8 $[M+Na]^+$ assignées à deux nouveaux variants de cichofactines ci-après appelées Variant 1 et Variant 2. En milieu liquide la souche produit les molécules assignées aux cichofactines A et B, les variants 1 et 2 et deux autres molécules de m/z 1135,9 $[M+H]^+$ et 1163,9 $[M+H]^+$, ci-après appelées Variant 3 et Variant 4 qui n'avaient pas été détectées en milieu solide (**Figure 21**).

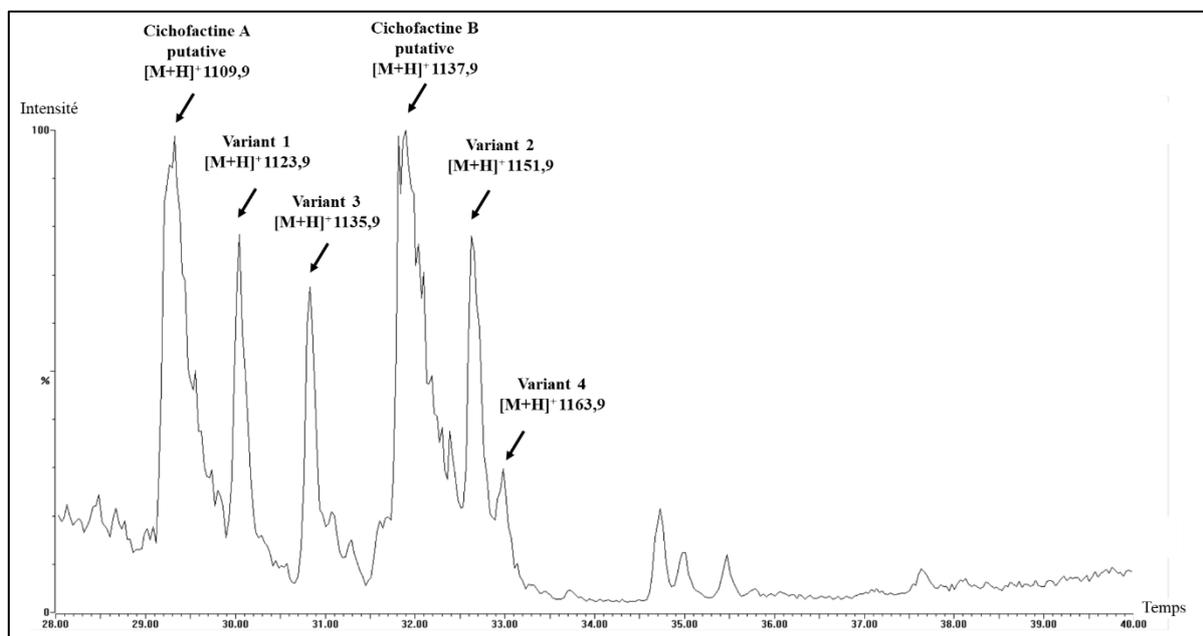


Figure 21 : Chromatogramme des ions totaux (TIC) en LC-MS/MS du surnageant de culture SRM de la souche *P. cichorii* CFBP4407 concentré 30 fois par ultrafiltration

Suite à leur détection, chacun de ces variants a été fragmenté dans le but de déterminer leur structure.

Ces fragmentations ont généré des ions de série b (charge retenue du côté C-Terminal) et y (charge retenue du côté N-Terminal), listés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Liste des ions b et y obtenus après fragmentations des ions de m/z $[M+H]^+$ 1109,8, 1137,9, 1123,8, 1151,8, 1135,8 et 1163,8 correspondant aux formes protonées respectives des cichofactines A et B putatives et des variants 1, 2, 3, 4

Les masses encadrées correspondent aux ions $[M+H]^+$ parents

Cichofactine A putative Composition en AA déduite des masses observées			Cichofactine B putative Composition en AA déduite des masses observées		
([M+H] ⁺ 1109,8)			([M+H] ⁺ 1137,9)		
	Ions de série b	Ions de série y		Ions de série b	Ions de série y
AG-AA1	b1 ND	-	AG-AA1	b1 ND	-
(AA2) Leu/Ile	b2 284,3	y8 ND	(AA2) Leu/Ile	b2 312,3	y8 ND
(AA3) Gln/Lys	b3 397,3	y7 826,6	(AA3) Gln/Lys	b3 425,4	y7 826,6
(AA4) Leu/Ile	b4 525,4	y6 713,5	(AA4) Leu/Ile	b4 553,4	y6 713,5
(AA5) Gln/Lys	b5 638,5	y5 585,5	(AA5) Gln/Lys	b5 666,5	y5 585,4
(AA6) Val	b6 766,6	y4 472,4	(AA6) Val	b6 794,6	y4 472,4
(AA7) Leu/Ile	b7 865,7	y3 ND	(AA7) Leu/Ile	b7 893,7	y3 ND
(AA8) Leu/Ile-COOH	b8 978,7	y2 ND	(AA8) Leu/Ile-COOH	b8 1006,8	y2 ND
	1109,8	y1 ND		1137,9	y1 ND
Variant 1 ([M+H] ⁺ 1123,8)			Variant 2 ([M+H] ⁺ 1151,8)		
	Ions de série b	Ions de série y		Ions de série b	Ions de série y
AG-AA1	b1 ND	-	AG-AA1	b1 ND	-
(AA2) Leu/Ile	b2 284,3	y8 ND	(AA2) Leu/Ile	b2 312,3	y8 ND
(AA3) Gln/Lys	b3 397,3	y7 840,6	(AA3) Gln/Lys	b3 425,4	y7 840,6
(AA4) Leu/Ile	b4 525,4	y6 727,5	(AA4) Leu/Ile	b4 553,4	y6 727,5
(AA5) Gln/Lys	b5 638,5	y5 599,5	(AA5) Gln/Lys	b5 666,5	y5 599,5
(AA6) Leu/Ile	b6 766,6	y4 486,4	(AA6) Leu/Ile	b6 794,6	y4 486,4
(AA7) Leu/Ile	b7 879,7	y3 ND	(AA7) Leu/Ile	b7 907,7	y3 ND
(AA8) Leu/Ile-COOH	b8 992,8	y2 ND	(AA8) Leu/Ile-COOH	b8 1020,8	y2 ND
	1123,8	y1 ND		1151,8	y1 ND
Variant 3 ([M+H] ⁺ 1135,8)			Variant 4 ([M+H] ⁺ 1163,8)		
	Ions de série b	Ions de série y		Ions de série b	Ions de série y
(AA1) Leu/Ile	b1 197,2	-	(AA1) Leu/Ile	b1 225,1	-
(AA2) Leu/Ile	b2 310,3	y8 ND	(AA2) Leu/Ile	b2 338,3	y8 ND
(AA3) Gln/Lys	b3 423,4	y7 826,6	(AA3) Gln/Lys	b3 451,4	y7 826,6
(AA4) Leu/Ile	b4 551,4	y6 713,5	(AA4) Leu/Ile	b4 579,5	y6 713,5
(AA5) Gln/Lys	b5 664,5	y5 585,4	(AA5) Gln/Lys	b5 692,6	y5 858,5
(AA6) Val	b6 792,6	y4 472,4	(AA6) Val	b6 820,6	y4 472,4
(AA7) Leu/Ile	b7 891,7	y3 ND	(AA7) Leu/Ile	b7 919,7	y3 ND
(AA8) Leu/Ile-COOH	b8 1004,8	y2 ND	(AA8) Leu/Ile-COOH	b8 1032,8	y2 ND
	1135,8	y1 ND		1163,8	y1 ND

La structure de ces lipopeptides a été déterminée via l'analyse des différences de masses calculées entre chacun des fragments observés. Par exemple, pour chaque variant, la différence de m/z de 113 Da, observée entre les ions b3 et b2 correspond à la masse d'un résidu de leucine ou d'isoleucine. Cela indique que tous les variants possèdent une leucine ou une isoleucine en position 2 de la chaîne peptidique. La différence de m/z entre l'ion parent (non fragmenté) et l'ion b8 (premier fragment observé du côté C-Terminal) permet quant à elle de déterminer si la molécule est cyclique ou linéaire. Pour chaque variant, cette différence est de 131 Da et correspond à une leucine ou une isoleucine ayant conservé son groupement carboxylique (Leu/Ile-COOH). Cet acide aminé n'est donc pas impliqué dans la cyclisation du lipopeptide, ce qui indique que les 6 variants sont linéaires comme c'est le cas pour les cichofactines déjà décrites (Pauwelyn et al. 2013). Les analyses des 6 spectres de fragmentation ont ainsi permis de proposer une structure pour chaque variant de cichofactine. Ces structures sont présentées dans la **Figure 22A**.

En parallèle des analyses de spectrométrie de masse, le génome de la souche *P. cichorii* CFBP4407 a été analysé *in silico* avec le programme AntiSMASH dans le but de détecter les gènes impliqués dans la synthèse des 6 variants puis de prédire leur structure. Cette analyse a permis d'identifier un seul cluster composé de deux gènes de 9498 et 17721 pb codant respectivement pour 3 et 5 modules NRPS comprenant les domaines spécifiques de condensation (C), d'adénylation (A) et de thiolation (T). Chez *P. cichorii* SF1-54 productrice des cichofactines A et B, ces deux gènes ont été nommés *cifA* et *cifB* (Pauwelyn et al. 2013). Nous proposons donc de les nommer de la même manière chez *P. cichorii* CFBP4407. Les particularités des synthétases NRPS de lipopeptides sont également retrouvées à savoir la présence d'un domaine Cstarter en début de synthétase, responsable de l'incorporation de l'acide gras et d'un tandem de thioestérase, en fin de synthétase, qui est caractéristique de certaines synthétases de lipopeptides de *Pseudomonas* (Roongsawang et al. 2011).

Le programme NRSPredictor2 et le code de Stachelhaus, intégrés à AntiSMASH, ont été utilisés pour prédire les acides aminés probablement incorporés par chaque domaine A. De même, le programme NaPDoS a été utilisé pour prédire les sous-types de chaque domaine C et ainsi prédire *in silico* l'isomérisation potentielle de chaque acide aminé (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Prédiction des acides aminés incorporés par les domaines A avec le programme NRSPredictor2 et le code de Stachelhaus et prédiction de leur isomérisation avec le programme NaPDOS

Ordre des modules	Prédiction NRSPredictor2		Prédiction Stachelhaus			Prédiction de l'isomérisation du monomère avec NaPDOS
	AA Prédit(s)	Niveau de prédiction	Code de Stachelhaus identifié	AA Prédit	% d'identité avec le code spécifique déterminé par Stachelhaus	
1	Leu	Single AA	DAWFLGNVVK	Leu	100	D
2	Leu	Single AA	DAWFLGNVVK	Leu	100	D
3	Asp/Asn/Glu/Gln	Large cluster	DAwqvGVVDK	Gln	70	D
4	Leu	Single AA	DAWFLGNVVK	Leu	100	L
5	Asp/Asn	Small cluster	DAwqvGVVDK	Gln	70	D
6	Val	Single AA	DAmfmGGTFK	Val	70	L
7	Leu	Single AA	DAWFLGNVVK	Leu	100	D
8	Leu	Single AA	DAWFLGNVVK	Leu	100	L

La séquence peptidique prédite des cichofactines, proposée à la suite de ces analyses, est présentée dans la **Figure 22B**.

En ce qui concerne les isomérisations des acides aminés, les analyses prédictives que nous avons réalisées ont permis d'obtenir les mêmes prédictions que celles publiées par Pauwelyn et al., (2013) chez *P. cichorii* SF1-54, productrice des cichofactines A et B et Berti et al., (2007) chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, productrice des syringafactines A à F. Götze a toutefois montré que les deux premiers domaines C/E des synthétases produisant des lipopeptides de la famille des syringafactines n'étaient que partiellement fonctionnels. Ils sont en effet incapables d'épimériser les L-Leucine en D-Leucine mais conservent leur capacité à former la liaison peptidique. Chez les syringafactines A à F et les cichofactines A et B, les deux premiers acides aminés sont donc des L-Leucine (Götze et al. 2019). La synthétase de cichofactines que nous avons identifiée chez *P. cichorii* CFBP4407 suit vraisemblablement le même schéma. Des analyses chimiques complémentaires doivent toutefois être réalisées pour déterminer si les variants de cichofactine produits par cette souche présentent des D-Leucine ou des L-Leucine aux deux premières positions de la chaîne peptidique.

La confrontation des données de spectrométrie de masse aux prédictions informatiques a ensuite permis de proposer une structure complète pour chaque variant (**Figure 22C**).

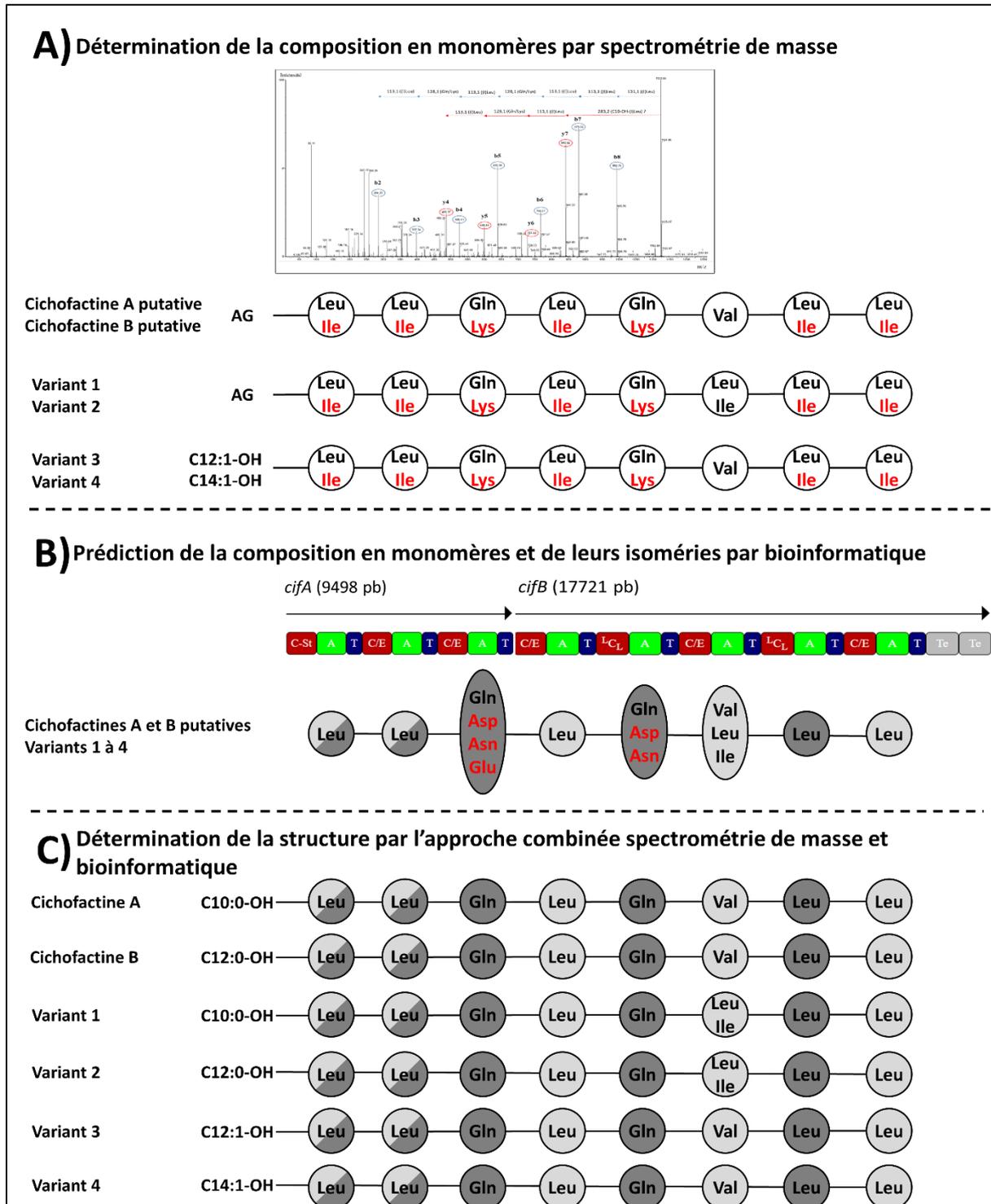


Figure 22 : Détermination de la structure des cichofactines A et B et des 4 nouveaux variants de cichofactine par une analyse combinée LC-MS/MS et bioinformatique

Isomérisation impossible à prédire Isomérisation D prédite Isomérisation L prédite → Monomère retrouvé dans la structure → Monomère non retrouvé dans la structure

Pour les acides aminés 1, 2, 4, 7 et 8, les données de spectrométrie de masse ne permettaient pas la distinction entre leucine et isoleucine dont les masses sont identiques. Au regard des prédictions réalisées, ces acides aminés seraient des leucines (Prédiction Single AA par NRPSPredictor2 et 100% d'identité du code Stachelhaus identifié avec le code Stachelhaus spécifique de la leucine). Aux positions 3 et 5, les données de spectrométrie de masse ont permis d'identifier la présence de glutamine ou de lysine. Bien que les analyses bioinformatiques n'aient pas prédit l'incorporation de glutamine de manière certaine (NRPSPredictor 2 : asp, asn, glu, gln / Stachellaus : gln 70%), aucune lysine n'a été prédite. Les acides aminés 3 et 5 sont donc très probablement des glutamines. La présence de cet acide aminé aux mêmes positions chez les cichofactines A et B publiées par Pauwelyn et al., (2013) appuie également ces observations. Concernant le 6^{ème} acide aminé, les analyses *in silico* ont prédit l'incorporation de valine, de leucine ou d'isoleucine. La fragmentation par spectrométrie de masse a permis d'identifier l'acide aminé numéro 6 comme étant de la valine pour les molécules assignées aux cichofactines A et B et les variants 3 et 4 et une leucine (ou une isoleucine) pour les variants 1 et 2. Enfin, la connaissance du premier acide aminé (Leu), permet de déterminer l'acide gras des molécules assignées aux cichofactines A et B et celui des variants 1 et 2, dont la composition n'avait pas pu être déterminée par spectrométrie de masse. Après fragmentation en LC-MS/MS, les m/z des fragments AG-AA1 étaient de 284,3 pour la cichofactine A et le variant 1 et 312,3 pour la cichofactine B et le variant 2. En retirant la masse d'un résidu de leucine (113,1 Da), à ces m/z, il est possible de déduire les m/z des acides gras seuls. Ils sont respectivement de 171,1 Da et 199,1 Da, correspondant à C10:0-OH et C12:0-OH. La position du groupement OH sur l'acide gras ne peut toutefois, ni être déterminée par spectrométrie de masse, ni par bioinformatique. Par analogie avec les cichofactines connues et plus généralement tous les lipopeptides de *Pseudomonas* dont l'acide gras est monohydroxylé, le groupement hydroxyle serait placé sur le carbone 3 (Götze and Stallforth 2019).

Les structures des variants de cichofactine proposées à la suite de cette étude, sont présentées dans la **Figure 22C**.

Cette étude a d'abord permis de confirmer la production de cichofactine A (C₅₅H₁₀₀N₁₀O₁₃) et B (C₅₇H₁₀₄N₁₀O₁₃) par la souche *P. cichorii* CFBP4407, les structures proposées étant identiques à celles des cichofactines A et B décrites par Pauwelyn et al., (2013).

A propos des variants 1 (C₅₆H₁₀₂N₁₀O₁₃) et 2 (C₅₈H₁₀₆N₁₀O₁₃), ils diffèrent respectivement des cichofactines A et B par la présence d'une leucine (ou isoleucine) à la place d'une valine en position 6 de la chaîne peptidique. C'est pourquoi nous avons proposé de les nommer Cichofactine A [Leu/Ile6] et Cichofactine B [Leu/Ile6].

Les variants 3 (C₅₇H₁₀₂N₁₀O₁₃) et 4 (C₅₉H₁₀₆N₁₀O₁₃) diffèrent quant à eux des cichofactines A et B au niveau des acides gras qui sont des C12:1-OH(3) et C14:1-OH(3) au lieu de C10:0-OH(3) et C12:0-OH(3) respectivement. Nous proposons de les nommer Cichofactine C et Cichofactine D.

Comme les syringafactines A à F (Berti et al. 2007) et les virginiafactines A à D (Götze et al. 2019), les variants de cichofactine varient donc au niveau de l'acide gras ou au niveau du 6^{ème} acide aminé de la chaîne peptidique. Il est tout à fait possible que d'autres variants présentant d'autres combinaisons Acide gras/Acide aminé 6 aient été produits par la souche *P. cichorii* CFBP4407, dans des concentrations toutefois trop faibles pour être détectés.

La flexibilité de certains domaines A menant à la production de plusieurs variants par une même synthétase est un phénomène connu qui a été montré chez plusieurs autres lipopeptides, produits par des bactéries du genre *Pseudomonas*, tels que les massetolides (de Bruijn et al. 2008), les putisolvines (Dubern et al. 2008) ou les orfamides (Ma et al. 2016). Les variants ainsi produits ont des structures très proches mais des activités biologiques (e.g. antimicrobiennes) parfois variables (Gerard et al. 1997). Dans le cas des cichofactines, connues pour être impliquées dans le phénomène de « swarming » et pour leurs propriétés anti-levure (Pauwelyn et al. 2013), les différents variants pourraient donc avoir des activités variables. Dans la famille des viscosines, Gerard et al., (1997) ont par exemple montré que le seul remplacement d'une valine par une isoleucine en position 4, entre la viscosine et le massetolide A permettait de diminuer par deux la Concentration Minimale Inhibitrice de ce dernier contre *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium avium-intracellulare* (Gerard et al. 1997).

Il est donc utile d'étudier chaque variant individuellement, le variant le plus produit n'étant pas toujours le plus intéressant.

En conclusion, cette étude a permis de confirmer d'une part les assignations de certaines masses, à des variants de syringafactines et de cichofactines connus et d'autre part de mettre en évidence la production de nouveaux variants de cichofactines dont les structures varient au niveau de l'acide gras ou de l'acide aminé numéro 6. Une autre molécule produite par 9 souches et détectée à m/z 1201,8 $[M+Na]^+$ a également été assignée à un variant de cichofactine dans la partie précédente. Ce variant n'étant pas produit par la souche analysée plus en profondeur (*i.e.* *P. cichorii* CFBP4407), sa structure n'a pas pu être définie au cours de ce travail.

Points clés à retenir :

- *Pas de nouvelles sous-familles de syringafactine produites par les souches étudiées*
- *Au moins 4 nouveaux variants de la sous-famille des cichofactines*
- *Variation des cichofactines au niveau du 6^{ème} acide aminé (flexibilité du domaine A) et de l'acide gras*

1.3. Identification de nouvelles syringomycines

Plusieurs des molécules produites par les souches étudiées ont été assignées à des variants de 4 sous-familles connues (*i.e.* syringomycine, syringotoxine, syringostatine, pseudomycine) et d'une nouvelle sous-famille (*i.e.* syringosine) de syringomycine.

Cette partie expose l'analyse de leur structure qui a été réalisée en utilisant 5 souches produisant chacune les variants d'une sous-famille distincte de cette famille de lipopeptides (**Tableau 9**).

Pour ces différents lipopeptides, l'étude de la structure a été réalisée à partir des données de masse observées sur colonies et des analyses *in silico* des génomes des souches choisies. Les fragmentations par spectrométrie de masse de ces lipopeptides ont été réalisées au MALDI-ToF mais les spectres obtenus n'ont pas donné d'informations suffisantes pour pouvoir préciser leur structure. Cela est probablement dû au fait que ces molécules sont à la fois cycliques et chlorées et que leur fragmentation nécessite une énergie plus importante.

Tableau 9 : Récapitulatif des différentes sous-familles de la famille des syringomycines et leurs variants, produits par les souches étudiées

Les masses grisées sont celles qui ont été mises en évidence dans cette étude

Souche	<i>P. syringae</i> CVB0031	<i>P. syringae</i> CCV0214	<i>P. syringae</i> CC1466	<i>P. cichorii</i> CFBP4407	<i>P. syringae</i> USA0035
Sous-famille	Syringomycine	Syringotoxine	Syringostatine	Pseudomycine	Nouvelle sous-famille Syringosine
Variants	1197,6 A1	1136,6 B	1179,6 A	1235,6 C'	1249,6 A
	1225,6 E	1152,6 C	1195,6 B	1251,6 C	1265,6 B
	1253,6 G		1207,6 D	1219,6 D	1281,6 C
	1209,6 H		1223,6 E	1263,7 E	1293,7 D
	1237,6 I			1279,7 F	

Les génomes des 5 souches choisies ont été analysés *in silico* en utilisant le cluster de biosynthèse des syringomycines A1, E et G, décrit chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D (numéro d'accèsion GenBank NZ_CP005969.1) en référence (Gross and Loper 2009; Segre et al. 1989) (**Figure 23**).

