

---

## Thèse en cotutelle

Présentée par Sarra YOUSFI

Pour l'obtention du titre de :

Docteur de l'Université de Sfax en Sciences Biologiques,  
Docteur de l'Université de Lille en Aspects moléculaires et  
cellulaires de la biologie

---

# Etude du potentiel biopesticide des lipopeptides, des polykétides et de la bacilysine dans la lutte contre la maladie de la galle du collet

---

Soutenance le 06 juin 2024 devant le Jury composé de :

|                                    |   |                         |
|------------------------------------|---|-------------------------|
| <b>Lotfi Feki</b>                  | Pr, Univ. Sfax, Tunisie                 | <b>Président</b>        |
| <b>Anissa Lounes-Hadj Sahraoui</b> | Pr, Univ. Littoral Côte d'Opale, France | <b>Rapportrice</b>      |
| <b>Balkiss Bouhaouala-Zahar</b>    | Pr, Univ. Tunis El Manar, Tunisie       | <b>Rapportrice</b>      |
| <b>Essaïd Ait Barka</b>            | Pr, Univ. Reims, France                 | <b>Examineur</b>        |
| <b>François Coutte</b>             | MCF, HDR, Univ. Lille, France           | <b>Directeur</b>        |
| <b>Olfa Frikha-Gargouri</b>        | MCF, Univ, Sfax, Tunisie                | <b>Directrice</b>       |
| <b>François Krier</b>              | MCF, Univ. Lille, France                | <b>Invité-encadrant</b> |

Année Universitaire : 2023/2024



*« Les batailles de la vie ne sont pas gagnées par les plus forts, ni par les plus rapides, mais par ceux qui n'abandonnent jamais »*

*Hassan II*

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à l'esprit de mon père, dont la sagesse et l'amour continuent de guider mes pas.*

*Ta mémoire inspire chaque mot de ce travail.*

*Au tout début de cette aventure, tes encouragements m'ont toujours incité à surmonter les moments difficiles pour aller jusqu'au bout. Puis, dans le silence de ta présence, j'entends ta voix résonner : « Sur le chemin de la quête du savoir, mille épreuves se présentent, mais tous ceux qui persévèrent finissent par atteindre leur objectif ». Et donc, chaque mot que j'écris est un hommage à ton esprit et à ta sagesse, qui continuent à alimenter l'essence de mon être.*

## Remerciements

Toutes les expressions de remerciement dans cette section ne seront jamais suffisantes pour exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette recherche doctorale. Grâce à l'opportunité de travailler dans deux laboratoires différents, j'ai pu rencontrer et échanger avec un grand nombre de personnes, ce qui a rendu mes journées de travail plus plaisantes.

Je tiens en premier lieu à remercier mes directeurs de thèse, Mme. Olfa Frikha-Gargouri, et M. François Coutte, ainsi que mon encadrant de thèse M. François Krier, pour leur générosité en partageant leurs expertises scientifiques, leur savoir-faire, leurs recettes et astuces. Leurs contributions inestimables m'ont permis d'acquérir des compétences nécessaires pour mener à bien chaque étape de ce travail. Je souhaite sincèrement les remercier pour leur dévouement constant à mon progrès, en m'offrant des opportunités de développement de mes connaissances à chaque discussion. Leur soutien infaillible m'a également poussé jusqu'au bout pour que je donne le meilleur de moi-même et que j'arrive au bout de cette aventure.

Je tiens également à exprimer mes remerciements envers les membres du jury, M. Lotfi Feki, Mme. Anissa Lounes-Hadj Sahraoui, Mme. Balkiss Bouhaouala-Zahar, M. Essaïd Ait Barka, pour l'immense honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail.

Merci également à M. Ali Gargouri et M. Stéphan Dorey pour avoir suivi l'évolution du projet et pour leurs précieux conseils lors des différents comités de suivi de thèse.

Je ne laisserai pas cette occasion passer sans remercier mes professeurs de la Faculté des Sciences de Sfax, pour tout le savoir et la passion pour la biologie qu'ils nous ont donnés.

Une pensée particulière pour nos experts en biomol Matthieu Duban et Rabia Ladjouzi et notre experte en biochimie analytique Barbara Deracinois pour leur précieuse assistance. Merci infiniment de m'avoir transmis tant de connaissances et d'avoir pris le temps de me former. Je vous suis reconnaissante pour toutes les discussions scientifiques qui m'ont souvent été d'une grande aide, ainsi que pour les moments de rires partagés.

Je souhaite adresser un très grand merci aux personnes que j'ai côtoyées à Lille. Je voudrais tout particulièrement remercier Fatima "Fati"... pour absolument tout. Tu as été un formidable soutien pour moi et une amie de confiance tout au long de ma thèse, et je t'en suis sincèrement reconnaissante pour ton aide à distance alors que j'étais loin. Ça ne sera jamais oublié. Grâce à mon séjour lillois, j'ai eu aussi la chance de croiser la route de personnes exceptionnelles : Morgane, Océane, Jihen, Théo, Montassar, Fatma, Adrien, Samar, Carlos, Doha, Radja, Sorphea, Caterina, Servane, Pauline, Allane, Chloé, Angeline, Maxime