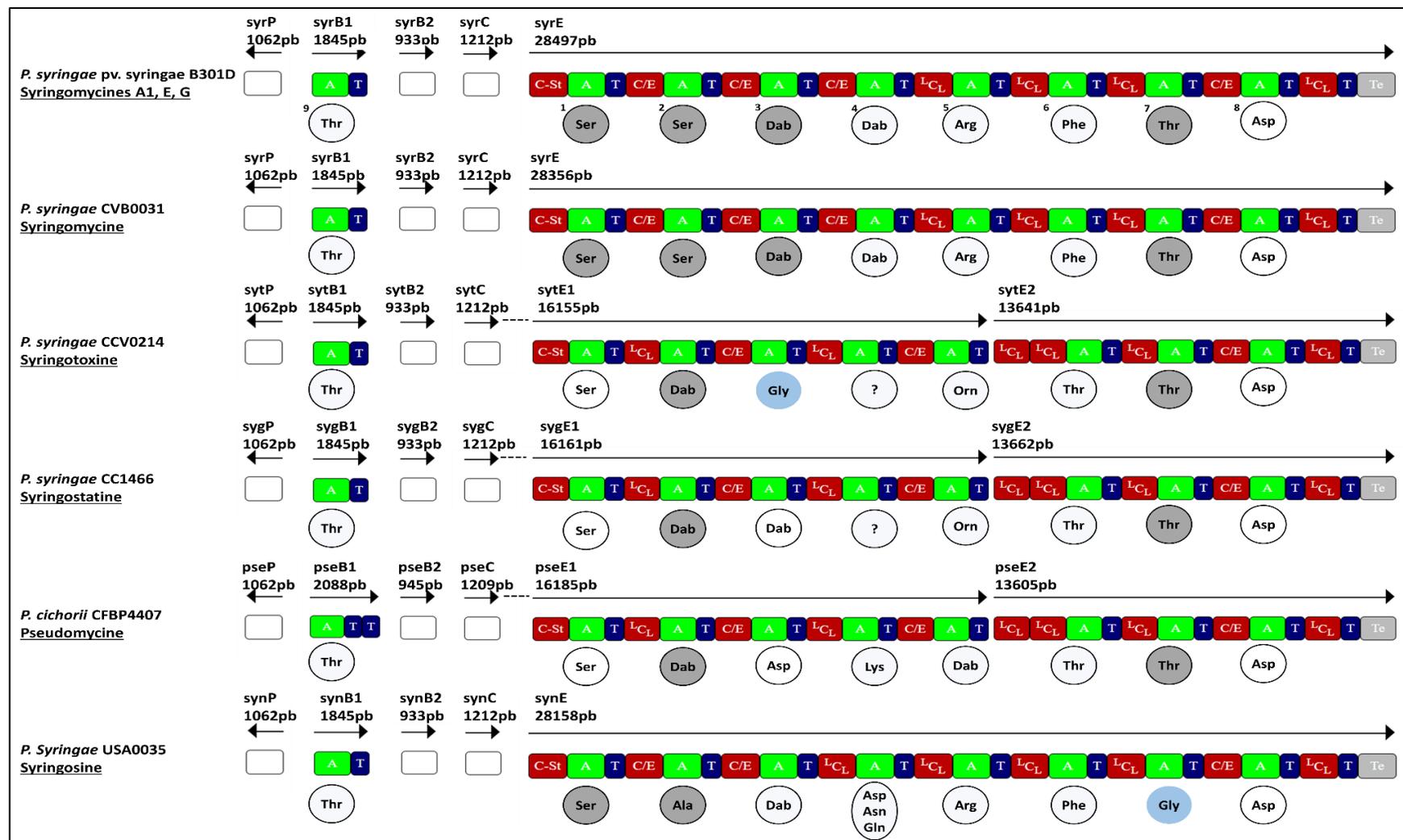


Figure 23 : Régions génomiques responsables de la production des molécules assignées aux syringomycines chez *P. syringae* CVB0031, syringotoxines chez *P. syringae* CCV0214, syringostatine chez *P. syringae* CC1466, pseudomycines chez *P. cichorii* CFBP4407, syringosine chez *P. syringae* USA0035 et syringomycines A1, E, G chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D

● Isomérisation D prédite ● Isomérisation L prédite ● Achiral

Rappelons que chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D, le cluster de biosynthèse des syringomycines A1, E et G est composé de deux gènes NRPS *syrB1* et *syrE*, flanqués de trois gènes nommés *syrP*, *syrB2* et *syrC*. Le gène *syrB1* code pour 1 module NRPS tandis que le gène *syrE* code pour 8 modules NRPS et pour les domaines C et T de ce qui pourrait être un 9^{ème} module, exempt de domaine A. Ceci explique la production de lipopeptides à 9 acides aminés. La biosynthèse de ces lipopeptides est réalisée de manière non linéaire : le gène *syrB1* responsable de l'incorporation du 9^{ème} acide aminé est situé en amont du gène *syrE* impliqué dans l'incorporation des 8 premiers acides aminés.

Le même cluster de gènes a été retrouvé chez les souches *P. syringae* CVB0031 et *P. syringae* USA0035, productrices respectives des variants de syringomycine et de la nouvelle sous-famille des syringosines (**Figure 23**). Chez *P. syringae* CCV0214, *P. syringae* CC1466 et *P. cichorii* CFBP4407, productrices de variants de syringotoxine, de syringostatine et de pseudomycine, un cluster similaire a été observé mais il est organisé différemment. En effet, ce ne sont pas deux mais trois gènes NRPS codant respectivement pour 1, 5 et 4 modules qui ont été observés (**Figure 23**). Une telle organisation est similaire à celle qui a été observée chez les synthétases de nunamycine et thanamycine, deux sous-familles de syringomycine identifiées chez *Pseudomonas fluorescens* In5 (Michelsen et al. 2015) et *Pseudomonas* sp. SHC52 (Van Der Voort et al. 2015).

Ces résultats montrent que des NRPS organisées différemment peuvent synthétiser des lipopeptides structurellement proches, appartenant à la même famille. Des différences d'agencement au sein d'une même famille de lipopeptides avaient déjà été observées chez plusieurs autres familles telles que les orfamides (Ma et al. 2016; Zachow et al. 2015), les corpeptines (Strano et al. 2015; Michelsen et al. 2015; Huang et al. 2015; Van Der Voort et al. 2015) et les tolaasines (D'aes et al. 2014; Götze and Stallforth 2019).

Dans la famille des syringomycines, toutes les synthétases de toutes les sous-familles n'ont pas été décrites dans la littérature. Les gènes NRPS impliqués dans la synthèse des syringotoxines, des syringostatines et des pseudomycines ne sont pas présents dans la base de données GenBank. Je propose donc de renommer ces gènes *sytB1*, *sytE1*, *sytE2* (syringotoxine), *sygB1*, *sygE1*, *sygE2* (syringostatine) et *pseB1*, *pseE1*, *pseE2* (pseudomycine). En ce qui concerne les gènes détectés chez *P. syringae* USA0035, productrice de la nouvelle sous-famille des syringosines, je propose de les nommer *synB1* et *synE* (**Figure 23**).

Chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D, les trois gènes *syrP*, *syrB2*, *syrC*, présents dans le cluster de biosynthèse de la syringomycine (Gross and Loper 2009) ont un rôle dans l'hydroxylation et la chloration des 8^{ème} et 9^{ème} acides aminés. La protéine SyrP est responsable de l'hydroxylation de l'acide aspartique en position 8 (OH-Asp) des syringomycines A1, E et G (Singh et al. 2008). Les protéines SyrB2 et SyrC sont, quant à elles, respectivement responsables de la chloration de la thréonine incorporée au niveau de SyrB1 (4-Chloro-Thréonine) et de son transport en fin de chaîne d'assemblage (Vaillancourt et al. 2005; Singh et al. 2007).

Comme l'indique la **Figure 23**, trois gènes homologues, localisés aux alentours des gènes NRPS, sont également présents dans chacun des 5 génomes analysés. Les protéines codées par ces gènes ont présenté des similarités avec les protéines SyrP, SyrB2 et SyrC identifiées chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D (**Tableau 10**).

Les clusters de gènes détectés chez les 5 souches étudiées sont donc bien ceux responsables de la biosynthèse des lipopeptides de la famille des syringomycines.

Tableau 10 : Pourcentages d'homologies entre les protéines identifiées chez les souches étudiées et les protéines SyrP ; SyrB2 et SyrC, identifiées chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D

Souche		SyrP		SyrB2		SyrC	
		<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D)		<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D		<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	
<i>P. syringae</i> CVB0031	SyrP	98,30	SyrB2	99,68	SyrC	96,28	
<i>P. syringae</i> CCV0214	SytP	93,75	SytB2	98,71	SytC	94,04	
<i>P. syringae</i> CC1466	SygP	93,92	SygB2	99,35	SygC	94,79	
<i>P. cichorii</i> CFBP4407	PseP	73,14	PseB2	94,79	PseC	62,78	
<i>P. syringae</i> USA0035	SynP	98,02	SynB2	99,35	SynC	94,54	

La prédiction des monomères incorporés par les domaines A a, quant à elle, été réalisée avec le programme NRSPredictor 2 et sur base du code de Stachelhaus. L'isomérisation de chaque acide aminé a également été prédite au moyen du programme NaPDoS (**Figure 23**).

Les séquences peptidiques prédites chez *P. syringae* CVB0031, *P. syringae* CCV0214, *P. syringae* CC1466 et *P. cichorii* CFBP4407, correspondent à celles des syringomycines (Segre et al. 1989), des syringotoxines (Ballio et al. 1990), des syringostatines (Isogai et al. 1989) et des pseudomycines (Ballio et al. 1994), sauf pour :

- Le 7^{ème} acide aminé qui est prédit thréonine alors qu'un dhAbu (acide 2,3-déhydro-2-aminobutyrique) est présent à cette position pour ces 4 sous-familles. La même prédiction est observée chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D, connue pour produire les syringomycines A1, E, G (**Figure 23**) (Segre et al. 1989).
- Le 4^{ème} acide aminé des syringotoxines et des syringostatines n'a pas pu être prédit. Cela peut être expliqué par l'incapacité des outils bioinformatiques utilisés à prédire l'incorporation de l'acide aminé non protéinogène homosérine, présent à cette position chez ces deux sous-familles.

Pour ces 4 souches, la concordance entre les masses théoriques des variants connus, calculées à partir des séquences peptidiques prédites, et les masses observées sur colonies a permis de confirmer les assignations aux sous-familles proposées.

Chez *P. syringae* USA0035, malgré l'incertitude sur le 4^{ème} acide aminé (Asp, Asn ou Gln), la séquence peptidique prédite ne correspond à aucune des séquences peptidiques des syringomycines connues (Götze and Stallforth 2019) ce qui confirme que la syringosine, produite par cette souche, est bien une nouvelle sous-famille. Parmi les lipopeptides de la famille des syringomycines, la séquence peptidique de la syringosine présente le plus d'homologies avec celles des syringomycines (**Figure 23**) (Segre et al. 1989; Götze and Stallforth 2019). Ces deux sous-familles ont 6 acides aminés en commun sur un total de 9 acides aminés. Leurs différences se situent au niveau des acides aminés 2 (Ala à la place de Ser), 4 (Asp, Asn ou Gln à la place de Dab) et 7 (Gly à la place de dhAbu).

Pour les syringomycines, les syringotoxines, les syringostatines et les pseudomycines, les structures putatives des nouveaux variants produits ont été déterminées à partir de celles des variants connus. Les écarts de masses de 16 Da ou 28 Da observés ont en effet été attribués à des différences de taille (+ ou - 2CH₂) ou d'hydroxylation (+ ou - OH) de l'acide gras. Pour chacune de ces sous-familles, les structures proposées pour les variants connus et nouveaux sont présentées dans la **Figure 24**.

Dans le cas de la syringosine, la séquence peptidique n'ayant pas pu être clairement identifiée à cause de l'incertitude sur le 4^{ème} acide aminé, nous n'avons pas pu proposer de composition d'acide gras pour les 4 variants de cette sous-famille. Toutefois, il est probable que les différences de masse de 16 Da et 28 Da correspondent également à des différences d'hydroxylation ou de taille de l'acide gras.

Souches et sous-familles de lipopeptides produites	m/z observé [M+H] ⁺	Variants produits	Acide gras	AA									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<i>P. syringae</i> CVB0031 <u>Syringomycine</u>	1197,6	Syringomycine A1	C10:0-OH(3)										
	1225,6	Syringomycine E	C12:0-OH(3)										
	1253,6	Syringomycine G	C14:0-OH(3)										
	1209,6	Syringomycine H	C12:0										
	1237,6	Syringomycine I	C14:0										
<i>P. syringae</i> CCV0214 <u>Syringotoxine</u>	1136,6	Syringotoxine B	C14:0-OH(3)										
	1152,6	Syringotoxine C	C14:0-OH(3,4)										
<i>P. syringae</i> CC1466 <u>Syringostatine</u>	1179,6	Syringostatine A	C14:0-OH(3)										
	1195,6	Syringostatine B	C14:0-OH(3,4)										
	1207,6	Syringostatine D	C16:0-OH(3)										
	1223,6	Syringostatine E	C16:0-OH(3,4)										
<i>P. cichorii</i> CFBP4407 <u>Pseudomycine</u>	1250,6	Pseudomycine C	C16:0-OH(3,4)										
	1234,6	Pseudomycine C'	C16:0-OH(3)										
	1219,6	Pseudomycine D	C16:0										
	1263,7	Pseudomycine E	C18:0-OH(3)										
	1279,7	Pseudomycine F	C18:0-OH(3,4)										
<i>P. syringae</i> USA0035 <u>Syringosine</u>	1249,6	Syringosine A	?										
	1265,6	Syringosine B											
	1281,6	Syringosine C											
	1293,7	Syringosine D											

Isomérisation L prédite

Isomérisation D prédite

Achiral

Acide aminé non prédit par bioinformatique

Nouveau variant: acide gras putatif

Figure 24 : Structures proposées pour les lipopeptides de la famille des syringomycines produits par les souches étudiées

Les résultats présentés dans cette partie ont montré que dans la famille des syringomycines, la séquence peptidique, autant que l'organisation des gènes NRPS était sujet à variation. Les gènes adjacents aux gènes NRPS qui sont également impliqués dans la structuration des lipopeptides sont quant à eux très conservés ce qui explique la production de molécules chlorées appartenant à la même famille, par les souches étudiées.

Enfin, au vu de leurs différences de masses, il semblerait que les différents variants de chaque sous-famille de la famille des syringomycine (*i.e.* syringomycine, syringotoxine, syringostatine, pseudomycine, syringosine) diffèrent exclusivement au niveau des acides gras. D'après plusieurs études menées sur les lipopeptides de *Bacillus* et de *Pseudomonas*, la taille des acides gras joue un rôle important dans l'activité des variants produits par une même synthétase (Balleza et al. 2019). La taille de l'acide gras joue par exemple un rôle important dans l'activité antimicrobienne. Dans ce sens, Ballio et al., 1988 ont montré que la syringomycine A1 dont l'acide gras est un C10:0-OH(3) possède une activité contre *Geotrichum candidum* faible, en comparaison avec les syringomycines E et G (C12:0-OH(3) et C14:-OH(3) (Ballio et al. 1988).

Des analyses supplémentaires (LC-MS/MS, détermination de la composition chimique en acides aminés par voie chimique, etc.) sont nécessaires pour déterminer plus précisément les structures de tous les variants détectés au cours de cette étude. Il est néanmoins évident qu'il existe une grande diversité de structures au sein de la famille des syringomycines, tant entre les différentes sous-familles (variation d'acides aminés), qu'au sein de chacune d'entre elles (variation de l'acide gras).

Points clés à retenir :

- *Dans la famille des syringomycines, des NRPS organisées différemment peuvent mener à la production de différentes sous-familles aux structures similaires*
- *Biodiversité structurale des lipopeptides de la famille des syringomycines :*
 - *Mise en évidence d'une nouvelle sous-famille : syringosine, ayant 6 acides aminés en commun avec la sous-famille des syringomycines*
 - *Production de plusieurs variants présentant probablement des modifications d'acide gras (taille, nombre d'hydroxylations) dans chaque sous-famille*

1.4. Identification de nouvelles sous-familles dans les familles à longues chaînes d'acides aminés

Les familles à longues chaînes d'acides aminés sont les corpeptines (22 acides aminés), les syringopeptines 22 (22 acides aminés) et les syringopeptines 25 (25 acides aminés). Dans ces familles, plusieurs molécules détectées lors des analyses de spectrométrie de masse, ont été assignées à des variants de sous-familles connues ou nouvelles. Elles sont présentées dans une même partie car elles présentent de nombreuses similarités.

Un panel de souches produisant ces différentes molécules, a été utilisé pour mener l'étude de leur structure (**Tableau 11**). Dans chaque cas, ce sont les structures des variants majoritaires (indiqués en bleu dans le tableau ci-dessous), à savoir ceux dont les intensités au MALDI-ToF étaient les plus importantes, qui ont été caractérisées.

Tableau 11 : Récapitulatif des différentes masses produites par les souches étudiées, assignées aux variants de différentes sous-familles de lipopeptides

Famille des syringopeptines 22									
Souches	<i>P. syringae</i> CCE0100		<i>P. syringae</i> CST0018		<i>P. syringae</i> CCV0214		<i>P. syringae</i> CVB0031		
Sous-familles	Syringopeptine 22		Syringopeptine 508		Nouvelle sous-famille Syringopeptine 22CCV		Nouvelle sous-famille Syringopeptine 22CVB		
Variants	2144,2	22A	2188,2	508A	2146,3	22CCV-A	2160,2	22CVB-A	
	2172,2	22B	2216,3	508B	2174,4	22CCV-B	2188,2	22CVB-B	

Famille des syringopeptines 25										
Souches	<i>P. syringae</i> T3W0028		<i>P. syringae</i> UB0415		<i>P. syringae</i> TA0005		<i>P. syringae</i> USA0087		<i>P. syringae</i> CVB0040	
Sous-familles	Syringopeptine 25		Nouvelle sous-famille Syringopeptine 25UB		Nouvelle sous-famille Syringopeptine 25TA		Nouvelle sous-famille Syringopeptine 25USA		Nouvelle sous-famille Syringopeptine 25CVB	
Variants	2399,4	25A	2412,4	25UB-A	2441,4	25TA-A	2443,5	25USA-A	2445,3	25CVB-A
	2427,4	25B			2469,4	25TA-B			2473,3	25CVB-B

Famille des corpeptines									
Souches	<i>P. cichorii</i> CFBP4407		<i>P. syringae</i> GAW0197		<i>P. cichorii</i> 83.1				
Sous-familles	Cichorinotoxine		Nouvelle sous-famille Cichopeptine GAW		Nouvelle sous-famille Cichopeptine 83				
Variants	2069,2	Cichorinotoxine	1983,3	GAW-A	2063,3	83-A			
			1997,3	GAW-B	2077,3	83-B			
			2011,3	GAW-C					
			2025,3	GAW-D					

Légende	
	Variant majoritaire

Nous présentons ci-après la caractérisation du lipopeptide de m/z 2146,3 [M+H]⁺ qui est le variant majoritaire de la nouvelle sous-famille appelée syringopeptine 22CCV, produite par *P. syringae* CCV0214. Ce variant est appelé syringopeptine 22CCV-A.

La fragmentation de l'ion de m/z 2146,3 [M+H]⁺ a généré des fragments de série y et b listés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Liste des ions y et b obtenus après fragmentations de l'ion de m/z 2146,3 [M+H]⁺

Ions de série y					
Fragments observés	Masse (Da)	Fragments observés	Masse (Da)	Fragments observés	Masse (Da)
y1	ND	y9	875,8	y17	1512,2
y2	ND	y10	946,8	y18	1583,2
y3	ND	y11	1017,8	y19	1696,3
y4	ND	y12	1116,9	y20	1795,5
y5	ND	y13	1187,9	y21	1892,6
y6	ND	y14	1271,0	y22	1975,7
y7	ND	y15	1370,0		
y8	792,8	y16	1441,1		
Ions de série b					
Fragments observés	Masse (Da)	Fragments observés	Masse (Da)	Fragments observés	Masse (Da)
b1	ND	b9	874,9	b17	ND
b2	253,8	b10	957,9	b18	ND
b3	350,8	b11	1028,9	b19	ND
b4	449,8	b12	ND	b20	ND
b5	562,8	b13	ND	b21	ND
b6	633,8	b14	ND	b22	ND
b7	704,8	b15	ND		
b8	775,8	b16	ND		

L'analyse des différences de masses calculées entre ces fragments a permis de proposer une structure partielle de la syringopeptine 22CCV-A comprenant l'acide gras et les 14 premiers acides aminés de la chaîne peptidique qui en comporte 22. Cette structure est présentée dans la **Figure 25A**. Les 8 derniers acides aminés composant la molécule n'ont quant à eux, pas pu être déterminés. Il est vraisemblable que cette partie du lipopeptide soit cyclique, comme c'est le cas chez toutes les syringopeptines décrites dans la littérature (Götze and Stallforth 2019). L'absence de fragmentation est probablement liée à une stabilité trop importante de ce cycle. Huang et al., (2015) avait rencontré la même difficulté pour la détermination des 5 acides aminés impliqués dans la partie cyclique de la cicho-peptine, une sous-famille de la famille des corpeptines (Huang et al. 2015).

Le génome de la souche *P. syringae* CCV0214, a été analysé *in silico* dans le but de prédire la structure de ce nouveau lipopeptide. L'analyse a permis de mettre en évidence un cluster de 3 gènes de 16053, 16401 et 40596 pb codant respectivement pour 5, 5 et 12 modules composés des domaines C, A, T caractéristiques des NRPS. La présence de 22 modules confirme que les lipopeptides produits par cette synthétase sont composés de 22 acides aminés, comme c'est le cas pour tous les lipopeptides de la famille des syringopeptines 22.

Afin de prédire la séquence peptidique du nouveau lipopeptide étudié, une prédiction des acides aminés sélectionnés par les domaines A a été réalisée *in silico*. Un unique acide aminé a ainsi été prédit pour chaque domaine A analysé (NRPSPredictor2 « Single AA Prediction », Code de Stachelhaus : 100%). L'isomérisation de ces acides aminés a également été déterminée avec le logiciel NaPDoS. L'analyse prédictive combinée à partir des domaines A et des domaines C a permis de proposer une séquence peptidique pour la syringopeptine 22CCV-A, qui est présentée dans la **Figure 25B**.

Afin de préciser la structure, nous avons confronté les données de spectrométrie de masse aux prédictions bioinformatiques (**Figure 25**). Pour les acides aminés en positions 2, 3, 5 à 8 et 10 à 13 de la chaîne peptidique, les prédictions bioinformatiques sont confirmées par les données de masse. En ce qui concerne les acides aminés 1, 9 et 14, l'analyse *in silico* a prédit la présence de thréonine. D'après les résultats de spectrométrie de masse, c'est l'acide aminé non-protéino-gène dhAbu qui est en fait présent à ces positions. En position 4, les analyses de spectrométrie de masse ne permettent pas de distinguer l'incorporation de leucine ou d'isoleucine dont les masses sont identiques. D'après les analyses bioinformatiques, une leucine serait en fait incorporée (Prédiction Single AA par NRPSPredictor2 et 100% d'identité du code Stachelhaus identifié avec le code Stachelhaus spécifique de la Leucine). Enfin, l'analyse *in silico* a permis de prédire une séquence pour les acides aminés 15 à 22 qui n'avait pas pu être déterminée en spectrométrie de masse. Ces 8 acides aminés seraient Thr, Ser, Ala, Val, Ala, Dab, Dab, Tyr. La masse calculée de cette séquence peptidique est de 810,55 Da. Elle correspond à la masse de l'ion y8 (ion composé uniquement des huit derniers acides aminés de la molécule) observé en spectrométrie de masse, additionnée de 18 Da (soit 792,8 Da + 18 Da = 810,8 Da) aux erreurs de masse près. La différence de 18 Da confirme qu'une molécule d'eau est perdue au cours de la cyclisation de cette partie du lipopeptide. La thréonine en position 15, acide aminé capable de réaliser deux liaisons peptidique grâce au groupement hydroxyle situé sur sa chaîne latérale appuie également cette hypothèse. La cyclisation des 8 derniers acides aminés, au niveau d'une thréonine, est également une caractéristique des autres syringopeptines décrites dans la littérature (Ballio et al. 1991).

La structure proposée pour la syringopeptine 22CCV-A, de formule brute $C_{101}H_{164}N_{24}O_{27}$ est présentée dans la **Figure 25C**. La masse calculée de ce lipopeptide (2145,22 Da) additionnée de 1 Da pour la masse d'un H^+ concorde avec le m/z de l'ion $[M+H]^+$ observé (2146,3).

En suivant la même approche que celle présentée pour la syringopeptine 22CCV-A, nous avons caractérisé, pour chaque sous-famille, les structures des variants majoritaires produits par les souches étudiées.

Deux particularités ont été observées lors des études de structure réalisées. La première particularité est qu'il n'a jamais été possible de fragmenter les parties cycliques des lipopeptides (8 acides aminés chez les syringopeptines 22 et 25 et 5 acides aminés chez les corpeptines). Leur composition en acides aminés a donc toujours été déduite des prédictions bioinformatiques. La deuxième particularité a uniquement été observée chez les syringopeptines 22 et 25. Pour ces deux familles, les analyses *in silico* des synthétases ont toujours permis de prédire l'incorporation d'un unique acide aminé par domaine A. Cette deuxième particularité semble indiquer que, chez les syringopeptines 22 et 25, les variants d'une même sous-famille varient uniquement au niveau de l'acide gras. Selon ce constat, nous avons, pour chaque sous-famille des syringopeptines 22 et 25 identifiées, attribué les écarts de masse de 28 Da entre les variants majoritaires et minoritaires à des différences de deux groupements CH₂ au niveau des acides gras. Les structures des variants minoritaires ont ainsi pu être déduites de celles des variants majoritaires. Cette différence de taille de la partie lipidique est une caractéristique qui a également été observée chez toutes les syringopeptines déjà décrites dans la littérature (Ballio et al. 1991; Isogai et al. 1995; Grgurina et al. 2002, 2005).

Les structures des nouveaux lipopeptides qui ont été identifiés au cours de cette étude sont présentées dans la **Figure 26** pour la famille des syringopeptines 22, la **Figure 27** pour la famille des syringopeptines 25 et la **Figure 28** pour la famille des corpeptines. Dans chaque figure, les structures proposées sont comparées avec celles des sous-familles déjà décrites dans la littérature.

m/z des nouveaux lipopeptides détectés [M+H] ⁺	Lipopeptides	Formules brutes	Masses calculées (Da)	Acide gras	AA																					
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	Syringopeptine 22A Syringopeptine 22B	C ₁₀₁ H ₁₆₂ N ₂₄ O ₂₇ C ₁₀₃ H ₁₆₆ N ₂₄ O ₂₇	2143,20 2171,24	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Val*	Ala	Ala	Val*	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	dhAbu*	Ala	Dab	Dab	Tyr
■ 2160,2 2188,2	Syringopeptine 22CVB-A Syringopeptine 22CVB-B	C ₁₀₂ H ₁₆₆ N ₂₄ O ₂₇ C ₁₀₄ H ₁₇₀ N ₂₄ O ₂₇	2159,24 2187,27	C12:0-OH(3) C14:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	Val*	Ala	Dab	Dab	Tyr
	Syringopeptine 22PhvA Syringopeptine 22PhvB	C ₁₀₀ H ₁₆₀ N ₂₄ O ₂₇ C ₁₀₂ H ₁₆₄ N ₂₄ O ₂₇	2129,19 2157,22	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu*	Ala	Ala	Ala*	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	dhAbu*	Ala	Dab	Dab	Tyr
■ 2146,3 2174,4	Syringopeptine 22CCV-A Syringopeptine 22CCV-B	C ₁₀₁ H ₁₆₄ N ₂₄ O ₂₇ C ₁₀₃ H ₁₆₈ N ₂₄ O ₂₇	2145,22 2173,25	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	Val*	Ala	Dab	Dab	Tyr
	Syringopeptine 508A Syringopeptine 508B	C ₁₀₄ H ₁₇₀ N ₂₄ O ₂₇ C ₁₀₆ H ₁₇₄ N ₂₄ O ₂₇	2187,27 2215,30	C12:0-OH(3) C14:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr
	Syringopeptine SC1 Syringopeptine SC2	C ₁₀₂ H ₁₆₄ N ₂₄ O ₂₇ C ₁₀₄ H ₁₆₈ N ₂₄ O ₂₇	2157,22 2185,25	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	dhAla	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	dhAbu	Ala	Dab	Dab	Tyr

Isométrie L
 Isométrie D
 Achiral

Structure des nouveaux lipopeptides identifiées dans cette étude (Isométrie déterminée in silico)

Différence d'acide aminé entre syringopeptides 22A et 22B et syringopeptides 22PhvA et 22PhvB

Différence d'acide aminé entre syringopeptides 22A et 22B et syringopeptides 22CVB-A et 22CVB-B

Différence d'acide aminé entre syringopeptides 22phVA et 22phVB et syringopeptides 22CCV-A et 22CCV-B

Figure 26 : Comparaison des structures des nouveaux lipopeptides de la famille des syringopeptides 22 caractérisés (Syringopeptides 22CVB-A, 22CVB-B et Syringopeptides 22-CCVA, 22CCV-B) à celles des lipopeptides de la famille des syringopeptide 22 connus (Syringopeptine 22A/22B (Ballio et al. 1991), Syringopeptine 22phVA/phVB (Grgurina et al. 2002), Syringopeptides 508A, 508B (Grgurina et al. 2005), Syringopeptides SC1, SC2 (Isogai et al. 1995))

Dans la famille des syringopeptines 22, les variants de quatre sous-familles, produits par les 4 souches étudiées, ont été identifiées.

Chez *P. syringae* CCE0100 et *P. syringae* CST0018, l'étude des structures des lipopeptides produits a montré qu'il s'agissait des syringopeptines 22A, 22B et 508A, 508B décrites dans la littérature (Ballio et al. 1991; Grgurina et al. 2005), confirmant ainsi les assignations proposées initialement.

Les structures des syringopeptines 22CCV-A et 22CCV-B (nouvelle sous-famille syringopeptine 22CCV) de formules brutes respectives $C_{101}H_{164}N_{24}O_{27}$ et $C_{103}H_{168}N_{24}O_{27}$ se sont révélées très proches de celles des syringopeptines 22phvA et 22phvB décrites par Grgurina et al., (2002) (**Figure 26**). La seule différence se situe au niveau de l'acide aminé 18 qui est une valine à la place d'un dhAbu.

Les structures des syringopeptines 22CVB-A et 22CVB-B (nouvelle sous-famille syringopeptine 22CVB) ($C_{102}H_{166}N_{24}O_{27}$ et $C_{104}H_{170}N_{24}O_{27}$) sont quant à elles très proches des syringopeptines 22A et 22B décrites par Ballio et al., (1991) (**Figure 26**). Elles diffèrent de ces dernières au niveau de l'acide aminé 18 qui est également une valine à la place d'un dhAbu.

Notons enfin que certains acides aminés des nouvelles syringopeptines 22 identifiées au cours de ce travail semblent, à première vue, présenter des différences de conformation par rapport à ceux des syringopeptines 22A et 22B, identifiés chimiquement chez *P. syringae* pv. *syringae* B301D (Ballio et al. 1995). C'est le cas des acides aminés 4 et 12, prédits de conformation D (identifiés L chez les syringopeptines 22A et 22B) et l'acide aminé 21, prédit de conformation L (identifié D chez les syringopeptines 22A et 22B). Pour confirmer ces différences, il est nécessaire de déterminer l'isomérisation de chaque acide aminé, par voie chimique, via la méthode de Marfey, par exemple.

Notre étude a donc montré que la région située entre les acides aminés 10 et 22, dans la famille des syringopeptines 22, considérée jusqu'ici comme hautement conservée, était également sujet à modification (Grgurina et al. 2005). C'est plus précisément le dhAbu en position 18 qui est remplacé par une valine pour les deux nouvelles-sous familles identifiées.

m/z des nouveaux lipopeptides détectés [M+H] ⁺	Lipopeptides	Formules brutes	Masses calculées (Da)	Acide gras	AA																								
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
	Syringopeptine 25A Syringopeptine 25B	C ₁₁₃ H ₁₈₃ N ₂₇ O ₃₀ C ₁₁₅ H ₁₈₇ N ₂₇ O ₃₀	2398,36 2426,39	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	dhAbu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr
	Syringopeptine 25A [Phe25]	C ₁₁₃ H ₁₈₃ N ₂₇ O ₂₉	2382,37	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	dhAbu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	aThr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Phe*
2412,4	Syringopeptine 25UB-A	C ₁₁₄ H ₁₈₅ N ₂₇ O ₃₀	2412,38	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Leu*	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	dhAbu	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr
2441,4 2469,4	Syringopeptine 25TA-A Syringopeptine 25TA-B	C ₁₁₆ H ₁₈₉ N ₂₇ O ₃₀ C ₁₁₈ H ₁₉₃ N ₂₇ O ₃₀	2440,41 2468,44	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Leu*	Ala	Ala	Leu*	Leu	Ala	Ala	dhAbu	Val	dhAbu	Ala	Leu*	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr
2443,5	Syringopeptine 25USA-A	C ₁₁₆ H ₁₉₁ N ₂₇ O ₃₀	2442,43	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Leu*	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Leu*	Val	dhAbu	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr
2445,3 2473,3	Syringopeptine 25CVB-A Syringopeptine 25CVB-B	C ₁₁₅ H ₁₈₉ N ₂₇ O ₃₁ C ₁₁₇ H ₁₉₃ N ₂₇ O ₃₁	2444,40 2472,44	C10:0-OH(3) C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Leu*	Ala	Ala	Leu*	Leu	Ala	Ala	Leu*	Val	Ala*	Ala	Val	Ala	Ala	dhAbu	Thr	Ser	Ser*	dhAbu*	Ala	Dab	Dab	Tyr

	Isomérisation L		Isomérisation D		Achiral		Modification d'acide aminé par rapport à la syringopeptine 25		Structure des nouveaux lipopeptides identifiées dans cette étude (Isomérisation déterminée in silico)		Structure et isomérisation déterminées par bioinformatique uniquement
--	-----------------	--	-----------------	--	---------	--	---------------------------------------------------------------	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	-----------------------------------------------------------------------

Figure 27 : Comparaison des structures des nouveaux lipopeptides de la famille des syringopeptines 25 caractérisés (Syringopeptine 25UB-A, Syringopeptines 25TA-A, 25TA-B, Syringopeptine 25USA-A et Syringopeptines 25CVB-A, 25CVB-B) à celles des lipopeptides de la famille des syringopeptines 25 connus (Syringopeptines 25A, 25B (Ballio et al. 1991), Syringopeptine 25A [Phe25] (Scaloni et al. 1997))

Dans la famille des syringopeptines 25, les variants de cinq sous-familles sont produits par les souches étudiées.

La structure de la molécule de m/z 2399,4 a été déterminée par spectrométrie de masse uniquement, le génome de la souche n'étant pas disponible. La fragmentation étant seulement partielle, il n'a pas été possible de proposer une structure complète pour cette molécule. Toutefois, d'après les données disponibles, elle ne correspondrait pas à la syringopeptine 25A. Elle différerait de cette dernière au niveau des positions 3 (Ile à la place de Val) et 7 (Val à la place de Ile) de la chaîne peptidique. En l'absence d'informations sur le cluster de gènes NRPS responsable de sa production, il n'est toutefois pas possible de déterminer s'il s'agit d'une nouvelle sous-famille de syringopeptine ou d'un variant de syringopeptine 25.

La structure de la syringopeptine 25UB-A (nouvelle sous-famille syringopeptine 25UB), de formule brute $C_{114}H_{185}N_{27}O_{30}$ est très similaire à celle de la syringopeptine 25A à l'exception du 3^{ème} acide aminé qui est une leucine à la place d'une valine (**Figure 27**). Il est important de préciser que dans ce cas, la présence d'une leucine à la place d'une valine n'est pas expliquée par la flexibilité du 3^{ème} domaine A pour deux raisons :

- L'analyse *in silico* du 3^{ème} domaine A a prédit l'incorporation de leucine avec une fiabilité de 100% (Prédiction Single AA par NRSPredictor2 et 100% d'identité du code Stachelhaus identifié avec le code Stachelhaus spécifique de la Leucine)
- La syringopeptine 25UB-A et la syringopeptine 25A n'ont jamais été co-produites par une même souche. Ce ne sont donc pas des variants d'une même sous-famille, produits par une même synthétase.

La structure de la syringopeptine 25USA-A (nouvelle sous-famille syringopeptine 25USA), (formule brute $C_{116}H_{191}N_{27}O_{30}$) est également très proche de la syringopeptine 25A (**Figure 27**). Elle diffère de cette dernière, uniquement au niveau des positions 3 et 6 (Leu à la place de Val), de la chaîne peptidique.

Les structures des syringopeptides 25TA-A et 25TA-B, deux variants de la nouvelle sous-famille nommée syringopeptide 25TA, ont, quant à elles, uniquement été prédites *in silico*. Sur base des prédictions bioinformatiques et en faisant l'hypothèse que les acides gras de ces lipopeptides étaient des C10:0-OH(3) et C12:0-OH(3) comme c'est le cas chez les autres syringopeptides 25, nous avons pu proposer deux structures de formules brutes $C_{116}H_{189}N_{27}O_{30}$ et $C_{118}H_{193}N_{27}O_{30}$ concordant avec les masses observées au MALDI-ToF sur colonie. Les structures ainsi prédites seraient similaires à celles des syringopeptides 25A et 25B (Ballio et al. 1991), à l'exception des acides aminés 3 (Leu à la place de Val), 6 (Leu à la place de Val) et 14 (Leu à la place de dhAbu).

Enfin, les syringopeptides 25CVB-A et 25CVB-B ($C_{115}H_{189}N_{27}O_{31}$ et $C_{117}H_{193}N_{27}O_{31}$) divergent des syringopeptides 25A et 25B au niveau des acides aminés 3 (Leu à la place de Val), 6 (Leu à la place de Val), 10 (Leu à la place de dhAbu), 12 (Ala à la place de dhAbu), 20 (Ser à la place de dhAbu) et 21 (dhAbu à la place de Val).

Notons enfin que plusieurs différences d'isoméries sont observées entre les acides aminés des nouvelles syringopeptides 25 et ceux des syringopeptides 25A et B dont la conformation a été déterminée chimiquement, avec la méthode de Marfey, chez *P. syringae* pv. *syringae* B359 (Ballio et al. 1995). Chez les nouvelles syringopeptides 25, les acides aminés 4 et 21 seraient en effet de conformation D alors qu'ils sont de conformation L chez les syringopeptides 25A et 25B tandis que l'acide aminé 24 serait de conformation L alors qu'il est de conformation D chez les syringopeptides 25A et 25B. Seule une analyse de la chiralité des acides aminés par voie chimique permettra de confirmer ou d'infirmer ces différences.

En somme, notre étude a montré que la famille des syringopeptides 25, jusqu'ici représentée par une seule sous-famille, est représentée par au moins 5 sous-familles aux structures diverses. Les différences de structures se situent aux positions 3, 6, 10, 12, 14 (région linéaire), et 20, 21 (région cyclique), de la chaîne peptidique.

m/z des nouveaux lipopeptides détectés [M+H] ⁺	Lipopeptides	Formules brutes	Masses calculées (Da)	Acide gras	AA 1	AA 2	AA 3	AA 4	AA 5	AA 6	AA 7	AA 8	AA 9	AA 10	AA 11	AA 12	AA 13	AA 14	AA 15	AA 16	AA 17	AA 18	AA 19	AA 20	AA 21	AA 22
	Corpeptine A Corpeptine B	C ₉₈ H ₁₆₃ N ₂₃ O ₂₇ C ₁₀₀ H ₁₆₅ N ₂₃ O ₂₇	2049,21 2120,22	C10:0-OH(3) C12:1(5)-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Hse	Val	alle	dh-Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Ile
	Thanapeptine	C ₉₈ H ₁₆₃ N ₂₃ O ₂₇	2094,21	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Val	dhAbu	Thr	Val	Leu Ile	dh-Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Leu Ile
	Sclérosine	C ₁₀₀ H ₁₆₆ N ₂₃ O ₂₇	2121,23	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Leu Ile	Ala	Val	Val	dhAbu	Thr	Val	Leu Ile	dh-Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	dhAbu	Ala	Dab	Ser	Val-OH
	Nunapeptine	C ₉₅ H ₁₅₇ N ₂₃ O ₂₆	2036,17	C12:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	dhAbu	Ser	Val	Ile	dh-Ala	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	Thr	Ala	Dab	Ser	Ile
Isoformes	Cicho-peptine A	C ₉₇ H ₁₆₁ N ₂₃ O ₂₆	2064,20	C12:1-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala*	Ala*	Val	Val	dhAbu	Gly*	Val*	Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Leu Ile
	Cicho-peptine B	C ₉₆ H ₁₅₉ N ₂₃ O ₂₆	2050,18	C12:1-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	dhAbu	Gly	Val	Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Val
2011,3	Cicho-peptine GAW-C	C ₉₃ H ₁₅₅ N ₂₃ O ₂₆	2010,15	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Gly*	Ala	Val	dhAbu	Ala*	Ala*	Leu Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	Thr	Ala	Dab	Ser	Leu Ile
2063,3 2077,3	Cicho-peptine 83-A Cicho-peptine 83-B	?	?	?	dhAbu	Pro	Ala	dhAbu*	Ala*	Val*	Ala*	dhAbu	Gly	Val	Ile	Gly	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	Thr	Ala	Dab	Ser	Val Leu Ile
	Cichorinotoxine	C ₉₆ H ₁₆₁ N ₂₃ O ₂₇	2068,19	C10:0-OH(3)	dhAbu	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	dhAbu	Ala	Val	Ile	Ser	Ala	Val	Ala	Val	dhAbu	aThr	Ala	Dab	Ser	Val
	Braspeptine	?	?	?	dhAbu	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	dhAbu	Hse	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Dab	Val	?	Thr	Ala	Dab	Ser	Val

○ Isométrie L ● Isométrie D ● Achirale

○* Différences d'AA entre la chipeptine GAW-C et la chicho-peptine A

○* Différences d'AA entre les chicho-peptines 83A, 83B et la chicho-peptine A

■ Structure des nouveaux lipopeptides identifiés dans cette étude (Isométrie déterminée in silico)

□ Isométrie déterminée par bioinformatique

□ Structure et isométrie déterminées par bioinformatique uniquement

Figure 28 : Comparaison des structures des nouveaux lipopeptides de la famille des corpeptines caractérisés (Cicho-peptine GAW-C et Cicho-peptines 83-A, 83-B) à celles des lipopeptides de la famille des corpeptines connus (Corpeptines A, B (Emanuele et al. 1998), Thanapeptine (Van Der Voort et al. 2015), Sclérosine (Berry et al. 2012), Nunapeptine (Michelsen et al. 2015), Cicho-peptines A, B (Huang et al. 2015), Cichorinotoxine (Komatsu et al. 2019), Braspeptine (Zhao et al. 2019))

Dans la famille des corpeptines, ce sont une sous-famille connue et deux nouvelles sous-familles, produites par les 3 souches étudiées, qui ont été identifiées.

L'étude de la structure du lipopeptide produit par *P. cichorii* CFBP4407 a confirmé qu'il s'agissait de la cichorinotoxine, une sous-famille décrite récemment par Komatsu et al., (2019).

Parmi les cichozeptines GAW-A, GAW-B, GAW-C et GAW-D (nouvelle sous-famille cichozeptine GAW), seule la structure de la cichozeptine GAW-C (C₉₃H₁₅₅N₂₃O₂₆), variant majoritaire, a pu être élucidée (**Figure 28**). De toutes les corpeptines connues, c'est de la cichozeptine A (Huang et al. 2015) dont ce variant est le plus proche. La cichozeptine GAW-C et la cichozeptine A ont en effet 19 acides aminés en commun sur les 22 acides aminés de la chaîne peptidique. Les différences se situent au niveau des acides aminés 5 (Gly à la place de Ala), 9 (Ala à la place de Gly), 10 (Ala à la place de Val) et de l'acide gras (C10:0-OH(3) au lieu de C12:1-OH(3)). Les structures des autres variants produits par *P. syringae* GAW0197 n'ont pas pu être identifiées à partir celle de la cichozeptine GAW-C car il n'a pas été possible de déterminer si les différences se situaient au niveau de l'acide gras ou au niveau de la chaîne peptidique. En effet, d'après les analyses *in silico*, le 5^{ème} domaine A pourrait incorporer de la glycine ou de l'alanine, deux acides aminés dont les masses sont séparées de 14 Da. Ainsi, les différences de masses observées entre la cichozeptine GAW-C et les variants minoritaires (GAW-A, -B, -D) (14 Da ou 28 Da) pourraient être expliquées soit par une modification au niveau de cet acide aminé, soit par une modification au niveau de l'acide gras.

En ce qui concerne les cichozeptines 83-A et 83-B (nouvelle sous-famille cichozeptine 83), seule leur séquence peptidique, prédite par bioinformatique, est proposée (**Figure 28**). D'après ces prédictions, elles auraient 19 acides aminés en commun sur les 22 acides aminés de la chaîne peptidique, avec les cichozeptines A et B. Les différences se situeraient au niveau des acides aminés 4 (dhAbu à la place de Ala), 6 (Val à la place de Ala) et 7 (Ala à la place de Val).

Pour clôturer cette partie, notons que les caractéristiques des lipopeptides à longues chaînes d'acides aminés ont été retrouvés pour chacune des nouvelles sous-familles identifiées dans les familles des corpeptines, syringozeptines 22 et 25 (Götze and Stallforth 2019) : 1) les deux premiers acides aminés sont un dhAbu et une proline, 2) il n'y a aucun acide aminé dit acide dans leur structure, 3) la thréonine permettant la cyclisation du lipopeptide est toujours précédée d'un dhAbu.

Points clés à retenir :

- *Deux nouvelles sous-familles de syringopeptine 22 nommées syringopeptines 22CCV et 22CVB, dont le 18^{ème} acide aminé varie par rapport aux syringopeptines 22Phv et 22 (Val à la place de dhAbu).*
- *Quatre nouvelles sous-familles de syringopeptines 25 (syringopeptines 25UB, 25TA, 25USA, 25CVB) contre une seule sous-famille identifiée jusqu'ici (syringopeptine 25). Modifications au niveau des acides aminés 3, 6, 10, 12, 14 (région linéaire), et 20, 21 (région cyclique).*
- *Deux nouvelles sous-familles de corpeptines nommées cichopeptines GAW et 83 présentant des similarités structurales avec les cichopeptines A et B produites par P. cichorii SF1-54. Modifications au niveau des acides aminés 5, 9, 10 (cichopeptine GAW) et 4, 6, 7 (cichopeptine 83).*

1.5. Relations entre lipopeptides produits et classification phylogénétique des souches du complexe *P. syringae*

Les parties précédentes ont montré que l'ensemble du complexe *P. syringae* présentait une biodiversité de production des lipopeptides. Dans un premier temps, une analyse de la fréquence de production des différentes familles de lipopeptides et leur co-production par les souches étudiées, sera présentée. Dans un deuxième temps, l'étude des relations entre les sous-familles produites au sein de chaque famille et la classification phylogénétique des souches productrices, sera également exposée.

L'analyse de la co-production de lipopeptides de différentes familles par les souches étudiées est illustrée sous la forme d'un diagramme en anneaux dans la **Figure 29**. Le disc central rend compte de la production de lipopeptides en distinguant le nombre de familles produites (0, 1, 2 ou 3 familles). Les anneaux indiquent la famille d'appartenance des lipopeptides produits (anneau 1 : syringafactine, anneau 2 : syringomycine, anneau 3 : syringopeptine 22, anneau 4 : syringopeptine 25, anneau 5 : corpeptine).

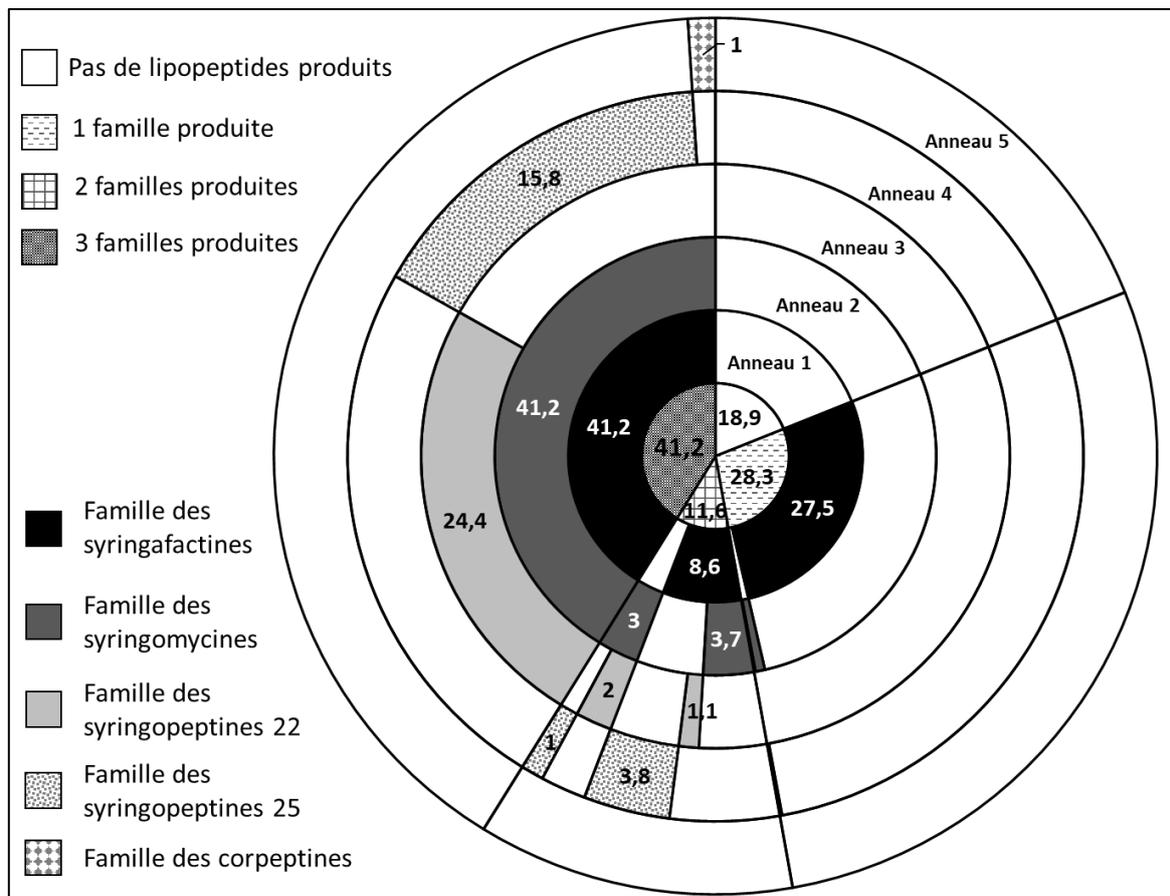


Figure 29 : Co-production de lipopeptides de différentes familles par les souches étudiées

Ces résultats montrent que les lipopeptides de la famille des syringafactines sont les plus produits. Ils ont été détectés seuls chez 27,5% des souches et en mélange chez 8,6% et 41,2% des souches soit au total chez 77,3% des souches étudiées. Leur production qui avait jusqu'ici été montrée chez seulement 13 souches (Berti et al. 2007; Pauwelyn et al. 2013; Burch et al. 2014; Götze et al. 2019), s'avère donc très répandue au sein du complexe *P. syringae*.

Les souches qui semblent produire exclusivement des syringafactines représentent la quasi-totalité des souches produisant 1 seule famille de lipopeptides (28,3% au total).

Chez 41,2% des souches étudiées, la famille des syringafactines est co-produite avec celles des syringomycines et l'une des trois familles à longue chaîne d'acides aminés à savoir celles des corpeptines (1% des souches), des syringopeptines 22 (24,4% des souches) ou des syringopeptines 25 (15,8% des souches). Ces résultats indiquent 1) que les familles à longue chaîne d'acides aminés ne sont jamais co-produites par une même souche, 2) que la production de 3 familles distinctes par une même souche est très répandue dans le complexe *P. syringae*. Une telle production avait pourtant jusqu'ici été observée chez seulement deux souches : *P. syringae* pv. *syringae* B728A qui produit les syringafactines A, B/C, les syringomycines E, G et les syringopeptines 22phVA et 22phVB (Berti et al. 2007; Grgurina et al. 2002) et *P. cichorii* SF1-54 qui produit les cichofactines A, B, des pseudomycines et les cichopeptines A, B (Pauwelyn et al. 2013; Huang et al. 2015).

Les souches co-produisant de la syringafactine avec une seule autre famille de lipopeptides ne représentent, quant à elles, que 8,6% de souches testées (SF + SR 3,7% / SF + SP22 1,1% / SF + SP25 3,8%).

Enfin, 18,9% des souches ne semblent produire aucun lipopeptide, dans les conditions testées. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette absence de production : conditions de cultures inadaptées à la production de lipopeptides, absence de gènes NRPS de lipopeptides ou gènes NRPS de lipopeptides présents mais non exprimés, NRPS non fonctionnelles. Une vérification du potentiel de synthèse de lipopeptides de ces souches est donc nécessaire et devra être réalisée en séquençant leur génome puis en les analysant par bioinformatique. Dans le cas de la présence de gènes NRPS de lipopeptides, de nouvelles analyses devront être effectuées pour déterminer si les molécules correspondantes sont effectivement produites et ce, après modification des conditions de culture (milieu utilisé, temps d'incubation, etc.) et de préparation des échantillons.

Il est intéressant de savoir si la production d'une ou plusieurs familles de lipopeptides est corrélée à la classification phylogénétique des souches productrices. Pour répondre à cette question, une étude des relations entre les sous-familles produites par les souches et leur classification phylogénétique a été réalisée.

Elle est illustrée dans la **Figure 30**, qui a été construite à partir de l'arbre phylogénétique proposé par Berge et al., (2014). Cette figure liste les 19 sous-familles de lipopeptides détectées chez les souches étudiées et indique, pour chacune d'elle, le nombre de souches productrices dans chacun des 29 phylogroupes et clades répertoriés.

Pour certaines souches dont les séquences génomiques étaient disponibles, une recherche des gènes impliqués dans la synthèse des lipopeptides des différentes familles a également été effectuée (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Détection des gènes impliqués dans la synthèse de lipopeptides de différentes familles chez des souches du complexe *P. syringae*

Phylogroupes et clades	Souches	Gènes NRPS de syringafactines	Gènes NRPS de syringomycines	Gènes NRPS de corpeptines	Gènes NRPS de syringopeptines 22	Gènes NRPS de syringopeptines 25
	<i>P. syringae</i> UB0415	+	+	-	-	+
02b	<i>P. syringae</i> USA0087	+	+	-	-	+
	<i>P. syringae</i> CVB0031	+	+	-	+	-
02c	<i>P. syringae</i> CST0018	+	+	-	+	-
02d	<i>P. syringae</i> CC0301	+	+	-	+	-
02e	<i>P. syringae</i> USA0035	+	+	-	+	-
07a	<i>P. syringae</i> LAB0023	+	-	-	-	-
	<i>P. syringae</i> GAW0197	+	+	+	-	-
08	<i>P. syringae</i> CST0099	+	+	+	-	-
09a	<i>P. syringae</i> CMW0012	+	-	-	-	-
	<i>P. syringae</i> TA0005	+	+	-	-	+
10b	<i>P. syringae</i> CVB0040	+	+	-	-	+
10d	<i>P. syringae</i> CCE0100	+	+	-	+	-
10e	<i>P. syringae</i> CCV0214	+	+	-	+	-
	<i>P. cichorii</i> CFBP4407	+	+	+	-	-
11	<i>P. cichorii</i> 83.1	+	+	+	-	-

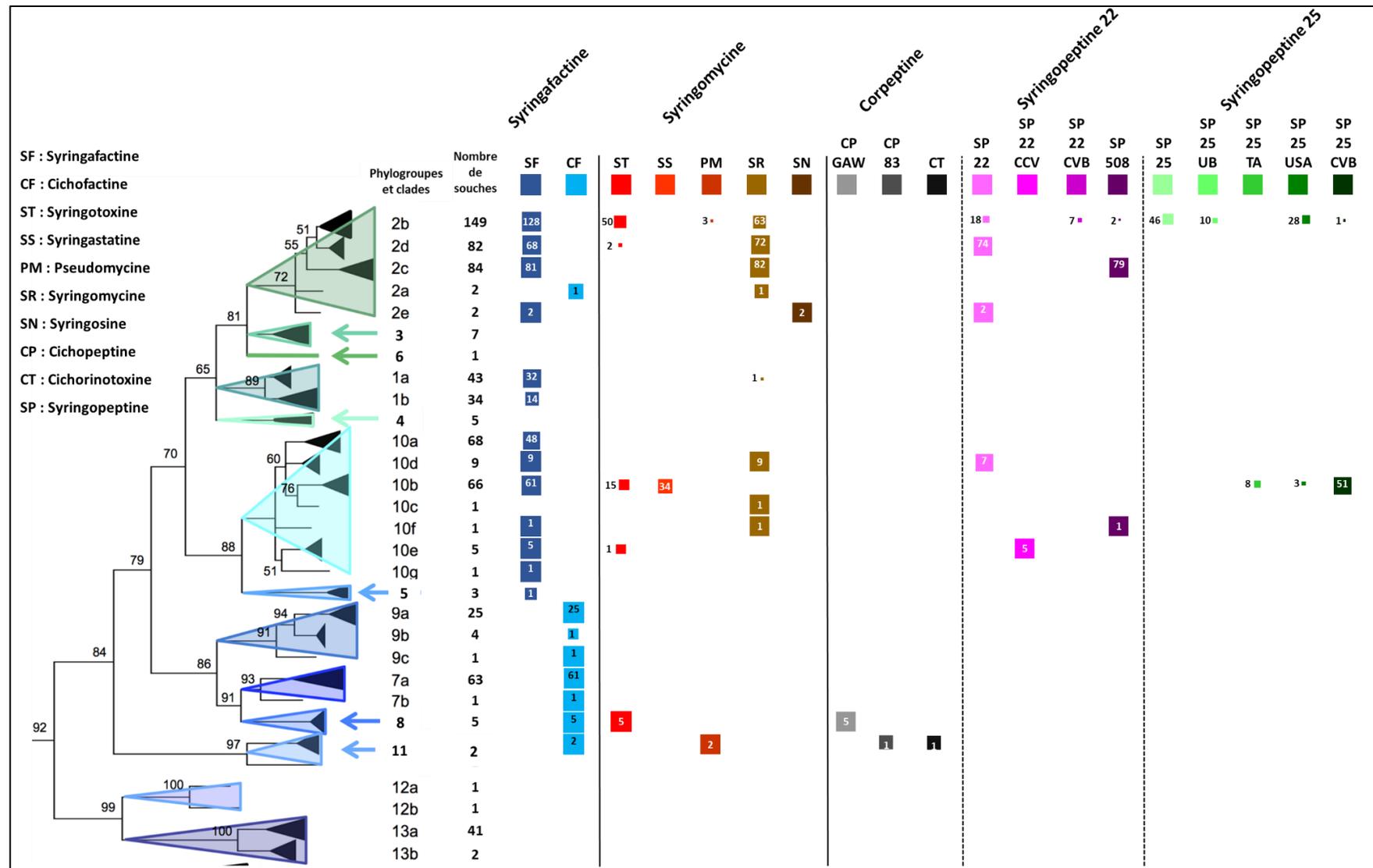


Figure 30 : Sous-familles de lipopeptides produites par des souches du complexe *P. syringae* appartenant à différents groupes phylogénétiques (adapté de Berge et al., 2014)

Pour chaque sous-famille, l'aire du carré est proportionnelle au nombre de souches productrices dans le groupe phylogénétique

Les 77,3% de souches (548 souches) produisant des lipopeptides de la famille des syringafactines sont réparties dans 21 des 29 groupes phylogénétiques répertoriés. La production des lipopeptides de cette famille, qui avait jusqu'ici été montré uniquement chez les souches des groupes 01a, 02d (Berti et al. 2007; Burch et al. 2014) et 11 (Pauwelyn et al. 2013; Götze et al. 2019), se révèle donc être ubiquitaire au sein du complexe *P. syringae*.

Rappelons que dans le complexe *P. syringae*, la famille des syringafactines est composée de deux sous-familles : la syringafactine et la cichofactine. La sous-famille des syringafactines a été détectée chez les souches des phylogroupes 01 (clades a et b), 02 (clades 02b, 02c, 02d, 02e), 05, 10 (clades a, b, d, e, f, g). Celle des cichofactines a été détectée chez les souches des phylogroupes 02 (clade a), 07 (clades a et b), 08, 09 (clades a, b, c) et 11. Ces deux sous-familles ne sont donc jamais co-produites dans un même clade. De plus, les clades composés de souches productrices de syringafactines et ceux composés de souches productrices de cichofactine forment deux ensembles phylogénétiquement séparés (excepté le clade 02a) (**Figure 30**).

Certains de ces groupes phylogénétiques sont composés de souches produisant exclusivement des lipopeptides de la famille des syringafactines. Ce sont les groupes 01a (excepté une souche), 01b, 05, 10a, 10g pour les souches productrices de syringafactines et 07a, 07b, 09a, 09b, 09c pour les souches productrices de cichofactines (**Figure 30**). Dans les clades 07a et 09a, l'investigation des génomes des souches *P. syringae* LAB0023 et *P. syringae* CMW0012 a confirmé ces observations puisque seuls les gènes NRPS impliqués dans la synthèse de cette famille de lipopeptides ont été retrouvés (**Tableau 13**). Dans les clades 01a et 10a, Feil et al., (2005) et Hockett et al., (2014) avaient également montré que les souches *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 et *P. syringae* CC1583 possédaient exclusivement des gènes NRPS de syringafactine (Feil et al. 2005; Hockett et al. 2014). Il est nécessaire d'analyser les génomes des souches des groupes 01b, 05, 09b et 10g pour vérifier la présence exclusive de ces gènes NRPS.

Les phylogroupes 02 (clades b, c, d, e), 08, 10 (clades b, d, e, f) et 11 sont, quant à eux, composés de souches pour lesquelles trois familles de lipopeptides ont été détectées (*i.e.* syringafactine, syringomycine et l'une des trois familles à longue chaîne d'acides aminés)(**Figure 30**). Pour certaines souches de ces phylogroupes (génomme non disponible dans le clade 10f), l'investigation des génomes a également confirmé la présence de clusters de gènes NRPS codant pour trois familles de lipopeptides (**Tableau 13**).

Certaines ressemblances sont observées entre ces différents phylogroupes. Ainsi, les phylogroupes 08 et 11, proches phylogénétiquement, sont les seuls composés de souches produisant la sous-famille des cichofactine et des lipopeptides de la famille des corpeptines.

Plusieurs similarités sont également constatées entre les différents clades des phylogroupes 02 et 10 :

- Les clades 02d et 10d sont composés de souches produisant les mêmes sous-familles de lipopeptides (syringafactine, syringomycine, syringopeptine 22).
- Les clades 02c et 10f sont composés de souches produisant les mêmes sous-familles de lipopeptides (syringafactine, syringomycine, syringopeptine 508).
- Les clades 02b et 10b sont les seuls clades composés de souches productrices de lipopeptides de la famille des syringopeptines 25.

Les clades 02b et 10b se distinguent également des autres clades par l'importante diversité de lipopeptides que leurs souches produisent. En effet, pour une famille donnée, les souches de ces clades ne produisent pas toujours les mêmes sous-familles. Ainsi, les souches du clade 02b produisent différentes sous-familles de syringomycines (*i.e.* syringotoxine, pseudomycine, syringomycine), de syringopeptines 22 (*i.e.* syringopeptine 22, 22CVB, 508) et de syringopeptines 25 (*i.e.* syringopeptine 25, 25UB, syringopeptine 25USA, syringopeptine 25CVB). De même, les souches du clade 10b produisent différentes sous-familles de syringomycine (*i.e.* syringotoxine et syringostatine) et de syringopeptines 25 (*i.e.* syringopeptine 25TA, 25USA, 25CVB) (**Figure 30**). La diversité de production des sous-familles de lipopeptides observée inter-clades peut donc dans certains cas, être également observée intra-clades.

Notons que dans les familles des syringomycines, des corpeptines et des syringopeptines 22 et 25, certaines sous-familles sont produites de manière phylogroupe ou clade-spécifique. Dans la famille des syringomycines, la syringosine et la syringostatine sont ainsi exclusivement produites par les deux souches du clade 02e et 34 souches du clade 10b. Dans la famille des corpeptines, la cichopeptine GAW est uniquement produite par les 5 souches du phylogroupe 08. La cichopeptine 83 et la cichorinotoxine sont seulement produites par les deux souches du phylogroupe 11. Dans la famille des syringopeptines 22, les deux nouvelles sous-familles syringopeptine 22CCV et 22CVB sont uniquement produites par respectivement, 5 souches du clade 10e et 7 souches du clade 02b. Enfin, dans la famille des syringopeptines 25, les syringopeptines 25 et 25UB sont exclusivement produites par 46 et 10 souches du clade 02b tandis que les syringopeptines 25TA et 25CVB (excepté une souche dans le clade 02b) sont exclusivement produites par 8 et 51 souches du clade 10b. Ces sous-familles pourraient alors être utilisées comme biomarqueurs de chacun de ces phylogroupes et clades.

Enfin, les phylogroupes 03, 04, 06, 12 (clades 12a et 12b) et 13 (clades 13a et 13b) sont quant à eux composés de souches pour lesquelles aucun lipopeptide n'a été détecté.

Les résultats de cette étude ont montré que la production des lipopeptides de la famille des syringafactines était ubiquitaire au sein du complexe *P. syringae* (77,3% des souches réparties dans 21 des 29 phylogroupes et clades répertoriés). Il est intéressant de se demander pour quelles raisons les gènes impliqués dans la synthèse des syringafactines ont été tant conservés. L'une des hypothèses que je propose est que ces métabolites secondaires possèdent un panel d'activités physico-chimique essentielles pour le développement des souches et leur mobilité dans les niches environnementales dans lesquelles elles se trouvent. En effet, ce sont des molécules surfactantes impliquées dans la mobilité bactérienne via le mécanisme de « swarming ». Chez certaines souches qui les produisent, elles sont d'ailleurs les seules molécules impliquées dans un tel mécanisme. Des mutants de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 et *P. cichorii* SF1-54 incapables de produire des syringafactines et des cichofactines, perdent en effet leur capacité de « swarming » (Berti et al. 2007; Pauwelyn et al. 2013). Notons que cette activité n'a jamais été montrée pour les autres lipopeptides produits par les souches du complexe *P. syringae*. En plus de leur implication dans la mobilité bactérienne, il a été montré que dans un contexte d'interaction plante/bactérie, ces molécules favorisaient l'accès aux nutriments et à l'eau dans des atmosphères à forte humidité relative, grâce à leur pouvoir hygroscopique (Burch et al. 2014; Hernandez and Lindow 2019). Enfin, elles possèdent des activités antimicrobiennes (montrées pour les cichofactines) qui pourraient,

dans le cadre d'une compétition spatiale, favoriser le développement des souches productrices au détriment d'autres organismes (Pauwelyn et al. 2013).

Nous avons également observé que les sous-familles des syringafactines et des cichofactines étaient produites dans des groupes phylogénétiques différents avec une séparation phylogénétique claire entre les souches productrices de l'une et de l'autre sous-famille. Roongsawang et al., 2011 a suggéré que les gènes impliqués dans la synthèse des lipopeptides de cette famille avaient évolué à partir de ceux impliqués dans la synthèse de l'arthrofactine, un lipopeptide cyclique de la famille des amphisines, produit par *Pseudomonas* sp. MIS38 (Roongsawang et al. 2011). Les souches productrices de syringafactine et de cichofactine pourraient alors avoir divergé à partir d'un ancêtre commun ayant acquis un cluster NRPS impliqué dans la synthèse d'une forme de syringafactine.

Nous avons également observé qu'en fonction des groupes phylogénétiques considérés, les lipopeptides de la famille des syringafactines pouvaient être produits seuls ou co-produits avec deux autres familles de lipopeptides (syringomycine et corpeptine/syringopeptine 22/syringopeptine 25). Comme suggéré par Hockett et al., (2014), il est vraisemblable que les souches productrices de plusieurs familles de lipopeptides aient acquis les gènes NRPS correspondant, par transfert horizontal, après avoir divergé des souches mono-productrices de syringafactines (Hockett et al. 2014). En lien avec cette hypothèse, plusieurs études ont montré que les clusters NRPS impliqués dans la synthèse des syringomycines et des corpeptines, syringopeptines 22 ou syringopeptines 25 étaient co-détectés sur des îlots génomiques (Scholzschroeder et al. 2001b; Van Der Voort et al. 2015; Michelsen et al. 2015) qui sont des régions spécifiques des chromosomes acquises suite à des transferts horizontaux de gènes (Bellanger 2009). Rappelons toutefois que chez 8,6% des souches testées, les syringomycines et les corpeptines/syringopeptines 22/syringopeptines 25 n'ont pas été co-détectées. Il est possible que pour ces souches, la production des lipopeptides n'ait pas toujours été suffisante pour que les masses de ces derniers puissent être observées lors des analyses par spectrométrie de masse.

Nous avons également observé que les clades des phylogroupes 02 et 10, pourtant phylogénétiquement éloignés, étaient composés de souches produisant des sous-familles de lipopeptides similaires, voire identiques. En lien avec la discussion énoncée ci-dessus, ce sont très probablement des transferts de gènes horizontaux qui sont à l'origine de telles ressemblances. Berge faisait déjà cette hypothèse en 2014 pour expliquer les homologies phénotypiques observées entre les souches des phylogroupes 02 et 10 (Berge et al. 2014).

Enfin, cette étude a mis en évidence une importante diversité structurale dans les familles des syringomycines, des corpeptines, des syringopeptines 22 et des syringopeptines 25 qui pourraient avoir plusieurs origines (Götze et al. 2019) :

- 1) La duplication d'un domaine A au sein d'un même cluster NRPS. C'est l'hypothèse que je propose pour expliquer la diversité structurale des nouvelles syringopeptines 25. Ainsi, le domaine A responsable de l'incorporation de la leucine en 3^{ème} position de la chaîne peptidique de la syringopeptine 25UB pourrait s'être dupliqué pour donner les syringopeptines 25USA (leucine aux positions 3 et 10) et 25TA (leucine aux positions 3, 6 et 14). Pour rappel, ces nouvelles syringopeptines 25 diffèrent de la syringopeptine 25, décrite dans la littérature, uniquement au niveau de ces leucines (Ballio et al. 1991).
- 2) La recombinaison d'un domaine A entre deux clusters NRPS différents
- 3) L'évolution des synthétases NRPS en réponse à des pressions environnementales.

Points clés à retenir :

- *Production ubiquitaire des lipopeptides de la famille des syringafactines au sein du complexe P. syringae (21 groupes phylogénétiques sur 29)*
- *Séparation phylogénétique entre les clades composés de souches productrices de syringafactine et ceux composés de souches productrices de cichofactine*
- *Production des lipopeptides de la famille des syringafactines seuls ou co-produits avec des syringomycines et des lipopeptides de l'une des trois familles à longue chaîne d'acides aminés*
 - o *Les souches co-produisant 3 familles de lipopeptides sont les plus nombreuses (41,2%)*
 - o *Les familles des corpeptines, syringopeptines 22 et syringopeptines 25 ne sont jamais co-produites*
- *Plusieurs sous-familles spécifiquement produites dans certains groupes phylogénétiques pourraient être utilisées comme biomarqueurs de ces groupes*

Chapitre 2 : Evaluation de l'activité antifongique des souches du complexe *P. syringae*

Le potentiel des souches du genre *Pseudomonas* pour le biocontrôle de maladies cryptogamiques a été mis en évidence dans de nombreux travaux scientifiques (Thrane et al. 2000; Weller 2007; Michelsen et al. 2015). Ces travaux ont parfois mené à l'homologation et à la mise sur le marché de produits de biocontrôle formulés à base de différentes espèces de *Pseudomonas*.

Les souches du complexe *P. syringae* ont, quant à elles, plus généralement été étudiées pour leurs activités en tant que pathogènes des plantes (Xin et al. 2018). Pourtant, certaines études ont montré que des souches de ce complexe bactérien présentaient un potentiel intéressant pour une utilisation comme agents de biocontrôle (Levy et al. 1988; Janisiewicz and Jeffers 1997; Stockwell and Stack 2007; Williamson et al. 2008). Certaines souches ont même obtenu une homologation pour une utilisation en tant que biopesticides, aux Etats-Unis. C'est le cas des souches *P. syringae* ESC-10 et *P. syringae* ESC-11, commercialisées sous les noms Biosave 1000 et Biosave 10LP/11LP qui sont notamment utilisées pour lutter contre la moisissure bleue causée par *Penicillium expansum* et la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* sur les fruits et tubercules après récoltes. Le traitement post-récolte pourrait sans doute constituer un usage particulier des *P. syringae* qui éluderait la question de leur activité phytopathogène *in planta*.

Le but des travaux décrits dans cette partie est donc d'évaluer l'activité antifongique des souches du complexe *P. syringae* contre trois champignons responsables de maladies cryptogamiques : *Sclerotinia sclerotiorum* responsable de la pourriture blanche ou sclérotiniose, *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise et *Zymoseptoria tritici* responsable de la septoriose du blé.

Les 709 souches étudiées dans le chapitre précédent pour la production de lipopeptides, ont donc été utilisées pour réaliser, *in vitro*, des tests d'antagonisme confrontant les colonies bactériennes puis les surnageants de culture bactériennes, aux champignons ciblés. Une étude des relations entre l'activité antifongique des souches et la production de lipopeptides a également été réalisée. Enfin, les surnageants de culture de deux souches prometteuses, produisant chacune plusieurs lipopeptides ont été étudiés pour leur potentiel de biocontrôle, *in planta*, de la septoriose du blé.

2.1. Evaluation, *in vitro*, de l'activité antifongique des souches du complexe *P. syringae*

Cette partie présente les résultats des tests d'activité antifongique qui ont été réalisés, *in vitro*, à partir de colonies bactériennes et à partir de surnageants de cultures bactériennes contre les champignons ciblés dans cette étude : *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* et *Zymoseptoria tritici*.

Les tests d'antagonisme opposant les colonies bactériennes aux champignons ensemencés sous forme de mycélium ou de spores ont été réalisés à partir des 709 souches de la collection. Pour chaque test, l'activité antifongique a été estimée par la mesure du rayon d'inhibition de croissance des champignons.

Les résultats obtenus lors de ces tests sont illustrés avec la souche *P. syringae* CCV0214, dans la **Figure 31**.

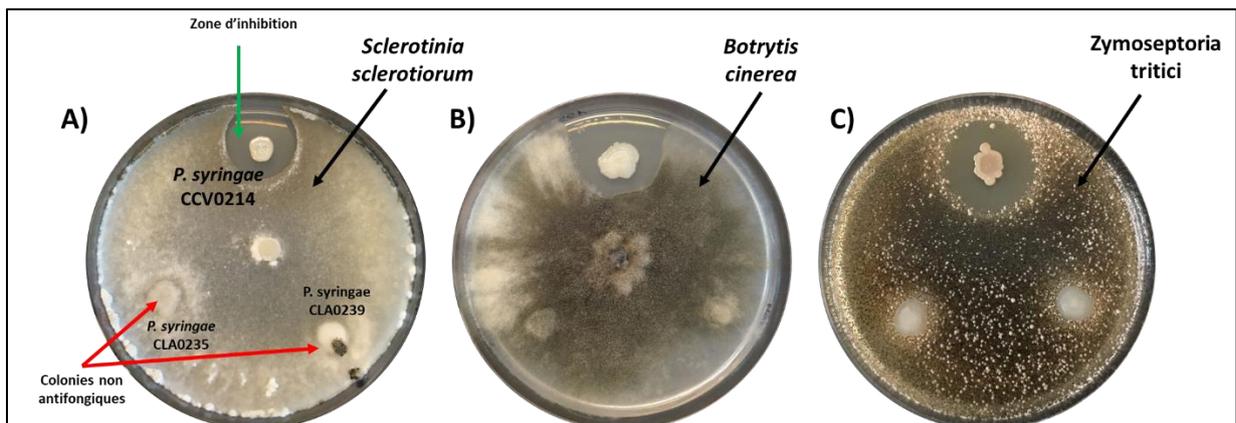


Figure 31 : Activité antifongique de la souche *P. syringae* CCV0214 contre les 3 champignons ciblés : A) *Sclerotinia sclerotiorum*, B) *Botrytis cinerea*, C) *Zymoseptoria tritici*

A) et B) Inhibition du développement mycélien de *S. sclerotiorum* et *Botrytis cinerea*. C) Inhibition du développement des spores de *Zymoseptoria tritici*, ensemencées en profondeur dans la gélose.

Pour chaque champignon testé, le pourcentage de souches actives par rapport au nombre de souches total est répertorié dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Activités antifongiques des colonies contre *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* et *Zymoseptoria tritici*

Champignons cibles	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Au moins un des 3 champignons ciblés
Nombre de souches actives	75	70	107	158
Pourcentage par rapport au nombre de souches total	10,6	9,9	15,1	22,3

Les souches actives contre *Sclerotinia sclerotiorum* représentent 10,6% des souches testées, celles actives contre *Botrytis cinerea* représentent 9,9% des souches testées et 15,1% des souches ont montré une activité antifongique contre *Zymoseptoria tritici*. Au total, 22,3% des souches se sont révélées efficaces contre au moins un des trois champignons ciblés. Ces tests ont donc permis de montrer que près d'un quart des souches de la collection étudiée sont capables de produire des molécules antifongiques en milieu solide.

La capacité des souches antifongiques à produire des molécules actives en milieu liquide, a également été évaluée. A ce titre, nous avons sélectionné 97 souches ayant présenté une activité contre au moins l'un des trois champignons ciblés ci-dessus afin de produire des surnageants de culture en milieu TSB. Ces derniers ont ensuite été testés pour leur activité antifongique contre des spores de *Botrytis cinerea* et *Zymoseptoria tritici*. Leur activité contre *Sclerotinia sclerotiorum* n'a pas été évaluée car il n'a pas été possible de préparer de suspensions de spores à partir de ce champignon.

L'effet des surnageants sur le développement fongique a été estimé par la mesure du diamètre mycélien lors de deux lectures. La première lecture, réalisée à 4 jours pour *B. cinerea* et 7 jours pour *Z. tritici* a eu pour but d'identifier tous les surnageants occasionnant un ralentissement de croissance fongique par rapport au champignon témoin. La lecture finale, effectuée à 7 jours pour *B. cinerea* et 10 jours pour *Z. tritici*, a eu pour but d'identifier les surnageants inhibant totalement le développement fongique.

Les résultats des tests sont illustrés avec le surnageant de la souche *P. cichorii* CFBP4407 dans la **Figure 32**.

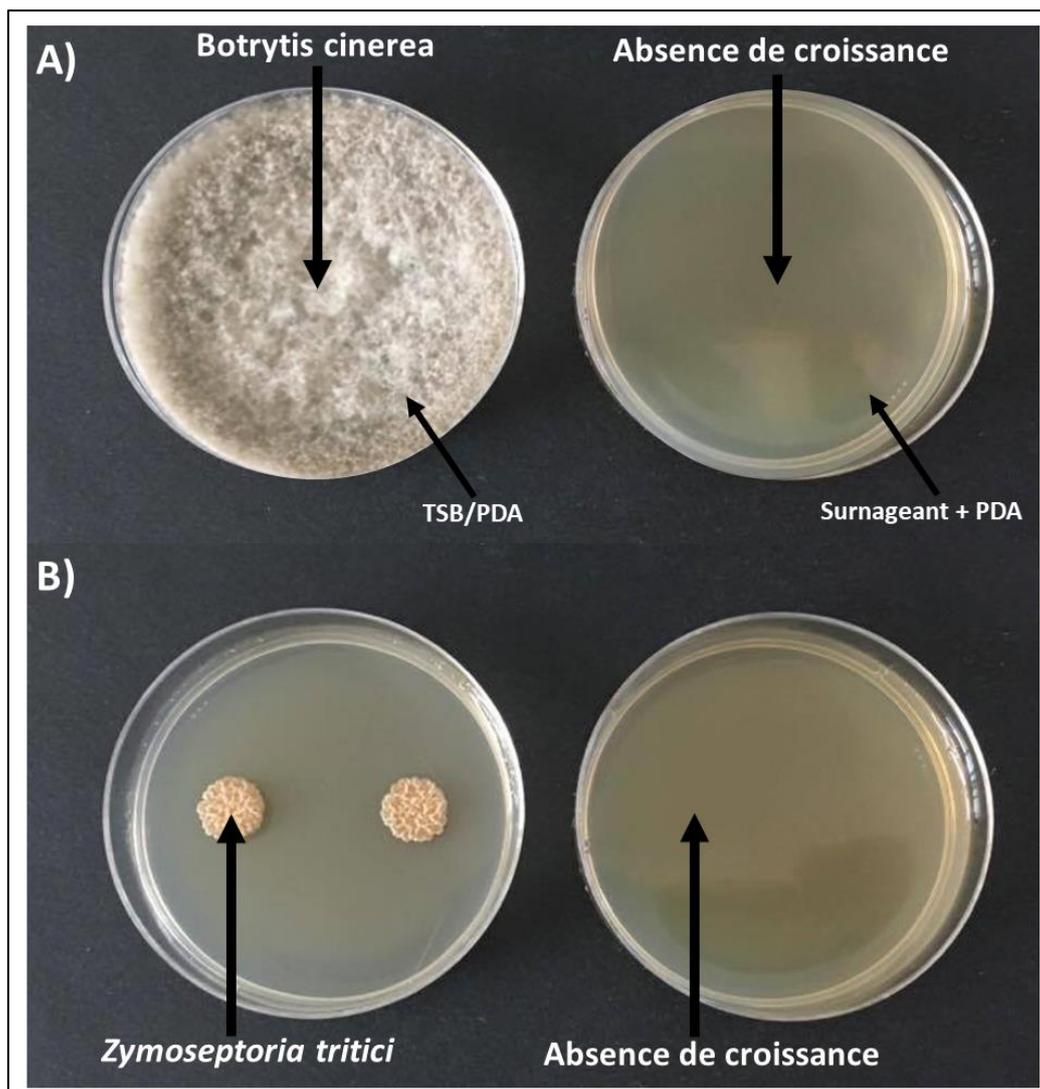


Figure 32 : Activité antifongique du surnageant de culture de la souche *P. cichorii* CFBP4407 dilué au demi contre *Botrytis cinerea* (A) et *Zymoseptoria tritici* (B)
 L'activité antifongique est observée par l'absence de croissance du champignon sur un milieu composé de surnageant de culture et de PDA. Le milieu TSB est utilisé comme témoin.

Les résultats des tests d'activité antifongique réalisés contre *Botrytis cinerea* et *Zymoseptoria tritici* sont présentés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Activités antifongiques des surnageants de culture contre A) *Botrytis cinerea* et B) *Zymoseptoria tritici*

A) Champignon cible : <i>B. cinerea</i>	Ralentissement de croissance du champignon (4 jours)	Inhibition de croissance du champignon (7 jours)
Nombre de surnageants actifs à la dilution 1/2	97	77
Nombre de surnageants actifs à la dilution 1/4	2	0
B) Champignon cible : <i>Z. tritici</i>	Ralentissement de croissance du champignon (7 jours)	Inhibition de croissance du champignon (10 jours)
Nombre de surnageants actifs à la dilution 1/2	96	83
Nombre de surnageants actifs à la dilution 1/4	10	2

Le tableau ci-dessus montre qu'à la dilution $\frac{1}{2}$, les 97 surnageants testés sont capables de ralentir la croissance de *B. cinerea* (observation à 4 jours) mais seuls 77 d'entre eux, inhibent totalement son développement (observation à 7 jours). A la dilution $\frac{1}{4}$, seuls deux surnageants ont occasionné un ralentissement de croissance fongique et aucun d'entre eux ne l'ont totalement inhibée (**Tableau 15A**).

Contre *Zymoseptoria tritici*, 96 des 97 surnageants testés à la dilution $\frac{1}{2}$ ont entraîné un ralentissement de croissance du champignon (observation à 7 jours), 83 d'entre eux ayant totalement inhibé son développement (observation à 10 jours). A la dilution $\frac{1}{4}$, 10 surnageants ralentissent la croissance fongique, 2 d'entre eux l'inhibent totalement (**Tableau 15B**).

En somme, ces résultats ont montré que tous les surnageants sont actifs contre l'un et/ou l'autre des champignons testés, soit en ralentissant leur croissance, soit en l'inhibant totalement. Cela confirme que les souches antifongiques sont capables de sécréter les molécules actives qu'elles produisent, dans le milieu de culture liquide.

Le fait que certains surnageants sont seulement capables de ralentir le développement fongique alors que d'autres l'inhibent complètement, pourrait être expliqué par des différences de concentrations et des différences d'activités des molécules antifongiques produites par les différentes souches. De trop faibles concentrations en molécules antifongiques expliqueraient notamment pourquoi la plupart des surnageants dilués au quart, ne montrent aucune activité. Une optimisation des conditions de culture (temps, agitation, milieu de culture, etc.) permettrait certainement d'augmenter l'efficacité des surnageants.

En résumé, les résultats présentés dans cette partie ont montré le potentiel antifongique des souches du complexe *P. syringae*, capables de produire les molécules actives aussi bien en milieu solide (activité des colonies bactériennes), qu'en milieu liquide (activité des surnageants de culture).

Les points clés à retenir :

- *Au total, 22,3% (158 des 709 souches testées), sont actives contre au moins l'un des trois champignons ciblés : Sclerotinia sclerotiorum, Botrytis cinerea, Zymoseptoria tritici*
- *Les surnageants de culture, produits à partir des 97 souches antifongiques sélectionnées, ont une activité antifongique contre les spores de Botrytis cinerea et/ou Zymoseptoria tritici = les souches sont capables de sécréter les molécules antifongiques qu'elles produisent, en milieu liquide*
- *Les différences d'activités des surnageants observées (ralentissement ou inhibition du développement fongique) entre les souches et en fonction des dilutions testées (1/2 ou 1/4) peuvent être expliquées par des différences d'activités et de concentrations des molécules actives*

2.2. Etude des relations entre activité antifongique et production de lipopeptides

Chez *Pseudomonas*, les lipopeptides sont connus comme étant les principales molécules responsables de l'activité antifongique des souches qui les produisent (D'ae et al. 2010; Geudens and Martins 2018).

L'objectif de l'étude présentée dans cette partie a donc été de déterminer s'il existait une corrélation entre les activités antifongiques des souches de la collection explorée et la production de lipopeptides, en milieu solide, puis, en milieu liquide.

A ce titre une analyse de la répartition des familles de lipopeptides produites, en milieu solide, par les souches antifongiques a dans un premier temps été réalisée. Elle est illustrée sous la forme de 3 diagrammes en anneaux dans la **Figure 33**. Le premier diagramme renseigne sur la production de lipopeptides par les 75 souches antagonistes de *S.sclerotiorum* (**Figure 33A**), le deuxième, sur la production de lipopeptides par les 70 souches antagonistes de *B. cinerea* (**Figure 33B**) et le troisième, sur la production de lipopeptides par les 107 souches antagonistes de *Z. tritici* (**Figure 33C**). Pour chaque diagramme, le disc central rend compte de la production de lipopeptides en distinguant le nombre de familles produites (0, 1, 2 ou 3 familles). Les anneaux indiquent la famille d'appartenance des lipopeptides produits (anneau 1 : syringafactine, anneau 2 : syringomycine, anneau 3 : syringopeptine 22, anneau 4 : syringopeptine 25, anneau 5 : corpeptine).

Au regard de la **Figure 33**, la quasi-totalité des souches pour lesquelles une activité antifongique a été montrée, produit des lipopeptides. En effet, seuls 1,4% des souches actives contre *B. cinerea* et 3,7% des souches actives contre *Z. tritici* n'en produisent pas. Ces chiffres indiquent donc que les lipopeptides sont très vraisemblablement impliqués dans l'activité antifongique des souches étudiées. En ce qui concerne les souches actives pour lesquelles aucun lipopeptide ne semble produit, il est possible 1) que les lipopeptides aient été produits mais en quantités insuffisantes pour être détectés, 2) que d'autres molécules soient responsables de cette activité. Notons toutefois, que seuls les lipopeptides et certains sidérophores (Yu et al. 2017), molécules produites dans des milieux dépourvus de fer (ce qui n'est pas le cas du milieu TSB), ont, à ce jour, montré de telles activités chez *P. syringae*.

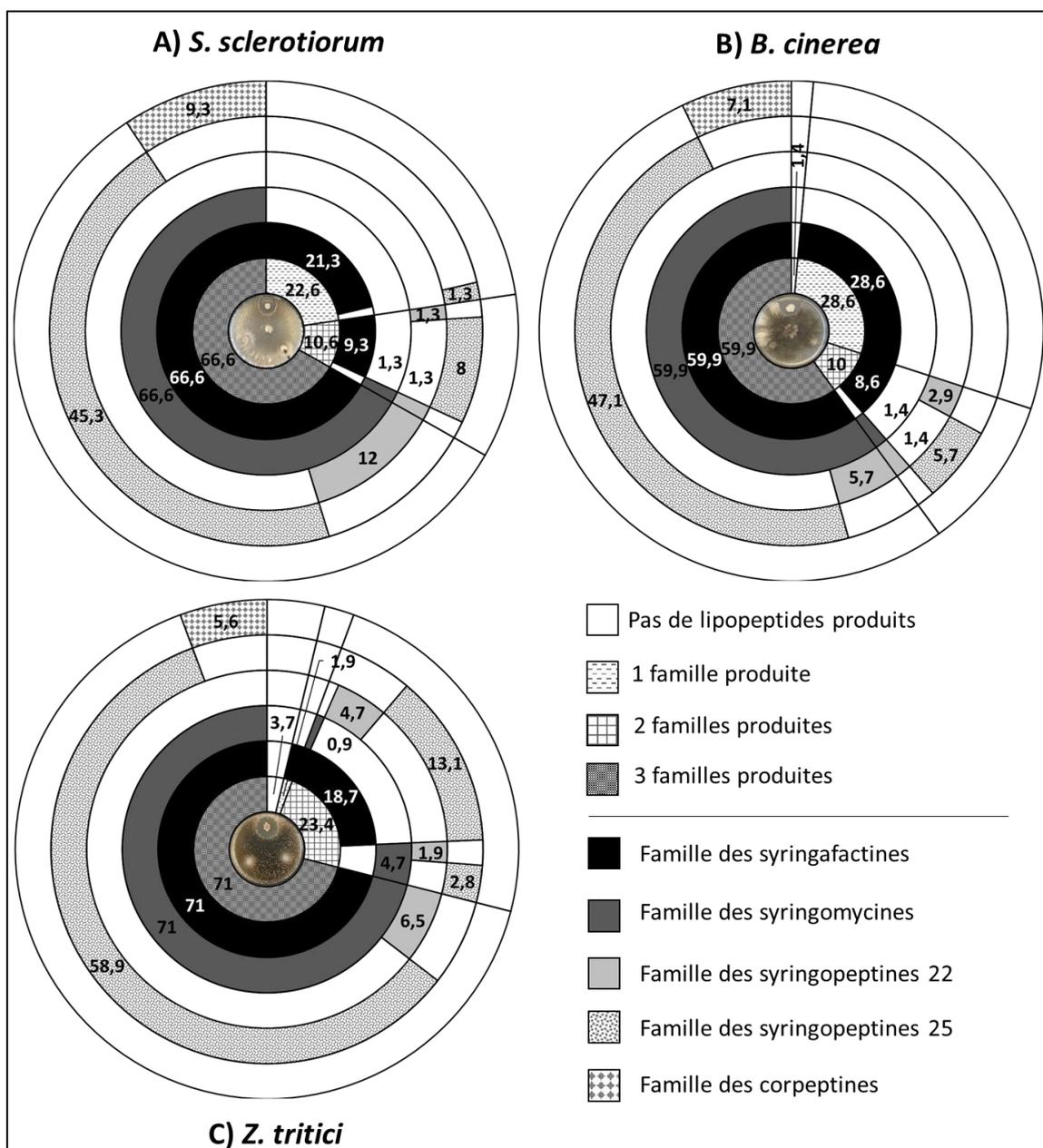


Figure 33 : Lipopeptides produits par les souches antifongiques

Avec, familles produites par les souches A) actives contre *Sclerotinia sclerotiorum*, B) actives contre *Botrytis cinerea*, C) actives contre *Zymoseptoria tritici*

Certaines souches antifongiques produisent exclusivement des lipopeptides de la famille des syringafactines. Elles représentent 22,6% et 28,6% des souches actives contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea*, respectivement (**Figure 33A et 33B**). Notons que pour toutes ces souches, la sous-famille de lipopeptide produite est celle des cichofactines (données non présentées). Les cichofactines pourraient donc être impliquées dans le pouvoir antagoniste des souches qui les produisent, bien que, jusqu'ici, leur activité antimicrobienne ait uniquement été montrée contre des levures et bactéries (Pauwelyn et al. 2013). En revanche, aucune des souches

ne produisant que des cichofactines ne sont actives contre *Zymoseptoria tritici* dans les conditions testées.

Les souches produisant trois familles de lipopeptides différentes sont les plus nombreuses. Elles représentent 66,6% des souches actives contre *Sclerotinia sclerotiorum* (**Figure 33A**), 59,9% des souches actives contre *Botrytis cinerea* (**Figure 33B**) et 71% des souches actives contre *Zymoseptoria tritici* (**Figure 33C**). L'activité antifongique des souches semble donc favorisée lorsque des lipopeptides appartenant à trois familles différentes sont co-produits.

Enfin, une grande partie des souches antifongiques produisent des lipopeptides de la famille des syringopeptines 25. Elles représentent 54,6% des souches actives contre *Sclerotinia sclerotiorum* (**Figure 33A**) 52,8% des souches actives contre *Botrytis cinerea* (**Figure 33B**) et 74,8% des souches actives contre *Zymoseptoria tritici* (**Figure 33C**). Il semblerait donc que la production de cette famille de lipopeptide joue un rôle très important dans l'activité antifongique des souches du complexe *P. syringae*. Lavermicocca et al., (1997) avaient également montré le fort potentiel antifongique de la syringopeptine 25A contre le champignon *Botrytis cinerea* (Lavermicocca et al. 1997). L'équipe italienne avait montré que ce lipopeptide était capable d'inhiber la croissance du pathogène à une concentration de 1,56µM alors que des concentrations de 12,50µM, 18,75µM et 25µM de syringopeptine 22A, syringomycine E et syringotoxine B, étaient respectivement nécessaires pour l'arrêter.

Au regard des résultats présentés ci-dessus, nous pouvons émettre l'hypothèse que les lipopeptides sont les molécules impliquées dans l'activité antifongique des souches étudiées. Leur présence dans des surnageants de culture actifs a donc également été vérifiée.

Nous avons pour cela choisi d'analyser en LC-MS, les surnageants issus de culture en milieu TSB de deux souches antifongiques de *P. cichorii* et *P. syringae*, ayant chacune montré, sur colonie, la production de lipopeptides appartenant à trois familles différentes. *P. cichorii* produit la cichofactine, la pseudomycine et la cichorinotoxine et *P. syringae* produit la syringafactine, la syringostatine et la syringopeptine 25. Les résultats obtenus suite à l'analyse en LC-MS des surnageants de culture, sont présentés dans la **Figure 34**.

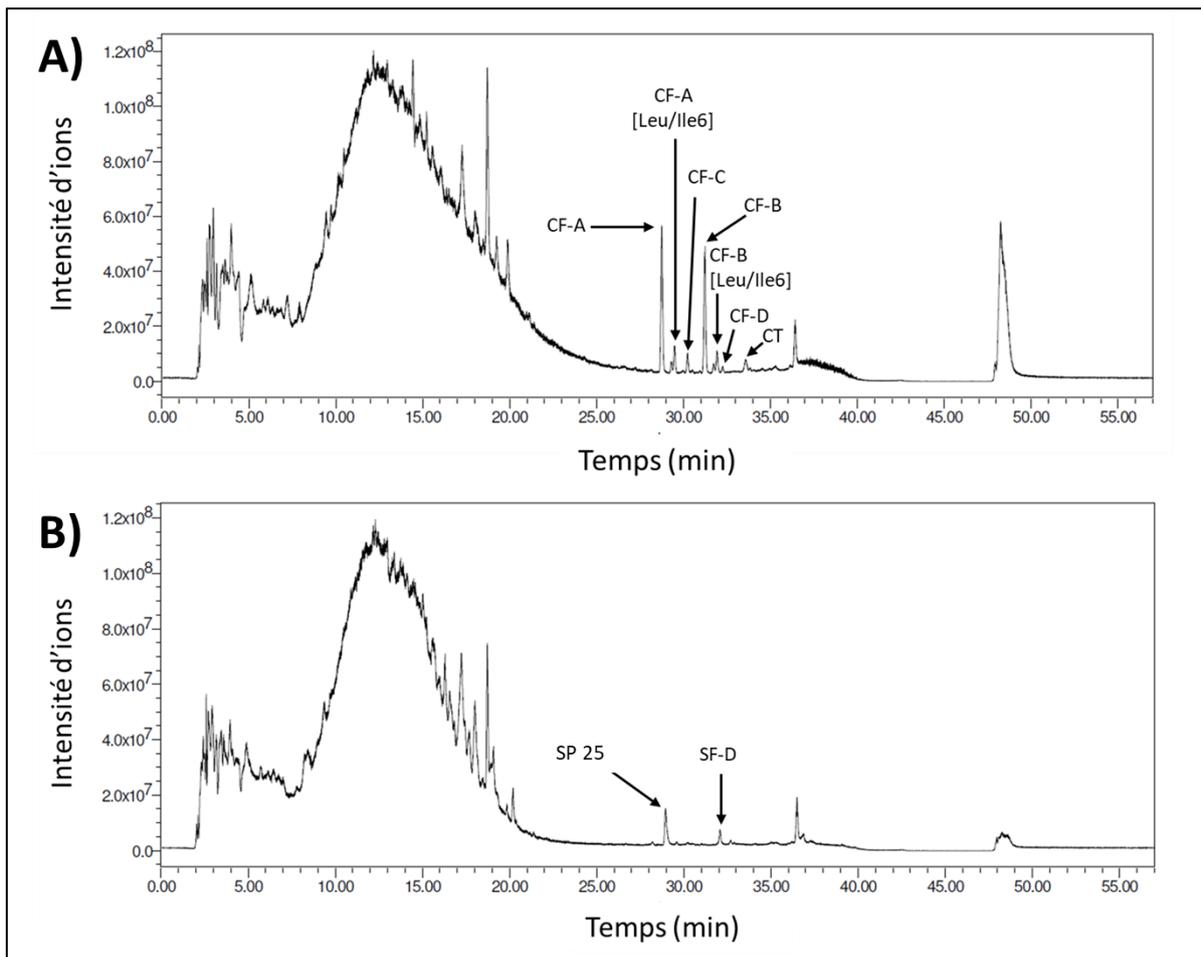


Figure 34 : Chromatogramme des ions totaux (TIC) en LC-MS des surnageants de culture TSB des souches de *P. cichorii* (A) et *P. syringae* (B)

Avec CF = Cichofactine, CT = Cichorinotoxine, SP 25 = Syringopeptine 25, SF = Syringafactine

Plusieurs lipopeptides ont été détectés dans les surnageants de culture des deux souches analysées. Chez *P. cichorii*, les lipopeptides qui ont été identifiés sont les cichofactines (variants A, A[Leu/Ile6], B, B[Leu/Ile6], C, D) et la cichorinotoxine (**Figure 34A**). Chez *P. syringae*, les lipopeptides identifiés sont la syringafactine D et la syringopeptine 25 (**Figure 34B**).

Pour les deux souches, les lipopeptides de la famille des syringomycines qui avaient été identifiés sur colonie, à savoir les pseudomycines chez *P. cichorii* et les syringostatines chez *P. syringae*, n'ont, en revanche, pas été retrouvés dans les surnageants de culture. Il est tout à fait possible que les conditions de culture choisies n'aient pas permis leur production ou bien qu'elles aient été produites en concentrations trop faibles pour être détectées.

Les résultats présentés ci-dessus ont donc confirmé la présence de lipopeptides dans les surnageants de culture antifongiques des deux souches étudiées. Pour tenter de confirmer que ces molécules sont bien à l'origine des activités observées, une semi-purification des surnageants de culture par ultrafiltration a été réalisée. Ce procédé de séparation membranaire qui permet de séparer les molécules d'un mélange en fonction de leur taille est en effet souvent utilisé pour la purification des lipopeptides (Coutte et al. 2013; Beltran-Garcia et al. 2017).

Les surnageants semi-purifiés obtenus, dont les activités antifongiques contre les spores de *B. cinerea* et *Z. tritici* ont été vérifiées, ont été analysés en LC-MS pour estimer la présence de lipopeptides. Les résultats des analyses effectuées sont présentés dans la **Figure 35**.

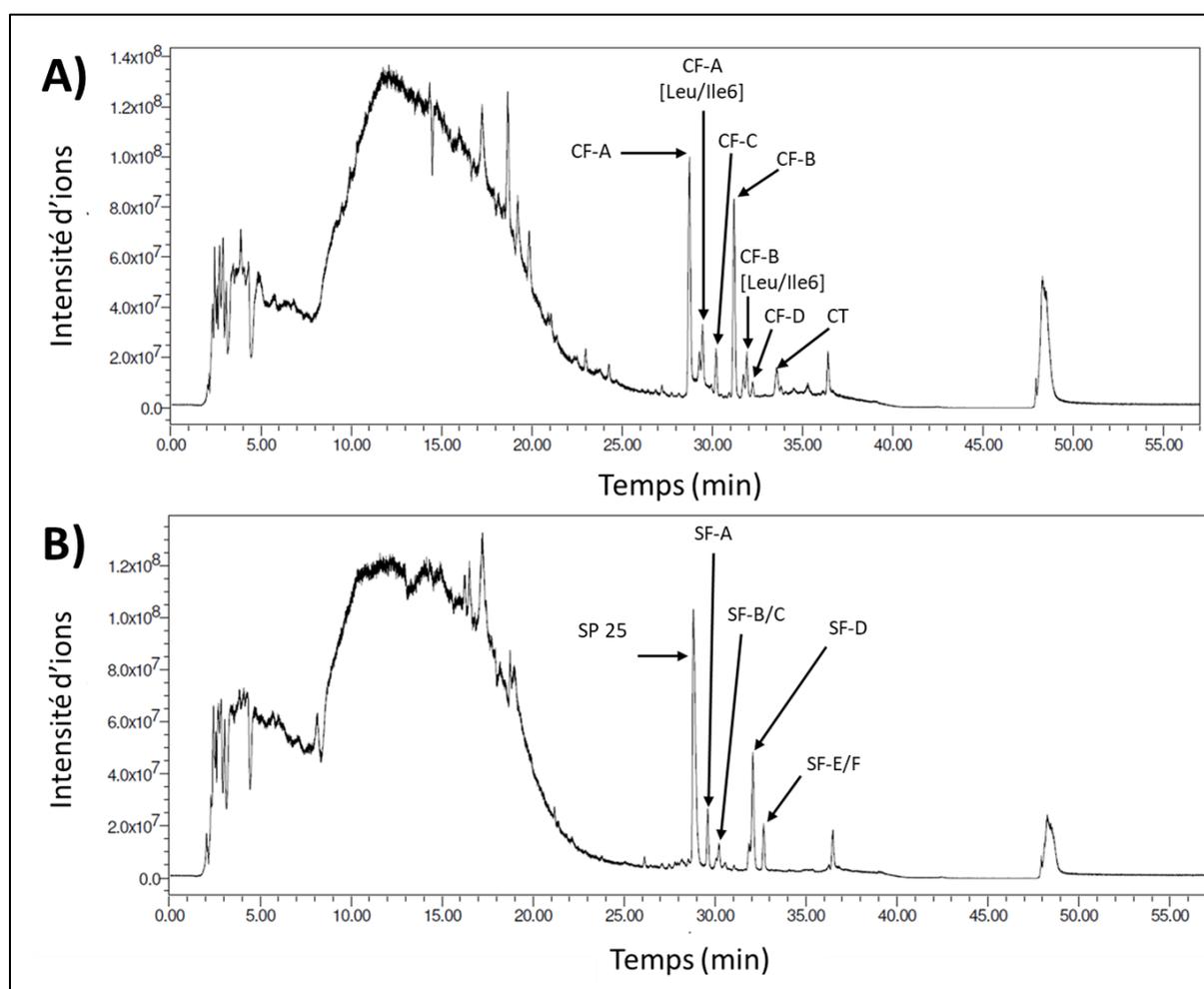


Figure 35 : Chromatogramme des ions totaux (TIC) en LC-MS des surnageants de culture TSB des souches de *P. cichorii* (A) et *P. syringae* (B), purifiés et concentrés par ultrafiltration (10X)
Avec CF = cichofactine, CT = Cichorinotoxine, SP 25 = Syringopeptine 25, SF = Syringafactine

Les analyses en LC-MS ont révélé la présence de lipopeptides dans les deux surnageants semi-purifiés analysés. Chez *P. cichorii*, les lipopeptides qui ont été détectés sont les mêmes que ceux qui avaient été identifiés dans le surnageant brut à savoir les cichofactines A, A[Leu/Ile6], B, B[Leu/Ile6], C, D et la cichorinotoxine (**Figure 35A**). Chez *P. syringae*, les lipopeptides qui ont été détectés sont les syringafactine A à F et la syringopeptine 25 (**Figure 35B**)

En résumé, tous les résultats présentés ci-dessus ont apporté plusieurs preuves tangibles de l'implication des lipopeptides dans les activités antifongiques observées :

- 1) La plupart des souches antifongiques produisent des lipopeptides
- 2) Les lipopeptides sont retrouvés dans les surnageants de culture
- 3) Des surnageants semi-purifiés par ultrafiltration conservent leur activité antifongique et contiennent des lipopeptides.

Rappelons que chez *P. syringae*, seuls les lipopeptides et les sidérophore produits en milieu exempts de fer ont, à ce jour, démontré une activité antifongique. Il n'est toutefois pas exclu que d'autres molécules, connues ou inconnues soient à l'origine des activités observées.

Des tests complémentaires demeurent donc nécessaires pour confirmer de manière définitive que les lipopeptides sont les molécules antifongiques produites par les souches étudiées. Pour cela, deux méthodes peuvent être utilisées. La première méthode est de construire des mutants bactériens incapables de produire des lipopeptides, en interrompant les gènes de synthétases responsables de leur synthèse, puis de vérifier que ces mutants ont perdu leur activité antifongique. La deuxième méthode est de purifier totalement les lipopeptides et de les tester directement pour leur activité antifongique.

Les points clés à retenir :

- *Implication des lipopeptides dans l'activité antifongique des souches*
 - *Production des lipopeptides par les souches antifongiques en milieu solide*
 - *Présence de lipopeptides dans les surnageants de culture actifs, bruts et semi-purifiés*

2.3. Relations entre activités antifongiques et classification phylogénétique des souches du complexe *P. syringae*

La répartition des souches actives dans les phylogroupes et clades du complexe *P. syringae*, a également été étudiée, dans le but d'identifier les groupes phylogénétiques les plus prometteurs.

A ce titre, pour chaque champignon testé, les souches ont été listées dans des tableaux de contingence à double entrée (Lignes : Groupe phylogénétique d'appartenance, Colonnes : Activité ou Absence d'activité contre le champignon). Les liens existants entre chaque ligne (Groupe phylogénétique) et chaque colonne (Activité, Absence d'activité) ont été mis en évidence au moyen de tests exacts de Fisher.

Les résultats sont présentés dans le **Tableau 16** qui recense, pour chaque groupe phylogénétique, le pourcentage de souches actives contre chaque champignon testé.

- Lorsqu'une case est blanche, cela signifie qu'aucun lien significatif n'a pu être établi entre le groupe phylogénétique et l'activité antifongique ou l'absence d'activité antifongique des souches ($p < 0,05$).
- Lorsqu'une case est rouge, cela signifie qu'il y a un lien significatif entre le groupe phylogénétique et l'absence d'activité antifongique des souches ($p < 0,05$).
- Lorsqu'une case est verte, cela signifie qu'il y a un lien significatif entre le groupe phylogénétique et l'activité antifongique des souches ($p < 0,05$).

Le **Tableau 16** montre que les souches actives sont réparties dans les groupes phylogénétiques 02b, 07a, 08, 10b, 10e et 11 (cases vertes). Parmi eux, les clades 02b et le phylogroupe 08 sont les seuls liés significativement à une activité contre les trois champignons ciblés. Le clade 07a est lié significativement à une activité contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea*. Le phylogroupe 11 est lié significativement avec une activité contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Zymoseptoria tritici*. Enfin un lien significatif avec une activité contre *Zymoseptoria tritici* est observé pour les clades 10b et 10e.

Tableau 16 : Pourcentages de souches actives contre les différents champignons ciblés, au sein des différents groupes phylogénétiques du complexe *P. syringae*

Phylogroupe	Nombre de souches dans le phylogroupe	Pourcentage de souches actives contre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pourcentage de souches actives contre <i>Botrytis cinerea</i>	Pourcentage de souches actives contre <i>Zymoseptoria tritici</i>	Commentaires
02b	149	26,2	19,5	32,9	Case verte Lien significatif entre groupe phylogénétique et activité antifongique
08	5	100	80	80	
07a	63	25,4	30,2	0	
10b	66	9,1	16,7	54,5	
10e	5	20,0	40,0	100,0	
11	2	100	50	100	
02a	2	0	0	0	Case blanche Aucun lien significatif entre groupe phylogénétique et absence d'activité
02e	2	0	0	0	
03	7	0	0	0	
04	5	0	0	0	
05	3	0	0	0	
06	1	0	0	0	
07b	1	0	0	0	
09b	4	0	0	0	
09c	1	0	0	0	
10c	1	0	0	0	
10d	9	0	0	0	
10f	1	0	0	0	
10g	1	0	0	0	
12a	1	0	0	0	
12b	1	0	0	0	
13b	2	0	0	0	
01a	43	0	0	2,3	Case rouge Lien significatif entre groupe phylogénétique et absence d'activité antifongique
01b	34	0	0	0	
02c	84	3,6	0	1,2	
10a	68	0	1,5	1,5	
13a	41	0	0	2,4	
02d	82	3,7	3,7	8,5	
09a	25	0	0	0	

Dans les groupes phylogénétiques 02a, 02e, 03, 04, 05, 06, 07b, 09a, 09b, 09c, 10c, 10d, 10f, 10g, 12a, 12b et 13b, aucune souche n'a présenté d'activité antifongique contre les champignons testés (cases blanches). Pour autant, les tests statistiques n'ont pas permis d'établir de lien significatif entre ces différents groupes et l'absence d'activité antifongique des souches. Cela est certainement dû au fait qu'ils soient composés d'un nombre de souches trop faible. Il serait donc intéressant de tester davantage de souches appartenant à ces phylogroupes et clades pour vérifier qu'elles ne sont pas antifongiques.

Pour les groupes phylogénétiques restants, un lien significatif avec une absence d'activité est observé (cases rouges). Ainsi, pour les groupes 01a, 01b, 02c, 10a et 13a, l'absence d'activité est significative contre les trois champignons testés. Pour le clade 02d, l'absence d'activité est significative contre *S. sclerotiorum* et *B. cinerea*. Enfin pour le clade 09a, l'absence d'activité est significative uniquement contre *Z. tritici*.

Ces résultats ont montré qu'il existe une corrélation entre l'activité antifongique des souches et leur classification phylogénétique. Cette information pourrait s'avérer primordiale dans le cadre de la recherche de nouvelles souches de *P. syringae* aux pouvoirs antifongiques. En effet, en privilégiant l'investigation des groupes phylogénétiques ayant montré un lien significatif avec une activité antifongique (*i.e.* 02b, 07a, 08, 10b, 10e, 11), cette recherche sera plus ciblée donc plus rapide et la probabilité de trouver de nouvelles souches actives sera plus élevée.

2.4. Evaluation, *in planta*, du potentiel de biocontrôle des souches du complexe *P. syringae*

Les résultats des parties précédentes ont montré que plusieurs souches du complexe *P. syringae* sont antifongiques et capables de sécréter les molécules actives, certainement les lipopeptides, en milieu liquide.

Le potentiel de biocontrôle de la septoriose du blé, *in planta*, de deux souches de *P. cichorii* et *P. syringae*, a été exploré. Ces souches produisent respectivement, en milieu liquide, la cichofactine et la cichorinotoxine et la syringafactine et la syringopeptine 25.

Dans un premier temps, l'activité phytotoxique des surnageants de culture bruts et semi-purifiés (concentrés 2 fois), de ces deux souches, a été évaluée *in planta*. Les signes de phytotoxicité (chlorose, nécrose, flétrissement et affalement des feuilles) ont été notés 1, 3, 7 et 10 jours après traitement des plants de blé. Des photographies prises 10 jours après traitement illustrent les résultats obtenus (**Figure 36**).

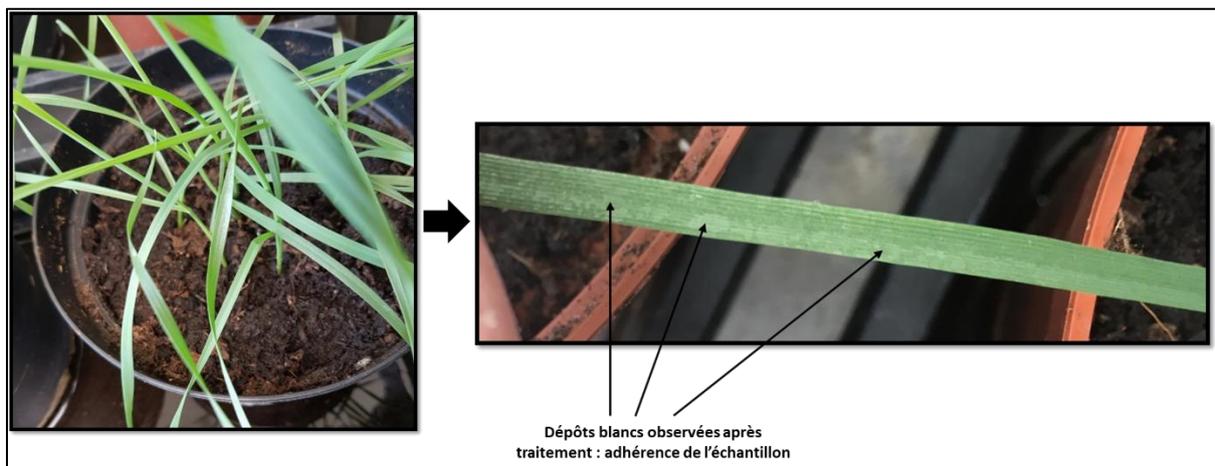


Figure 36 : Absence de phytotoxicité des surnageants de culture bruts et semi-purifiés (concentrés deux fois) des souches de *P. cichorii* et *P. syringae*, observée à 10 jours après traitement

Quelques heures après le traitement, des dépôts blancs ont été observés sur les feuilles de blé. Cela signifie qu'il y a bien eu adhérence des échantillons testés aux feuilles de blé. La présence de zones vertes, exemptes de dépôts blancs indiquent toutefois que la pulvérisation des échantillons ne s'est pas faite de manière homogène sur toute la surface de la feuille, malgré l'utilisation de Tween20 comme adjuvant. Un, 3, 7 et 10 jours après traitement, aucun signe de phytotoxicité (chlorose, nécrose, aspect général de la plante), n'a été observé. Aucune des molécules présentes dans les surnageants bruts et semi-purifiés, y compris les lipopeptides, ne sont donc phytotoxiques pour le blé aux concentrations testées.

Au premier abord, cette absence de phytotoxicité peut paraître surprenante dans la mesure où certains lipopeptides, contenus dans ces surnageants, sont connus pour leurs activités phytotoxiques ou appartiennent à des familles de lipopeptides réputées phytotoxiques. Il a en effet été montré que la cichorinotoxine de la famille des corpeptine causait des lésions nécrotiques au niveau des nervures centrales des feuilles de laitue (Komatsu et al. 2019) et que la syringopeptine 25A a une activité phytotoxique, notamment sur blé (Vassilev et al. 1996). Il est probable que la concentration en lipopeptides dans les surnageants de culture bruts et semi-purifiés soit inférieur au seuil nécessaire pour provoquer un effet phytotoxique. En ce sens, des exemples de la littérature ont montré que certaines souches de *P. syringae* pouvaient produire des lipopeptides considérés phytotoxiques sans provoquer de symptômes sur plantes. C'est le cas des souches non-pathogènes épiphytes productrices de syringomycine qui utilisent ce lipopeptide dans de faibles concentrations pour accéder aux métabolites végétaux sans provoquer de lésions nécrotiques (Lindow and Brandl 2003). Il a également été montré que la souche *P. syringae* M1, saprophyte du blé, produisait de la syringomycine et de la syringopeptine 25A sans altérer son hôte, ni au moment de la germination du blé, ni au cours de son développement (Adetuyi et al. 1995).

Dans la suite de cette partie, les tests de protection des plants de blé contre *Zymoseptoria tritici*, réalisés à partir des surnageants de culture et surnageants de culture semi-purifiés des souches de *P. cichorii* et *P. syringae*, seront présentés. Pour ces tests, les surnageants utilisés ont été produits à partir de cultures bactériennes en milieu SRM car 1) il est adapté à la production de lipopeptides et 2) il ne montre pas d'effets protecteurs du blé contre le champignon phytopathogène *Z. tritici*, contrairement au milieu TSB.

Plusieurs modalités ont été testées :

- Surnageants de culture purs et dilués au demi, au quart, au dixième
- Surnageants de culture semi-purifiés par ultrafiltration puis dilués de sorte à obtenir des concentrations identiques à celles des surnageants dilués au demi et au quart.

Les plants de blé (36 par modalité), préalablement traités avec les surnageants, ont été contaminés avec des spores de *Z. tritici*. Après 21 jours d'incubation, l'incidence de la septoriose a été évaluée en estimant la surface foliaire infectée par le champignon et la densité de pycnides (notée de 0 à 5) présents sur les feuilles, qui rend compte de la prolifération du champignon sous forme de spores. Des photographies illustrant la protection des feuilles de blé par les surnageants de culture sont présentées dans la **Figure 37**.

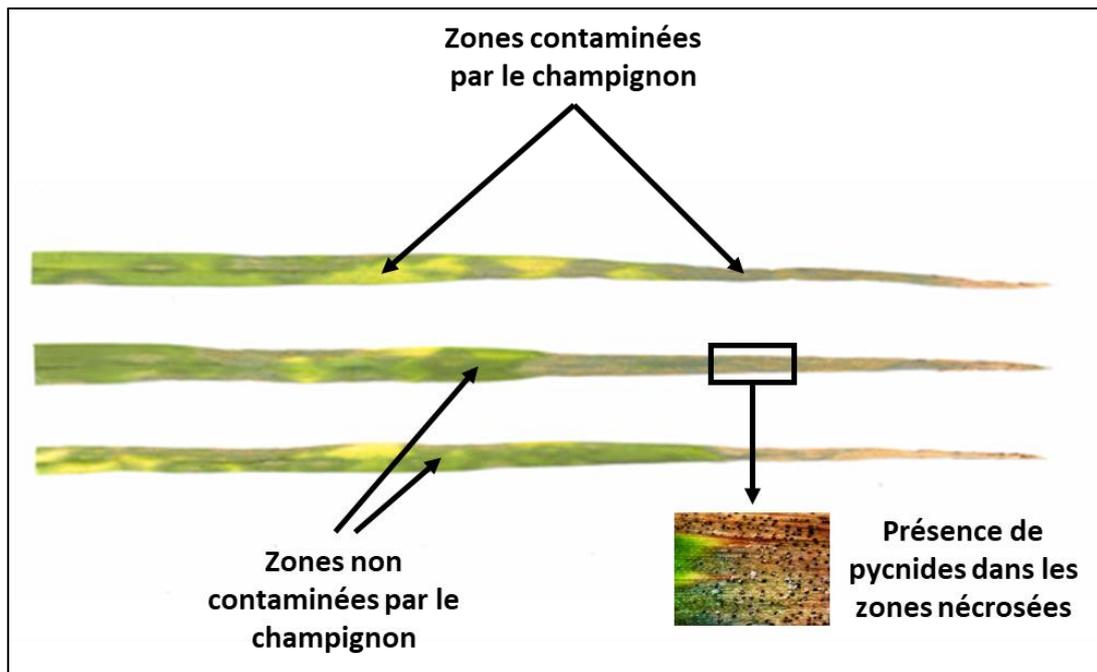


Figure 37 : Exemples de feuilles de blé protégées par un surnageant de culture

Les feuilles traitées avec les surnageants présentent une alternance de zones non contaminées (vertes, saines) et contaminées par le champignon (jaunes, chlorosées et marrons/grises, nécrosées, avec présence de pycnides). Comme nous le montrions pour les tests de phytotoxicité (voir ci-dessus), cela indique que les molécules antifongiques n'ont pas été réparties de manière homogène sur les feuilles lors de la pulvérisation et que leur adhérence n'est pas toujours optimale, malgré l'utilisation du Tween20. Des tests de formulation visant à déterminer quels adjuvants utiliser et leur concentration, permettraient de pallier ce problème et ainsi augmenter l'efficacité des molécules antifongiques.

L'ensemble des résultats obtenus lors des tests de protection sont présentés dans la **Figure 38** (estimation de la surface foliaire moyenne infectée) et la **Figure 39** (évaluation de la densité de pycnides). Pour chaque expérimentation, la significativité (notée *) des différences observées entre le témoin d'infection (non traité) et chaque modalité a été déterminée grâce au test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

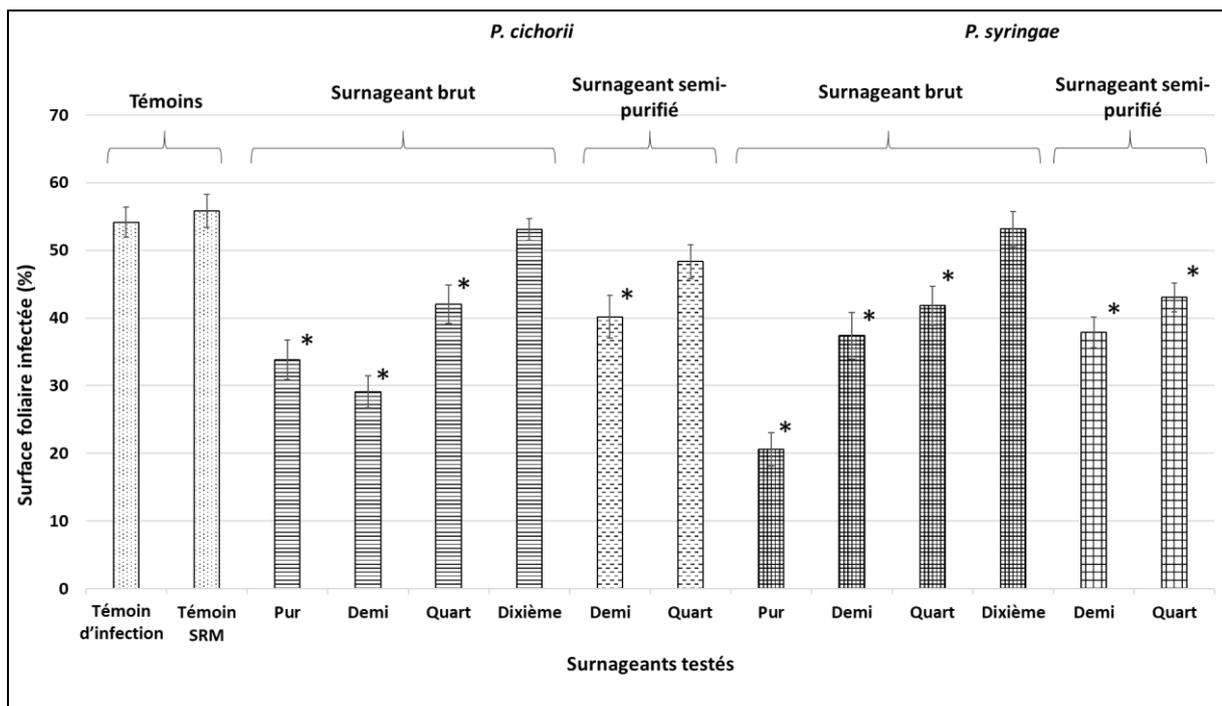


Figure 38 : Moyennes des surfaces foliaires infectées après traitement du blé avec les surnageants des souches de *P. cichorii* et *P. syringae*

* Différence significative par rapport au témoin d'infection ($p < 0.05$)

Le témoin infecté avec le champignon et non traité avec le surnageant (*i.e.* témoin d'infection) présente une surface foliaire moyenne infectée de 54,2%. L'absence d'effet protecteur lié au milieu de culture est vérifiée avec le témoin SRM qui présente une surface foliaire moyenne infectée de 55,9%, sensiblement identique au témoin d'infection.

Les surnageants de culture des deux souches ont tous deux montré un effet protecteur significatif des plants de blé contre la septoriose jusqu'à une dilution au quart ($p < 0,05$). L'incidence de la maladie varie entre 20,6% (soit 62% de protection) après traitement avec le surnageant brut de la souche de *P. syringae* et 42,1% (soit 22,3% de protection) après traitement avec le surnageant dilué au quart, de la souche de *P. cichorii*. Lorsque les surnageants sont dilués au 10^{ème}, la concentration en molécules antifongiques n'est en revanche plus suffisante pour obtenir une protection significative des plants de blé contre *Z. tritici*.

Une diminution des symptômes est également observée après traitement des plants de blé avec les surnageants semi-purifiés des deux souches. Pour *P. syringae*, l'effet est significatif aux concentrations demi et quart avec respectivement 37,9% et 43% d'infection correspondant à 30,1% et 20,7% de protection par rapport au témoin d'infection. Pour *P. cichorii*, l'effet protecteur a été observé uniquement avec le surnageant ultrafiltré testé au demi : 40,1%

d'infection soit 26% de protection. Rappelons que les surnageants semi-purifiés ont été obtenus après ultrafiltration des surnageants bruts dans le but de purifier les lipopeptides présents. Les activités protectrices observées sont donc certainement liées à la présence de ces molécules.

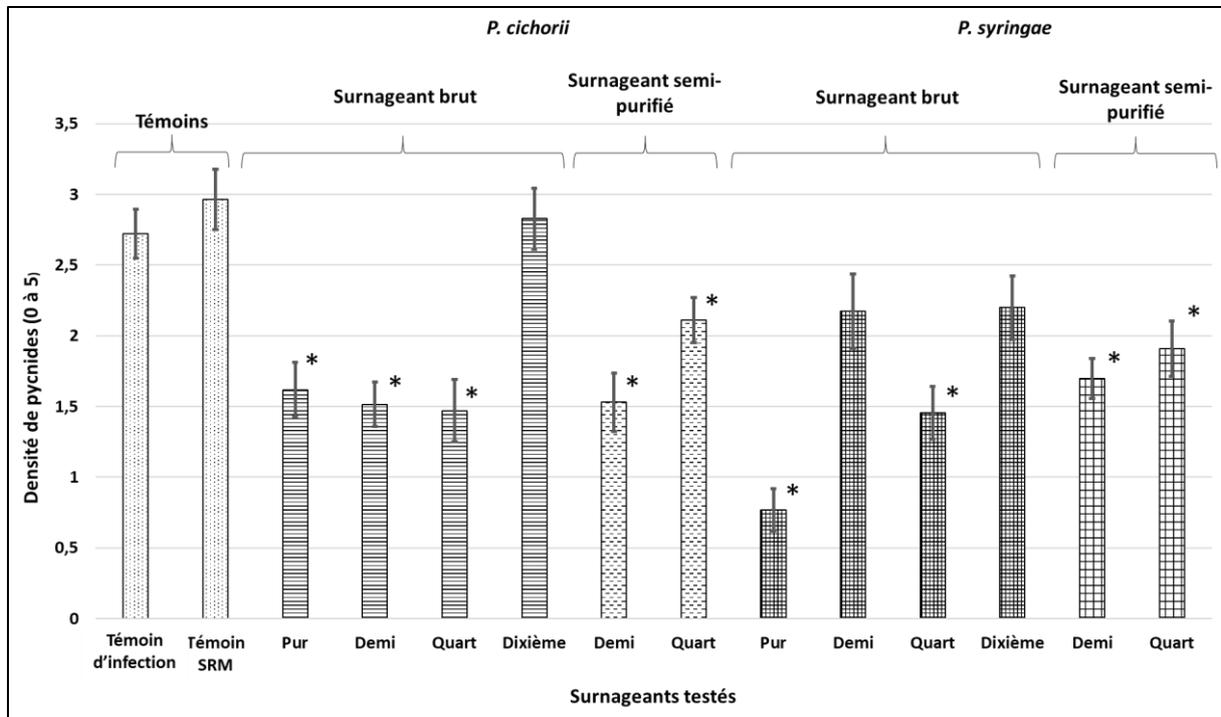


Figure 39 : Moyennes des densités de pycnides, notées de 0 à 5, observées sur les plants de blé après traitement avec les surnageants des souches de *P. cichorii* et *P. syringae*
 * Différence significative par rapport au témoin d'infection ($p < 0,05$)

La densité de pycnides de référence, observée pour le témoin d'infection est de 2,7. L'absence d'effet du milieu de culture sur la densité de pycnides est confirmée avec le témoin SRM (note de 3) (Figure 39).

Les surnageants de culture diminuent quant à eux significativement la sporulation du champignon ($p < 0,05$), jusqu'à la dilution au quart. La note varie entre 0,77 correspondant à une quasi-absence de pycnides, après traitement avec le surnageant pur de la souche de *P. syringae* et 1,62, après traitement avec le surnageant pur de la souche de *P. cichorii*.

Deux particularités peuvent être notées :

- Le surnageant de la souche de *P. syringae* dilué au demi ne réduit par la densité de pycnides de manière significative (note 2,2) alors que dilué au quart, la densité de pycnides est réduite à 1,45.
- Il ne semble pas avoir d'effet dose des molécules antifongiques pour le surnageant de la souche de *P. cichorii* puisque la densité de pycnides observée est sensiblement identique aux trois concentrations testées : 1,62 (pur), 1,52 (demi), 1,47 (quart).

A une dilution au 10^{ème}, les molécules antifongiques présentes dans les surnageants n'ont, en revanche plus d'impact sur la densité de pycnides.

Pour les deux souches, les surnageants ultrafiltrés, contenant les lipopeptides semi-purifiés, ont également montré une réduction significative de la densité de pycnides, par rapport au témoin d'infection, et ce, aux deux concentrations testées ($p < 0,05$). Les notes attribuées sont respectivement de 1,53 (demi) et 2,11 (quart) chez *P. cichorii* et 1,70 (demi) et 1,91 (quart) chez *P. syringae*.

Les résultats présentés ci-dessus ont donc montré que les surnageants de culture des souches étudiées étaient capables de réduire l'incidence de la septoriose par une diminution conjointe de la surface foliaire infectée et de la densité de pycnides, et ce, certainement par l'intermédiaire des lipopeptides.

Les points clés à retenir :

- *Les lipopeptides, présents dans les surnageants de culture, n'ont pas d'activité phytotoxique dans les concentrations testées*
- *Les surnageants de culture et surnageants de culture semi-purifiés contenant des lipopeptides ont un effet supprimeur de la septoriose du blé dû à la présence des lipopeptides jusqu'à 62% de protection par rapport au témoin d'infection*

Discussion générale

Diversité des lipopeptides produits

Les souches du complexe *P. syringae* sont depuis plusieurs décennies connues pour produire des lipopeptides de structures variables (Geudens and Martins 2018; Götze and Stallforth 2019). Néanmoins, peu de souches avaient jusqu'ici été analysées en profondeur pour déterminer l'étendue de la diversité structurale de ces molécules. Une question pouvait alors se poser : les lipopeptides identifiés représentaient-ils réellement la diversité structurale des lipopeptides de ce complexe bactérien ? Au cours de ce travail de thèse, nous avons tenté de répondre à cette question en analysant une large collection de souches du complexe *P. syringae*. Au total, 61 lipopeptides différents ont été identifiés, dont 23 parmi les 32 connus et 38 nouveaux, appartenant aux 5 familles décrites chez *P. syringae* : syringafactine, syringomycine, corpeptine, syringopeptine 22, syringopeptine 25. Parmi les 38 nouveaux lipopeptides, 18 sont identifiés comme des variants de sous-familles connues et 20 sont identifiés comme des variants de nouvelles sous-familles. Neuf nouvelles sous-familles en plus des 13 connues ont pu être mises en évidence : 1 chez les syringomycines, 2 chez les corpeptines, 2 chez les syringopeptines 22 et 4 chez les syringopeptines 25. Nos résultats ont donc montré une forte diversité structurale de lipopeptides produits par des souches appartenant au même groupe taxonomique. De manière intéressante, cette diversité est majoritairement observée pour les familles à longue chaîne d'acides aminés. Comme l'ont indiqué certains auteurs, en jouant sur les sources de carbone et d'acides aminés du milieu de culture, il serait même possible de favoriser la synthèse de nouveaux variants, augmentant ainsi la diversité observée (de Bruijn et al. 2008). Une telle diversité ouvre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation de nouvelles molécules pour diverses applications dont le biocontrôle.

Fréquence de production des lipopeptides

Au regard de cette grande diversité structurale de lipopeptides, il est intéressant de se demander quelle est la fréquence de production de ces différentes molécules. Nos travaux ont montré que 81,1% des souches étudiées produisent des lipopeptides mais que la production des différentes familles est très variable au sein du complexe *P. syringae*. Les lipopeptides de la famille des syringafactines sont les plus fréquemment produits. Au total, ils ont été détectés chez 77,3% des souches étudiées. Ces résultats sont particulièrement intéressants car aucune donnée de la littérature ne laissait envisager une si large production. En effet, ces lipopeptides avaient été détectés chez seulement une dizaine de souches (Berti et al. 2007; Pauwelyn et al. 2013; Burch

et al. 2014). Les lipopeptides de la famille des syringomycines, dont le représentant majoritaire est la sous-famille du même nom, sont également très fréquemment produits (48,5% des souches). Ces résultats sont moins surprenants car la production de syringomycines a été montrée chez de nombreuses souches de ce complexe bactérien notamment par l'intermédiaire du test visant à évaluer leur activité antifongique contre *Geotrichum candidum* (Xu and Gross 1988). Les syringopeptines 22 et 25 sont quant à elles produites par respectivement 27,5% et 20,7% des souches étudiées soit 48,2%, toutes syringopeptines confondues. Cette fréquence, presque similaire à celle des syringomycines n'est pas étonnante, plusieurs auteurs ayant déjà remarqué que la production de syringomycine était accompagnée de syringopeptine (Grgurina et al. 2005). De plus, à l'échelle du génome, il a été montré que les clusters de gènes codant pour ces familles de lipopeptides sont physiquement liés (Scholz-schroeder et al. 2001b). Les corpeptines, produites par seulement 1% des souches sont, quant à elles, très peu représentées. Notons enfin, que parmi les lipopeptides connus comme étant produits par des souches du complexe *P. syringae*, certains n'ont pas été détectés au cours de notre étude. Les masses des syringopeptines 22phVa et 22phVb, détectées chez *P. syringae* pv. *syringae* B728a, appartenant au clade 02d, n'ont été observées chez aucune des souches de ce clade ni chez aucune autre souche (Grgurina et al. 2002; Ravindran et al. 2015). De même les syringopeptines SC1 et SC2, produites par *P. syringae* pv. *syringae* SC1, dont le phylogroupe d'appartenance n'est pas connu, n'ont pas été détectées (Isogai et al. 1995). Cela pose la question suivante : ces lipopeptides sont-ils des exceptions, produits par des souches uniques ou bien sont-ils rarement produits, auquel cas il serait nécessaire d'étudier une collection de *P. syringae* encore plus grande pour les retrouver ? Les cichopectines A et B, décrites chez *P. cichorii* SF1-54, affiliée au phylogroupe 11 n'ont pas non plus été détectées mais cela est probablement dû au fait que seules deux bactéries de cette espèce étaient représentées dans notre étude (Huang et al. 2015). Une étude approfondie du phylogroupe 11 permettrait sans doute de détecter les cichopectines A et B voire de nouveaux lipopeptides structurellement similaires.

Relation entre lipopeptides produits et classification phylogénétique des souches

Au cours de ce travail, nous avons également voulu déterminer s'il existait un lien entre la production de lipopeptides et la classification phylogénétique des souches. Nos résultats ont montré que les souches productrices de lipopeptides sont réparties dans 8 des 13 phylogroupes référencés (01, 02, 05, 07, 08, 09, 10, 11). Dans ces phylogroupes, une corrélation entre les profils de production des souches et leur classification phylogénétique, a également été mise en évidence. Ainsi, 26% des souches ne produisant que des lipopeptides de la famille des

syringafactines sont retrouvées dans les clades 01a, 01b, 05, 07a, 07b, 09a, 09b, 09c, 10a et 10g. Les 41,2% de souches qui co-produisent trois familles de lipopeptides différentes à savoir syringafactine, syringomycine et l'une des trois familles à longue chaîne peptidique sont, quant à elles, retrouvées dans les phylogroupes et clades 02b, 02c, 02d, 02e, 10d, 10e, 10f (24,4% des souches produisant SF, SR et SP 22), 02b, 10b (15,8% des souches produisant SF, SR et SP 25) et 08, 11 (1% des souches produisant SF, SR et corpeptine). Cette production clade-dépendante n'avait jamais été mise en évidence auparavant car, d'une part, aucune étude n'avait jusqu'ici été réalisée sur un si grand nombre de souches et, d'autre part, dans certains clades, les souches n'avaient pas été étudiées pour la production de lipopeptides.

Relation entre activités antifongiques et lipopeptides produits

Ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer le potentiel de biocontrôle des souches du complexe *P. syringae*. Nous avons donc évalué les activités antifongiques de ces souches tout en étudiant la relation existante entre la production de lipopeptides et les activités antifongiques observées. Cette étude a montré que 22,3% des souches de la collection sont actives contre au moins l'un des trois champignons ciblés : *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Zymoseptoria tritici*. Un lien direct entre la synthèse de lipopeptides et l'activité antifongique des souches a été mise en évidence au cours de ce travail puisque 97,4% des souches actives ont montré la production de lipopeptides. Pour chaque champignon ciblé, plus de la moitié des souches antifongiques ont montré la co-production de lipopeptides appartenant à trois familles différentes de lipopeptides. Il est donc possible que les activités antifongiques observées soient amplifiées par une synergie entre les différents lipopeptides comme cela a été observé dans plusieurs études pour les lipopeptides de *Bacillus* (Maget-Dana et al. 1992; Romero et al. 2007; Mejri et al. 2017). Parmi les différents lipopeptides produits par les souches antifongiques, ceux appartenant à la famille des syringopeptines 25 sont particulièrement représentés. Ils sont en effet synthétisés par respectivement 54,6%, 52,8% et 74,8% des souches actives contre *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* et *Z. tritici*. Cela semble indiquer que ces lipopeptides jouent un rôle primordial dans les activités antifongiques observées. Ballio et al., 1995 ont montré que le caractère hydrophobe de la syringopeptine 25A, dépendant à la fois de l'acide gras et des acides aminés hydrophobes de la chaîne peptidique jouait un rôle crucial dans ses interactions avec les membranes biologiques (Ballio et al. 1995). Il est possible que les nouvelles syringopeptines 25CVB et 25TA, qui affichent 4 leucines contre 1 leucine pour la syringopeptine 25A, soient encore plus actives que cette dernière, à concentration égale. A travers ces résultats, le complexe

P. syringae s'est donc révélé être une source intéressante de souches actives dont les propriétés antifongiques proviennent certainement de la production de lipopeptides.

Relations entre lipopeptides produits et phytopathogénéité

Etant donné que nous avons des données issues de l'étude de Berge et al., (2014) sur la phytopathogénéité des souches, il nous a semblé intéressant de déterminer s'il existait une relation entre la production de lipopeptides et l'activité phytopathogène. Les résultats que nous avons obtenus ont montré qu'il n'y a pas de lien direct entre ces deux propriétés. En effet, les familles des syringomycines, des syringopeptines 22 et des syringopeptines 25, souvent présentées comme agents de virulence, sont produites par des souches non pathogènes. C'est le cas des souches des clades 02c et 10b, qui sont pour la plupart non phytopathogènes (Berge et al. 2014) et qui, pourtant, co-produisent des lipopeptides appartenant aux familles des syringomycines et des syringopeptines. Il est possible que ces souches utilisent ces lipopeptides dans d'autres buts, notamment la défense contre d'autres organismes et l'accès aux métabolites des végétaux sans en altérer leurs tissus (Lindow and Brandl 2003). A l'inverse, certaines souches connues comme étant phytopathogènes, notamment dans le phylogroupe 01 ne produisent pas ces lipopeptides.

Utilisation des souches du complexe *P. syringae* en biocontrôle

Le dernier objectif de ce travail a été de déterminer si les souches, grâce à leurs activités antifongiques pouvaient être utilisées comme agents de biocontrôle de la septoriose du blé, causée par *Z. tritici*. Un résultat particulièrement intéressant a été obtenu avec le surnageant brut d'une souche de *P. syringae* qui a généré un pourcentage de protection du blé de 62% par rapport au témoin d'infection. Ce niveau de protection remarquable est très proche de celui qui a été observé par Mejri et al., (2017) avec un mélange de mycosubtiline, surfactine et fengycine à 100mg/L (61% de protection), trois lipopeptides produits chez *Bacillus subtilis* et ce, dans des conditions similaires à celles suivies dans notre étude (cultivar Alixan utilisé, temps d'incubation, modalités de traitement, etc.). Outre la protection du blé, le surnageant brut de la souche de *P. syringae* a également entraîné une diminution de la densité de pycnides à 0,77 contre 2,7 pour le témoin d'infection, ce qui représente un avantage à long terme. En effet, cela permettrait de limiter l'incidence de la maladie dans les années qui suivent le traitement en évitant la contamination du blé par les pycnidiospores se trouvant dans les débris de la saison agricole précédente.

Les surnageants et surnageants ultrafiltrés des deux souches de *P. cichorii* et *P. syringae* étudiées ont également montré l'avantage de ne générer aucun effet phytotoxique sur blé. Toutefois, dans le contexte actuel, où il est de plus en plus question de mélanger les cultures, il est absolument nécessaire de vérifier que ces surnageants ou les lipopeptides purifiés, ne provoquent aucun effet phytotoxique sur des espèces végétales susceptibles d'être co-cultivées avec le blé (e.g. lentilles, autres céréales). Naturellement, leur utilisation comme agents de biocontrôle serait également conditionnée par l'absence de risque pour la santé humaine. En ce sens, une étude réalisée par Fiore et al., (2008) a révélé des résultats très encourageants indiquant que les lipopeptides produits par *P. syringae* ne présentaient pas de risque majeur pour la santé humaine. Les auteurs ont montré via une approche *in vitro*, que la syringomycine E, la syringopeptine 22A et la syringopeptine 25A étaient partiellement hydrolysées au cours de la digestion gastrointestinale induisant une diminution de leur activité hémolytique. Une étude approfondie sur la syringomycine E a également montré que ce lipopeptide n'était pas capable de traverser la barrière intestinale et ne serait donc pas retrouvé dans le système sanguin (Fiore et al. 2008a).

Enfin, il serait intéressant d'étudier le mode d'action des lipopeptides actifs *in planta*. Leur activité biocide directe, qui a été démontrée *in vitro*, pourrait être due à une prévention de la germination des spores voire à une lyse de ces structures fongiques. Il est également possible que ces lipopeptides se comportent aussi comme des éliciteurs des défenses des plantes. Cela n'a jamais été démontré pour des lipopeptides produits chez *P. syringae* mais c'est un phénomène connu pour d'autres lipopeptides de *Pseudomonas* comme le massetolide A produit par *P. fluorescens* SS101 (Tran et al. 2007) et certains lipopeptides de *Bacillus* comme la surfactine (Le Mire et al. 2018).

Conclusion et perspectives

Ce projet de thèse a permis d'éclaircir les connaissances sur la diversité structurale des lipopeptides produits au sein du complexe *P. syringae*, sur la fréquence de leur production et sur leur implication dans l'activité antifongique des souches étudiées.

Au total de ce ne sont pas moins de 61 lipopeptides, dont 38 jamais décrits auparavant, répartis dans cinq familles connues chez *P. syringae* (syringafactine, syringomycine, corpeptine, syringopeptine 22, syringopeptine 25) qui ont été identifiés et, pour la plupart, structurellement caractérisés. Voici brièvement les découvertes qui ont été faites au sein de chaque famille :

- Famille des syringafactines : les 6 variants connus de la sous-famille des syringafactines (A à F) ainsi que les 2 variants connus de la sous-famille des cichofactines (A et B) ont été mis en évidence chez les souches étudiées. Quatre nouveaux variants de cichofactine, différant au niveau du 6^{ème} acide aminé et de l'acide gras ont également été caractérisés, ils ont été nommés cichofactines A[Leu/Ile6], B[Leu/Ile6], C et D.
- Famille des syringomycines : des variants des sous-familles connues chez *P. syringae* (syringomycine, syringotoxine, syringostatine, pseudomycine) ont été identifiés chez les souches étudiées. Une nouvelle sous-famille, celle des syringosines, a été mise en évidence : elle possède 6 acides aminés en commun avec la sous-famille des syringomycines.

Au regard des résultats de bioinformatique et de spectrométrie de masse, les variants dans ces différentes sous-familles ne diffèrent qu'au niveau de l'acide gras : taille et nombre de groupement hydroxyles.

- Famille des corpeptines : Parmi les sous-familles déjà connues dans le complexe *P. syringae*, seule la cichorinotoxine a été identifiée. Deux nouvelles sous-familles nommées cichozeptines GAW et cichozeptines 83 ont été identifiées. Elles sont structurellement proches des cichozeptines A et B avec lesquelles elles diffèrent respectivement au niveau des acides aminés 5, 9, 10 et des acides aminés 4, 6, 7.
- Famille des syringopeptines 22 : Les sous-familles connues des syringopeptines 22 et 508 ont été identifiées chez les souches étudiées. Deux nouvelles sous-familles nommées syringopeptines 22CCV et 22CVB ont été caractérisées, elles diffèrent respectivement des syringopeptines 22 et 22phV au niveau du 18^{ème} acide aminé (Val à la place de dhAbu).

- Famille des syringopeptines 25 : En plus de la sous-famille connue des syringopeptines 25, 4 nouvelles sous-familles ont été caractérisées. Elles ont été nommées syringopeptines 25UB, 25TA, 25USA et 25CVB. Dans cette famille de lipopeptide les acides aminés sujets à modification sont situés aux positions 3, 6, 10, 12, 14, 20 et 21 de la chaîne peptidique.

Au total, la production de lipopeptides a été montrée pour 81,1% des souches de la collection, réparties dans les phylogroupes 01, 02, 05, 07, 08, 09, 10 et 11. Deux grands groupes de clades sont mis en évidence : ceux constitués de souches produisant exclusivement des lipopeptides de la famille des syringafactines (01a, 01b, 05, 07a, 07b, 09a, 09b, 09c, 10a, 10g) et ceux constitués de souches co-produisant des lipopeptides de 3 familles distinctes (02b, 02c, 02d, 02e, 08, 10b, 10d, 10f, 11). Ces dernières co-produisent des lipopeptides des familles des syringafactines, des syringomycines et de l'une des 3 familles à longue chaîne peptidique.

Le complexe *P. syringae* s'est avéré être un important réservoir de souches antifongiques puisque 22,3% des souches de la collection se sont montrées actives contre l'un des champignons ciblés. Ces souches sont retrouvées dans les phylogroupes 02b, 07a, 08, 10b, 10e et 11. Au cours de ce travail, plusieurs arguments ont également été apportés pour prouver que les lipopeptides étaient responsables des activités antifongiques observées : 1) ils sont produits par 97,3% des souches antifongiques, 2) ils sont retrouvés dans des surnageants de culture bruts et ultrafiltrés actifs.

Enfin, le potentiel de biocontrôle de la septoriose du blé, par les souches du complexe *P. syringae* a été montré au travers des surnageants de culture de deux souches. Ces surnageants n'ont pas montré d'effets phytotoxiques sur blé et ont montré un effet protecteur significatif contre le champignon jusqu'à une dilution au quart (jusqu'à 62% de protection par rapport au témoin d'infection).

Ces travaux de thèse, qui pourront être complétés par de nouvelles expériences, ont ouvert la voie sur de nouveaux axes de recherches.

Un premier axe de recherche se focalisera sur la compréhension des mécanismes d'action des lipopeptides antifongiques, en lien avec leur biodiversité structurale, largement mise en évidence au cours de la thèse.

Cela se traduira tout d'abord par une étude approfondie de l'activité antifongique des lipopeptides afin, notamment, de prouver leur implication dans les activités antifongiques identifiées. Cela pourra se faire de deux manières différentes :

- En construisant des mutants incapables de produire des lipopeptides, via l'interruption des gènes impliqués dans leur synthèse ou des mutants surproduisant des lipopeptides en modifiant les promoteurs et les gènes régulant leur production par les NRPSs. Il sera alors nécessaire de vérifier si ces mutants ont perdu leurs activités antifongiques ou si, au contraire, cette dernière est augmentée lorsque les lipopeptides sont surproduits.
- En purifiant les lipopeptides au moyen de méthodes chromatographiques (HPLC) puis en testant ces lipopeptides pour leurs activités antifongiques. Cela implique de parvenir à obtenir de grandes quantités de lipopeptides en 1) optimisant les conditions de culture (température, pH, milieu utilisé, aération, etc.) et en 2) cultivant les souches dans des volumes de milieu plus importants, notamment via l'utilisation de fermenteurs.

Les lipopeptides purifiés pourront, par ailleurs, être utilisés dans plusieurs buts :

- 1) Ils pourront être utilisés pour élucider leur structure complète au moyen de différentes méthodes telles que la RMN, notamment lorsqu'il n'était pas possible de faire la différence entre deux acides aminés de masses identiques tels que la leucine et l'isoleucine. La méthode de Marfey pourra également être utilisée pour confirmer ou infirmer les isoméries des monomères, prédites par bioinformatique.
- 2) Les nombreux lipopeptides antifongiques identifiés pourront être utilisés pour étudier la corrélation entre leur structure et leur fonction afin de déterminer quels sont les monomères clés, impliqués dans les activités biologiques de ces molécules.
- 3) Il sera également intéressant d'étudier l'activité élicitrice des lipopeptides. Pour cela il sera nécessaire de traiter des plants de blé ou toute autre culture d'intérêt, avec les lipopeptides purifiés et réaliser un suivi de l'expression des gènes de défense des plantes par qPCR. Cela permettra de distinguer les lipopeptides ayant un mode d'action direct

par déstabilisation et lyse des membranes fongiques, un mode d'action indirect par stimulation des défenses des végétaux ou une combinaison des deux modes d'action.

- 4) Les lipopeptides antifongiques pourront également être testés en combinaisons afin d'étudier leurs effets synergiques (activité antifongique plus importante, mode d'action direct et indirect cumulé).

S'appuyant sur les résultats ainsi obtenus, une étude approfondie sur l'application potentielle des lipopeptides de *P. syringae* en biocontrôle pourra être réalisée. Elle consistera notamment à :

- évaluer les activités phytotoxiques de ces molécules, à différentes concentrations, sur différentes cultures, notamment celles susceptibles d'être co-cultivées avec le blé
- à évaluer leur écotoxicité
- à travailler à la mise au point d'une formulation (adjuvants utilisés pour faciliter l'adhérence des lipopeptides sur feuilles, stabilité des lipopeptides, etc.) combinant potentiellement plusieurs lipopeptides.

Il sera alors peut-être possible, à terme, de proposer un produit formulé, efficace sur blé, voire sur d'autres cultures, et dont le rapport bénéfice/risque est élevé.

Enfin, la stratégie de criblage utilisée dans ce travail pourra être transposée à d'autres souches de *P. syringae*, voire d'autres espèces bactériennes afin de trouver de nouvelles souches et/ou molécules utilisables en biocontrôle.

Un deuxième axe de recherche s'attachera à étudier les origines de cette biodiversité structurale de lipopeptides chez *P. syringae* et son intérêt écologique pour les souches de ce complexe bactérien.

Pour engager ces recherches il sera impératif de compléter le travail d'exploration de la biodiversité structurale des lipopeptides chez *P. syringae* en élucidant les structures des 9 molécules ayant montré des différences de masses caractéristiques des lipopeptides (14 Da ou 28 Da) et qui pourraient représenter de nouvelles familles. Une analyse des profils de production des souches appartenant au clade 02f, récemment identifié, devra également être effectuée.

Pour identifier les origines de la biodiversité structurale des lipopeptides, il sera nécessaire d'étudier l'évolution des synthétases qui produisent ces molécules. Pour cela, les NRPSs ou les domaines enzymatiques qui les composent pourront être comparées via des alignements de

séquences génomiques ou protéiques. Cela permettra peut-être de retracer l'évolution de la spécificité des domaines A (duplication de domaines, transfert de domaines, etc.) et de comprendre pourquoi certains domaines A présentent une flexibilité leur permettant d'incorporer plusieurs acides aminés structurellement proches.

Il sera également opportun d'examiner l'intérêt d'une telle biodiversité pour les *P. syringae* d'un point de vue écologique. Permet-elle aux souches de s'adapter aux différents types d'environnements qu'elles rencontrent (aqueux, végétaux, neigeux, etc.) ? Permet-elle aux souches productrices de s'adapter à la composition en substrats des milieux dans lesquels elles se développent ? Permet-elle aux souches d'étayer leurs mécanismes de défenses face aux autres organismes ? Autant de questions auxquelles il sera intéressant d'apporter des réponses.

Pour aller plus loin, il sera possible de replacer la biodiversité structurale des lipopeptides de *Pseudomonas syringae* par rapport à l'ensemble des lipopeptides produits par le genre *Pseudomonas*.

Références bibliographiques

- Adetuyi, F. C., Isogai, A., Di Giorgio, D., Ballio, A., and Takemoto, J. Y. 1995. Saprophytic *Pseudomonas syringae* strain M1 of wheat produces cyclic lipodepsipeptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:63–67
- Agner, G., Kaulin, Y. A., Gurnev, P. A., Szabo, Z., Schagina, L. V., Takemoto, J. Y., and Blasko, K. 2000. Membrane-permeabilizing activities of cyclic lipodepsipeptides, syringopeptin 22A and syringomycin E from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in human red blood cells and bilayer lipid membranes. *Bioelectrochemistry.* 52:161–167
- Alfano, J. R., and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385–414
- Alippi, A. M., Perelló, A. E., Sisterna, M. N., Greco, N. M., and Cordo, C. A. 2000. Potential of spore-forming bacteria as biocontrol agents of wheat foliar diseases under laboratory and greenhouse conditions. *J. Plant Dis. Prot.* 107:155–169
- Arp, J., Götze, S., Mukherji, R., Mattern, D. J., García-Altres, M., Klapper, M., Brock, D. A., Brakhage, A. A., Strassmann, J. E., Queller, D. C., Bardl, B., Willing, K., Peschel, G., and Stallforth, P. 2018. Synergistic activity of cosecreted natural products from amoebae-associated bacteria. *PNAS.* 115:3758–3763
- ARVALIS. 2013. Septoriose - Maladie du blé tendre, blé dur, triticale. http://www.fiches.arvalis-infos.fr/fiche_accident/fiches_accidents.php?mode=fa&type_cul=1&type_acc=4&id_acc=46. Accessed May 24th 2019.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., and Smith, D. L. 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9
- Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., Elbaz, A., Gamet-Payraastre, Lebailly, P., Multigner, L., Rahmani, R., Spinosi, J., and van Maele-Fabry, G. 2013. *Pesticides : Effets sur la santé. [Rapport de recherche] Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM).*
- Balibar, C. J., Vaillancourt, F. H., and Walsh, C. T. 2005. Generation of D Amino Acid Residues in Assembly of Arthrofactin by Dual Condensation/Epimerization Domains. *Chem. Biol.* 12:1189–1200
- Balleza, D., Alessandrini, A., and Beltrán García, M. J. 2019. Role of Lipid Composition, Physicochemical Interactions, and Membrane Mechanics in the Molecular Actions of Microbial Cyclic Lipopeptides. *J. Membr. Biol.* 252:131–157
- Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Collina, A., Grgurina, I., Marino, G., Moneti, G., Paci, M., Pucci, P., Segre, A., and Simmaco, M. 1991. Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett.* 291:109–112
- Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Devay, J. E., Grgurina, I., Iacobellis, N. S., Marino, G., Pucci, P., Simmaco, M., and Surico, G. 1988. Multiple forms of Syringomycin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33:493–496

- Ballio, A., Bossa, F., Camoni, L., Di Giorgio, D., Flamand, M., Maraite, H., Nitti, G., Pucci, P., and Scaloni, A. 1996. Structure of fuscopeptins, phytotoxic metabolites of *Pseudomonas fuscovaginae*. FEBS Lett. 381:213–216
- Ballio, A., Bossa, F., Collina, A., Gallo, M., Iacobellis, N. S., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., and Simmaco, M. 1990. Structure of syringotoxin, a bioactive metabolite of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. FEBS Lett. 269:377–380
- Ballio, A., Bossa, F., Di Giorgio, D., Ferranti, P., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., and Strobel, G. A. 1994. Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: the pseudomycins. FEBS Lett. 355:96–100
- Ballio, A., Bossa, F., Di Giorgio, D., Di Nola, A., Manetti, C., Paci, M., Scaloni, A., and Segre, A. L. 1995. Solution conformation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25-A Two-dimensional NMR, distance geometry and molecular dynamics. Eur J Biochem. 234:747–758
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., and Pevzner, P. A. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J. Comput. Biol. 19:455–477
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., and Soulas, G. 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols Transformations et dissipation. Etude Gest. des Sols. 3:279–296
- Bellanger, X. 2009. Transfert, accrétion et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de *Streptococcus thermophilus* : un mécanisme clef de l'évolution bactérienne ? Thèse.
- Beltran-Garcia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafañá-Rojas, J., Martínez-Rodríguez, A., Yenova Chavez-Castrillon, Y., Espinosa-Escalante, F. M., Di Mascio, P., Ogura, T., and Beltran-Garcia, M. J. 2017. Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection. Pages 199–222 in: Fermentation Processes,
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:266–292
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., and Morris, C. E. 2014. A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. PLoS One. 9:e105547
- Berry, C., Dilantha Fernando, W. G., Loewen, P. C., and De Kievit, T. R. 2010. Lipopeptides are essential for *Pseudomonas* sp. DF41 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*. Biol. Control. 55:211–218
- Berry, C. L., Brassinga, A. K. C., Donald, L. J., Dilantha Fernando, W. G., Loewen, P. C., and de Kievit, T. R. 2012. Chemical and biological characterization of sclerosin, an antifungal lipopeptide. Can. J. Microbiol. 58:1027–1034
- Berti, A. D., Greve, N. J., Christensen, Q. H., and Thomas, M. G. 2007. Identification of a Biosynthetic Gene Cluster and the Six Associated Lipopeptides Involved in Swarming

- Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J. Bacteriol.* 189:6312–6323
- Binalf, L., and Shifa, H. 2018. Septoria Tritici Blotch (*Septoria tritici*) of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.): Effect and Management Options - A Review. *J. Nat. Sci. Res.* 8:45–54
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., and Weber, T. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* 47:81–87
- Brown, J. K. M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., and Saintenac, C. 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet. Biol.* 79:33–41
- de Bruijn, I., de Kock, M. J. D., de Waard, P., van Beek, T. A., and Raaijmakers, J. M. 2008. Massetolide A Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 190:2777–2789
- Bull, C. T., Wadsworth, M. L., Sorensen, K. N., Takemoto, J. Y., Austin, R. K., and Smilanick, J. L. 1998. Syringomycin E Produced by Biological Control Agents Controls Green Mold on Lemons. *Biol. Control.* 12:89–95
- Burch, A. Y., Zeisler, V., Yokota, K., Schreiber, L., and Lindow, S. E. 2014. The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environ. Microbiol.* 16:2086–2098
- Caboche, S., Pupin, M., Leclère, V., Fontaine, A., Jacques, P., and Kucherov, G. 2008. NORINE: A database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res.* 36:326–331
- Lo Cantore, P., Lazzaroni, S., Coraiola, M., Dalla Serra, M., Cafarchia, C., Evidente, A., and Iacobellis, N. S. 2006. Biological Characterization of White Line-Inducing Principle (WLIP) Produced by *Pseudomonas reactans* NCPPB1311. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1113–1120
- Caradec, T., Pupin, M., Vanvlassenbroeck, A., Devignes, M. D., Smaïl-Tabbone, M., Jacques, P., and Leclère, V. 2014. Prediction of Monomer Isomery in Florine: A Workflow Dedicated to Nonribosomal Peptide Discovery. *PLoS One.* 9:e85667
- Charbonnier, E. 2019. *Index acta biocontrôle, 3ème édition. Edition ACTA.*
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., and Moëgne-Loccoz, Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:505–512
- Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., and Dhulster, P. 2013. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. *Process Biochem.* 48:25–32
- Currier, T. C., and Morgan, M. K. 1983. Plasmids of *Pseudomonas syringae*: no evidence of a role in toxin production or pathogenicity. *Can. J. Microbiol.* 29:84–89
- D'aes, J., Kieu, N. P., Leclère, V., Tokarski, C., Eyiwumi Olorunleke, F., De Maeyer, K., Jacques, P., Höfte, M., and Ongena, M. 2014. To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environ. Microbiol.* 16:2282–300
- D'aes, J., de Maeyer, K., Pauwelyn, E., and Höfte, M. 2010. Biosurfactants in plant –

- Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environ. Microbiol. Rep.* 2:359–372
- Dong, H., Delaney, T. P., Bauer, D. W., and Beer, S. V. 1999. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant J.* 20:207–215
- Dubern, J.-F., Coppoolse, E. R., Stiekema, W. J., and Bloemberg, V. 2008. Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *Microbiology.* 154:2070–2083
- Dubern, J.-F., Lagendijk, E. L., Lugtenberg, B. J. J., and Bloemberg, G. V. 2005. The Heat Shock Genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* Are Involved in Regulation of Putisolvin Biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J. Bacteriol.* 187:5967–5976
- Emanuele, M. C., Scaloni, A., Lavermicocca, P., Jacobellis, N. S., Camoni, L., Di Giorgio, D., Pucci, P., Paci, M., Segre, A., and Ballio, A. 1998. Corpeptins, new bioactive lipodepsipeptides from cultures of *Pseudomonas corrugata*. *FEBS Lett.* 433:317–320
- Eyal, Z., Scharen, A. L., and Prescott, J. M. 1987. *The Septoria Diseases of Wheat Concepts and methods of disease management.*
- FAO. 2018. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize>. Accessed April 11th 2020.
- Feil, H., Feil, W. S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J. E., Lapidus, A., Detter, J. C., Land, M., Richardson, P. M., Kyrpides, N. C., Ivanova, N., and Lindow, S. E. 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *PNAS.* 102:11064–11069
- Figueroa, M., Hammond-Kosack, K. E., and Solomon, P. S. 2018. A review of wheat diseases — a field perspective. *Mol. Plant Pathol.* 19:1523–1536
- Finking, R., and Marahiel, M. A. 2004. Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:453–488
- Fiore, A., Laparra, J. M., Farrè, R., Fullone, M. R., Grgurina, I., Gallo, M., and Fogliano, V. 2008a. Lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae* Are Partially Proteolyzed and Are Not Absorbed by Humans: An In Vitro Study. *J. Food Prot.* 71:979–985
- Fiore, A., Mannina, L., Sobolev, A. P., Salzano, A. M., Scaloni, A., Grgurina, I., Fullone, M. R., Gallo, M., Swasey, C., Fogliano, V., and Takemoto, J. Y. 2008b. Bioactive lipopeptides of ice-nucleating snow bacterium *Pseudomonas syringae* strain 31R1. *FEMS Microbiol. Lett.* 286:158–165
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., and Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* 285:44–55
- Flaishman, M. A., Eyal, Z., Zilberstein, A., Voisard, C., and Hass, D. 1996. Suppression of Septoria tritici Blotch and Leaf Rust of Wheat by Recombinant Cyanide-Producing Strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:642–645
- Flaishman, M., Eyal, Z., Voisard, C., and Haas, D. 1990. Suppression of *Septoria tritici* by Phenazine- or Siderophore-deficient Mutants of *Pseudomonas*. *Curr. Microbiol.* 20:121–124

- Flissi, A., Ricart, E., Campart, C., Chevalier, M., Dufresne, Y., Michalik, J., Jacques, P., Flahaut, C., Lisacek, F., Leclère, V., and Pupin, M. 2020. Norine: update of the nonribosomal peptide resource. *Nucleic Acids Res.* 48:465–469
- Fogliano, V., Gallo, M., Vinale, F., Ritieni, A., Randazzo, G., Greco, M., Lops, R., and Graniti, A. 1999. Immunological detection of syringopeptins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:255–261
- Fones, H., and Gurr, S. 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* 79:3–7
- Fukuchi, N., Isogai, A., Yamashita, S., Suyama, K., Takemoto, J. Y., and Suzuki, A. 1990. Structure of phytotoxin syringomycin produced by a sugar cane isolate of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Tetrahedron Lett.* 31:1589–1592
- Gaignard, J., and Luisetti, J. 1993. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie.* 13:333–370
- Gerard, J., Lloyd, R., Barsby, T., Haden, P., Kelly, M. T., and Andersen, R. J. 1997. Massetolides A-H, Antimycobacterial Cyclic Depsipeptides Produced by Two *Pseudomonads* Isolated from Marine Habitats. *J. Nat. Prod.* 60:223–229
- Geudens, N., and Martins, J. C. 2018. Cyclic Lipodepsipeptides From *Pseudomonas* spp. – Biological Swiss-Army Knives. *Front. Microbiol.* 9
- Gevers, W., Kleinkauf, H., and Lipmann, F. 1968. The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 60:269–276
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-valdés, E., and Lalucat, J. 2017. Clarification of Taxonomic Status within the *Pseudomonas syringae* Species Group Based on a Phylogenomic Analysis. *Front. Microbiol.* 8
- Gonzalez, C. F., DeVay, J. E., and Wakeman, R. J. 1981. Syringotoxin : a phytotoxin unique to citrus isolates of *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plant Pathol.* 18:41–50
- Götze, S., Arp, J., Lackner, G., Zhang, S., Kries, H., Klapper, M., Garcia-Altare, M., Willing, K., Günther, M., and Stallforth, P. 2019. Structure elucidation of the syringafactin lipopeptides provides insight in the evolution of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Sci.* 10:10979–10990
- Götze, S., and Stallforth, P. 2019. Structure, properties, and biological functions of nonribosomal lipopeptides from pseudomonads. *Nat. Prod. Rep.* 37:29–54
- Grgurina, I., Bensaci, M., Pocsfalvi, G., Mannina, L., Cruciani, O., Fiore, A., Fogliano, V., Sorensen, K. N., and Takemoto, J. Y. 2005. Novel Cyclic Lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* Strain 508 and Syringopeptin Antimicrobial Activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:5037–5045
- Grgurina, I., and Mariotti, F. 1999. Biosynthetic origin of syringomycin and syringopeptin 22, toxic secondary metabolites of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett.* 462:151–154
- Grgurina, I., Mariotti, F., Fogliano, V., Gallo, M., Scaloni, A., Iacobellis, N. S., Lo Cantore, P., Mannina, L., van Axel Castelli, V., Luigia, M. L., and Graniti, A. 2002. A new syringopeptin produced by bean strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1597:81–89

- Gross, D. C. 1985. Regulation of syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production. *J. Appl. Bacteriol.* 58:167–174
- Gross, D. C., and DeVay, J. E. 1977. Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plant Pathol.* 11:13–28
- Gross, H., and Loper, J. E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26:1408–1446
- Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., and Gerwick, W. H. 2007. The Genom isotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters. *Chem. Biol.* 14:53–63
- Groupé, V., Pugh, L. H., Weiss, D., and Kochi, M. 1951. Observations on antiviral activity of viscosin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78:354–358
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C., and Grandi, G. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster - A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* 273:32857–32863
- Hall, S. J., Dry, I. B., Gopurenko, D., and Whitelaw-Weckert, M. A. 2019. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cool climate Australian grapevine vineyards: new phylogroup PG02f associated with bacterial inflorescence rot. *Plant Pathol.* 68:312–322
- Hansen, M., Thrane, C., Olsson, S., and Sørensen, J. 2000. Confocal imaging of living fungal hyphae challenged with the fungal antagonist viscosinamide. *Mycologia.* 92:216–221
- Harrison, L., Teplow, D. B., Rinaldi, M., and Strobel, M. 1991. Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 137:2857–2865
- Hernandez, M. N., and Lindow, S. E. 2019. *Pseudomonas syringae* Increases Water Availability in Leaf Microenvironments via Production of Hygroscopic Syringafactin. *Appl. Environ. Microbiol.* 84
- Hildebrand, P. D., Braun, P. G., McRae, K. B., and Lu, X. 1998. Role of the biosurfactant viscosin in broccoli head rot caused by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. plant Pathol.* 20:296–303
- Hirano, S. S., and Upper, C. D. 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* — a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624–653
- Hockett, K. L., Nishimura, M. T., Karlsrud, E., Dougherty, K., and Baltrus, D. A. 2014. *Pseudomonas syringae* CC1557: A Highly Virulent Strain With an Unusually Small Type III Effector Repertoire That Includes a Novel Effector. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 27:923–932
- Huang, C., Pauwelyn, E., Ongena, M., Debois, D., Leclère, V., Jacques, P., Bleyaert, P., and Höfte, M. 2015. Characterization of Cicho-peptides, New Phytotoxic Cyclic Lipopeptides Produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 and Their Role in Bacterial Midrib Rot Disease of Lettuce. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:1009–1022
- Hutchison, M. L., and Gross, D. C. 1997. Lipopeptide Phytotoxins Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: Comparison of the Biosurfactant and Ion Channel-Forming Activities of Syringopeptin and Syringomycin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:347–354

- IBMA. 2019. *Biocontrôle : + 24 % en 2018. Communiqué de presse.*
- Isogai, A., Fukuchi, N., Yamashita, S., Suyama, K., and Suzuki, A. 1989. Syringostatins, Novel Phytotoxins Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Agric. Biol. Chem.* 53:3117–3119
- Isogai, A., Iguchi, H., Nakayama, J., Kusai, A., Takemoto, J. Y., and Suzuki, A. 1995. Structural Analysis of New Syringopeptins by Tandem Mass Spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:1374–1376
- ITAB-ONEMA. 2013. *Guide pédagogique “Procédures règlementaires applicables aux produits de biocontrôle.”*
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T., and Krasowska, A. 2010. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour. Technol.* 101:6118–6123
- Janisiewicz, W. J., and Jeffers, S. N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Prot.* 16:629–633
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444:323–329
- Kaulin, Y. A., Takemoto, J. Y., Schagina, L. V., Ostroumova, O. S., Wangspa, R., Teeter, J. H., and Brand, J. G. 2005. Sphingolipids influence the sensitivity of lipid bilayers to fungicide, syringomycin E. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37:339–348
- Kawasaki, Y., Nischwitz, C., Grilley, M. M., Jones, J., Brown, J. D., and Takemoto, J. Y. 2016. Production and Application of Syringomycin E as an Organic Fungicide Seed Protectant against *Pythium* Damping-off. *J. Phytopathol.* 164:801–810
- Kema, G. H. J., Yu, D., Rijkenberg, H. J., Shaw, M. W., and Baayen, R. P. 1996. Histology of the Pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in Wheat. *Biochem. Cell Biol.* 86:777–786
- Kildea, S., Ransbotyn, V., Khan, M. R., Fagan, B., Leonard, G., Mullins, E., and Doohan, F. M. 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. *Biol. Control.* 47:37–45
- Komatsu, H., Shirakawa, T., Uchiyama, T., and Hoshino, T. 2019. Chemical structure of cichorinotoxin, a cyclic lipodepsipeptide that is produced by *Pseudomonas cichorii* and causes varnish spots on lettuce. *J. Org. Chem.* 15:299–309
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Pickford, R., Derrick, J. P., Lamers, G. E. M., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., and Bloemberg, G. V. 2004. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.* 51:97–113
- Lavermicocca, P., Sante Iacobellis, N., Simmaco, M., and Graniti, A. 1997. Biological properties and spectrum of activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:129–140
- Laycock, M. V., Hildebrand, P. D., Thibault, P., Walter, J. A., and Wright, J. L. C. 1991. Viscosin, a Potent Peptidolipid Biosurfactant and Phytopathogenic Mediator Produced by a Pectolytic Strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Agric. Food Chem.* 39:483–489

- Levy, E., Eyal, Z., Carmely, S., Kashman, Y., and Chet, I. 1989. Suppression of *Septoria tritici* and *Puccinia recondita* of wheat by an antibiotic-producing fluorescent pseudomonad. *Plant Pathol.* 38:564–570
- Levy, E., Eyal, Z., and Chet, I. 1988. Suppression of septoria tritici blotch and leaf rust on wheat seedling leaves by pseudomonads. *Plant Pathol.* 37:551–557
- Levy, E., Gough, F. J., Berlin, K. D., Guiana, P. W., and Smith, J. T. 1992. Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. *Plant Pathol.* 41:335–341
- Li, W., Rokni-zadeh, H., De Vleeschouwer, M., Ghequire, M. G. K., Sinnaeve, D., Xie, G.-L., Rozenski, J., Madder, A., Martins, J. C., and De Mot, R. 2013. The Antimicrobial Compound Xantholysin Defines a New Group of *Pseudomonas* Cyclic Lipopeptides. *PLoS One.* 8:e62946
- Lindow, S. E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21:363–384
- Lindow, S. E., and Brandl, M. T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1875–1883
- Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H., and Roskoski, R. 1971. Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35:1–34
- De Lucca, A. J., Jacks, T. J., Takemoto, J., Vinyard, B., Peter, J., Navarro, E., and Walsh, T. J. 1999. Fungal lethality, binding, and cytotoxicity of syringomycin-E. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:371–373
- Lynch, K. M., Zannini, E., Guo, J., Axel, C., Arendt, E. K., Kildea, S., and Coffey, A. 2016. Control of *Zymoseptoria tritici* cause of septoria tritici blotch of wheat using antifungal *Lactobacillus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 121:485–94
- Ma, Z., Geudens, N., Kieu, N. P., Sinnaeve, D., Ongena, M., Martins, J. C., and Höfte, M. 2016. Biosynthesis, Chemical Structure, and Structure-Activity Relationship of Orfamide Lipopeptides Produced by *Pseudomonas protegens* and Related Species. *Front. Microbiol.* 7:382
- Magboul, A. M., Geng, S., Gilchrist, D. G., and Jackson, L. F. 1992. Environmental Influence of the Infection of Wheat by *Mycosphaerella graminicola*. *Ecol. Epidemiol.* 82:1407–1413
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., and Ptak, M. 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie.* 74:1047–1051
- Mamy, L., Barriuso, E., and Gabrielle, B. 2008. Evaluer les risques environnementaux des pesticides. *Innov. Agron.* 3:121–143
- Mejri, S., Siah, A., Coutte, F., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Tisserant, B., Krier, F., Jacques, P., Reignault, P., and Halama, P. 2017. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25:29822–29833
- Michelsen, C. F., Watrous, J., Glaring, M. A., Kersten, R., Koyama, N., Dorrestein, P. C., and Stougaard, P. 2015. Nonribosomal Peptides, Key Biocontrol Components for

Pseudomonas fluorescens In5, Isolated from a Greenlandic Suppressive Soil. MBio. 6

- Le Mire, G., Siah, A., Brisset, M., Gaucher, M., Deleu, M., and Jijakli, M. H. 2018. Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses. *Agriculture*. 8:1–14
- Mnif, I., and Ghribi, D. 2015. Lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers*. 104:129–147
- Molina-Santiago, C., Udaondo, Z., Daddaoua, A., Roca, A., Martín, J., Pérez-Victoria, I., Reyes, F., and Ramos, J. L. 2015. Efflux pump-deficient mutants as a platform to search for microbes that produce antibiotics. *Microb. Biotechnol.* 8:716–725
- Monti, S. M., Gallo, M., Ferracane, R., Borrelli, R. C., Ritieni, A., Greco, M. L., Graniti, A., and Fogliano, V. 2001. Analysis of bacterial lipodepsipeptides by matrix- assisted laser desorption/ionisation time-of-flight and high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15:623–628
- Morris, C. E., Monteil, C. L., and Berge, O. 2013. The Life History of *Pseudomonas syringae*: Linking Agriculture to Earth System Processes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:85–104
- Nguyen, D. D., Melnik, A. V., Koyama, N., Lu, X., Schorn, M., Fang, J., Aguinaldo, K., Ghequire, M. G. K., Carrion, V. J., Cheng, T. L., Duggan, B. M., Malone, J. G., Mauchline, T. H., Sanchez, L. M., Kilpatrick, A. M., Raaijmakers, J. M., De Mot, R., Moore, B. S., Medema, M. H., Dorrestein, P. C., Spectrometry, M., Group, B., Genetics, P., Biology, E., Cruz, S., Diego, C. S., Centre, J. I., Kingdom, U., Anglia, E., Kingdom, U., Common, W., and Kingdom, U. 2016. Indexing the *Pseudomonas* specialized metabolome enabled the discovery of poeamide B and the bananamides. *Nat. Microbiol.* 2:16197
- Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Johnstone, K., and Williams, D. H. 1991. Structure Determination of Tolaasin, an Extracellular Lipodepsipeptide Produced by the Mushroom Pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113:2621–2627
- Ongena, M., and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16:115–125
- Palleroni, N. J. 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., and Elphinstone, J. 2011. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathol.* 60:338–344
- Pauwelyn, E., Huang, C., Ongena, M., Leclère, V., Jacques, P., Bleyaert, P., Budzikiewicz, H., Schäfer, M., and Höfte, M. 2013. New Linear Lipopeptides Produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 Are Involved in Virulence, Swarming Motility, and Biofilm Formation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:585–598
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., and Velázquez, E. 2009. Evolution Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.* 9:1132–1147
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., and Velázquez, E. 2018. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect. Genet. Evol.* 57:106–116
- Penner, D., DeVay, J. E., and Backman, P. 1969. The Influence of Syringomycin on Ribonucleic Acid Synthesis. *Plant Physiol.* 44:806–808

- Perelló, A. E., Moreno, M. V., Mónaco, C., Simón, M. R., and Cordo, C. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp . under field conditions in Argentina. *BioControl*. 54:113–122
- Phillips McDougall. 2018. *Evolution of the Crop Protection Industry since 1960*.
- Ponomarenko, A., Goodwin, S. B., and Kema, G. H. . 2011. *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat.
<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/Septoria.aspx>.
 Accessed March 17th 2019.
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., and de Kock, M. J. D. 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant. Microbe. Interact*. 19:699–710
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., and Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas* : more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Rev*. 34:1037–1062
- Ravindran, A., Jalan, N., Yuan, J. S., Wang, N., and Gross, D. C. 2015. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pv . *syringae* strains B301D and HS191 and insights into intrapathovar traits associated with plant pathogenesis. *Microbiologyopen*. 4:553–573
- Richardt, A., Kemme, T., Wagner, S., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., and Hovemann, B. T. 2003. Ebony, a Novel Nonribosomal Peptide Synthetase for Beta-Alanine Conjugation with Biogenic Amines in *Drosophila*. *J. Biol. Chem*. 278:41160–41166
- Risse, D., Beiderbeck, H., Taraz, K., Budzikiewicz, H., and Gustine, D. 1998. Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci*. 53:295–304
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., and Pérez-garcía, A. 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 20:430–440
- Ron, E. Z., and Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol*. 3:229–236
- Roongsawang, N., Washio, K., and Morikawa, M. 2011. Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci*. 12:141–172
- Roongsawang, N., Washio, K., and Morikawa, M. 2007. In vivo characterization of tandem C-terminal thioesterase domains in arthrofactin synthetase. *ChemBioChem*. 8:501–512
- Röttig, M., Medema, M. H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C., and Kohlbacher, O. 2011. NRPSpredictor2 - A web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res*. 39:362–367
- Samain, E., van Tuinen, D., Jeandet, P., Aussenac, T., and Selim, S. 2017. Biological control of *Septoria* leaf blotch and growth promotion in wheat by *Paenibacillus* sp. strain B2 and *Curtobacterium plantarum* strain EDS. *Biol. Control*. 114:87–96
- Sarkar, S. F., Gordon, J. S., Martin, G. B., and Guttman, D. S. 2006. Comparative Genomics of Host-Specific Virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genet. Soc. Am*. 174:1041–1056

- Sarkar, S. F., and Guttman, D. S. 2004. Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1999–2012
- Scaloni, A., Camoni, L., Di Giorgio, D., Scortichini, M., Cozzolino, R., and Ballio, A. 1997. A new syringopeptin produced by a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain isolated from diseased twigs of laurel. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51:259–264
- Scaloni, A., Dalla Serra, M., Amodeo, P., Mannina, L., Vitale, R. M., Segre, A. L., Cruciani, O., Lodovichetti, F., Greco, M. L., Fiore, A., Gallo, M., D’Ambrosio, C., Coraiola, M., Menestrina, G., Graniti, A., and Fogliano, V. 2004. Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: cormycin A. *Biochem. J.* 384:25–36
- Scholz-schroeder, B. K., Hutchison, M. L., Grgurina, I., and Gross, D. C. 2001a. The Contribution of Syringopeptin and Syringomycin to Virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the Basis of *sypA* and *syrB1* Biosynthesis Mutant Analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:336–348
- Scholz-schroeder, B. K., Soule, J. D., Lu, S., Grgurina, I., and Gross, D. C. 2001b. A physical map of the Syringomycin and Syringopeptin Gene Clusters Localized to an Approximately 145-kb DNA Region of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Strain B301D. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14:1426–1435
- Segre, A., Bachmann, R. C., Ballio, A., Bossa, F., Grgurina, I., Iacobellis, N. S., Marino, G., Pucci, P., Simmaco, M., and Takemoto, J. Y. 1989. The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett.* 255:27–31
- Shou, Q., Feng, L., Long, Y., Han, J., Nunnery, J. K., Powell, D. H., and Butcher, R. A. 2016. A hybrid polyketide-nonribosomal peptide in nematodes that promotes larval survival. *Nat. Chem. Biol.* 12:770–772
- Sinden, S. L., DeVay, J. E., and Backman, P. A. 1971. Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*, and its role in the bacterial canker disease of peach trees. *Physiol. Plant Pathol.* 1:199–213
- Singh, G. M., Fortin, P., Koglin, A., and Walsh, C. T. 2008. Beta hydroxylation of the aspartyl residue in the phytotoxin syringomycin E: characterization of two candidate hydroxylases AspH and SyrP in *Pseudomonas syringae*. *Biochemistry.* 47:11310–11320
- Singh, G. M., Vaillancourt, F. H., Yin, J., and Walsh, C. T. 2007. Characterization of SyrC, an Aminoacyltransferase Shuttling Threonyl and Chlorothreonyl Residues in the Syringomycin Biosynthetic Assembly Line. *Chem. Biol.* 14:31–40
- Sørensen, D., Nielsen, T. H., Christophersen, C., Sørensen, J., and Gajhede, M. 2001. Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Cryst. Struct. Commun.* 57:1123–1124
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6:493–505
- Steinberg, G. 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genet. Biol.* 79:17–23
- Stocco, M., Mansilla, A. Y., Mónaco, C. I., Segarra, C., Lampugnani, G., Abramoff, C., Marchetti, M. F., Kripelz, N., Cordo, C. C., and Consolo, V. F. 2015. Native isolates of

- Trichoderma harzianum* inducing resistance to *Zymoseptoria tritici* on wheat plants. *Bol. la Soc. Argentina Bot.* 50:291–301
- Stockwell, V. O., and Stack, J. P. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for Integrated Biological Control. *Phytopathology.* 97:244–249
- Strano, C. P., Bella, P., Licciardello, G., Fiore, A., Lo Piero, A. R., Fogliano, V., Venturi, V., and Catara, V. 2015. *Pseudomonas corrugata* crpCDE is part of the cyclic lipopeptide corpeptin biosynthetic gene cluster and is involved in bacterial virulence in tomato and in hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* 16:495–506
- Süssmuth, R. D., and Mainz, A. 2017. Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 56:3770–3821
- Thrane, C., Nielsen, T. H., Nielsen, M. N., Sørensen, J., and Olsson, S. 2000. Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33:139–146
- Torriani, S. F. F., Melichar, J. P. E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., and Courbot, M. 2015. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet. Biol.* 79:8–12
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., and Raaijmakers, J. M. 2007. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.* 175:731–742
- Vaillancourt, H., Yin, J., and Walsh, C. T. 2005. SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme Fe II α -ketoglutarate- and O₂-dependent halogenase. *PNAS.* 102:10111–10116
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Péchy-Tarr, M., Cosson, P., Keel, C., Caroff, M., and Lemaitre, B. 2010. Association of Hemolytic Activity of *Pseudomonas entomophila*, a Versatile Soil Bacterium, with Cyclic Lipopeptide Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:910–921
- Vassilev, V., Lavermicocca, P., Di Giorgio, D., and Iacobellis, N. S. 1996. Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Plant Pathol.* 45:316–322
- Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., and Dorey, S. 2010. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. *Int. J. Mol. Sci.* 11:5095–5108
- Van Der Voort, M., Meijer, H. J. G., Schmidt, Y., Watrous, J., Dekkers, E., Mendes, R., Dorrestein, P. C., Gross, H., and Raaijmakers, J. M. 2015. Genome mining and metabolic profiling of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. SH-C52 for antimicrobial compounds. *Front. Microbiol.* 6
- Weckermann, R., Fürbaß, R., and Marahiel, M. A. 1988. Complete nucleotide sequence of the *tycA* gene coding the tyrocidine synthetase 1 from *Bacillus brevis*. *Nucleic Acids Res.* 16:11841
- Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology.* 97:250–256
- te Welscher, Y. M., Napel, H. H., Masià Balagué, M., Souza, C. M., Riezman, H., Kruijff, B. De, and Breukink, E. 2008. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to

- Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *J. Biol. Chem.* 283:6393–6401
- Williamson, S. M., Guzmán, M., Marin, D. H., Anas, O., Jin, X., and Sutton, T. B. 2008. Evaluation of *Pseudomonas syringae* strain ESC-11 for biocontrol of crown rot and anthracnose of banana. *Biol. Control.* 46:279–286
- Winnick, R. E., Lis, H., and Winnick, T. 1961. Biosynthesis of gramicidin S I. General characteristics of the process in growing cultures of *Bacillus brevis*. *BBA - Biochim. Biophys. Acta.* 49:451–462
- Woo, S., Fogliano, V., Scala, F., and Lorito, M. 2002. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81:353–356
- Xin, X., Kvitko, B., and He, S. Y. 2018. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:316–328
- Xu, G., and Gross, D. C. 1988. Evaluation of the Role of Syringomycin in Plant Pathogenesis by Using Tn5 Mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Defective in Syringomycin Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1345–1353
- Yu, S., Teng, C., Liang, J., Song, T., Dong, L., Bai, X., Jin, Y., and Qu, J. 2017. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. *J. Microbiol.* 55:877–884
- Zachow, C., Jahanshah, G., de Bruijn, I., Song, C., Ianni, F., Pataj, Z., Gerhardt, H., Pianet, I., Lämmerhofer, M., Berg, G., Gross, H., and Raaijmakers, J. M. 2015. The Novel Lipopeptide Poaeamide of the Endophyte *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 Is Involved in Pathogen Suppression and Root Colonization. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 28:800–810
- Zhao, H., Liu, Y., and Zhang, L. 2019. In silico and Genetic Analyses of Cyclic Lipopeptide Synthetic Gene Clusters in *Pseudomonas* sp. 11K1. *Front. Microbiol.* 10
- Ziemert, N., Podell, S., Penn, K., Badger, J. H., Allen, E., and Jensen, P. R. 2012. The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A Phylogeny Based Bioinformatic Tool to Classify Secondary Metabolite Gene Diversity. *PLoS One.* 7:e34064

Communications scientifiques

Communications orales

- Bricout A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chataigné G., Lecouturier D., Jacques P., Leclère V., Rochex A. (2020). Deciphering the structural diversity of lipopeptides produced by strains of the *P. syringae* complex. *P. syringae* online conference, june 16, 2020, Akureyri, Iceland
- Bricout A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chataigné G., Siah A., Lecouturier D., Jacques P., Leclère V., Rochex A. (2019). Screening of *Pseudomonas* sp. strains for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. 14th IUPAC International Congress of Crop Protection Chemistry, may 19-24, 2019, Ghent, Belgium
- Bricout A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chataigné G., Siah A., Lecouturier D., Jacques P., Leclère V., Rochex A. (2019). Stratégies de criblage pour la découverte et la caractérisation de lipopeptides antifongiques utilisables comme agents de biocontrôle. Conférences autour du Biocontrôle, 4 Avril 2019, Reims, France
- Bricout A. (2018). Recherche de molécules d'origine naturelle, les lipopeptides, pour lutter contre les maladies des grandes cultures causées par les champignons. Journées Doctorants ADEME, 15-16 Mars 2018, Nice, France
- Bricout A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chataigné G., Jacques P., Leclère V., Rochex A. (2018). Développement de stratégies de criblage pour la recherche de lipopeptides antifongiques utilisables comme biopesticides. Journées Jeunes Chercheurs Condorcet, 18-19 Janvier 2018, Amiens, France

Posters scientifiques

- Bricout A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chataigné G., Siah A., Jacques P., Leclère V., Rochex A. (2018). Screening strategies for discovery and characterization of antifungal lipopeptides usable as biocontrol agents. 4th international congress Natural Products and Biocontrol, 25-28 septembre 2018, Perpignan, France
- Bricout A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chataigné G., Lecouturier D., Jacques P., Leclère V., Rochex A. (2018). Screening strategies for the discovery of new antifungal lipopeptides usable as biocontrol agents. Smartbiocontrol Symposium, January 24, 2018, Ghent, Belgium
- Bricout A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chandeysson C., Chataigné G., Arnauld S., Lecouturier D., Jacques P., Leclère V., Rochex A. (2017). Research for new antifungal lipopeptides usable as biopesticides, by screening a *Pseudomonas* strain collection. 13ème congrès national de la SFM, 9-11 octobre 2017, Paris, France
- Bricout A., Rochex A., Morris C.E., Bardin M., Nicot P., Chandeysson C., Lecouturier D., Chataigné G., Arnauld S., Boistel C., Chollet M., Krier F., Randoux B., Reignault P., Siah A., Halama P., Jacques P., Leclère V. (2017). Recherche de nouveaux lipopeptides à activité antifongique utilisables comme biopesticides, par criblage d'une collection de bactéries du genre *Pseudomonas*. Journées Condorcet, 8-9 juin 2017, Villeneuve d'Ascq, France
- Bricout A. (2017). Recherche, caractérisation et production de nouveaux lipopeptides à activité antifongique utilisables comme biopesticides, par criblage d'une collection de bactéries *Pseudomonas*. Journées Doctorants ADEME, 14-15 mars 2017, Angers, France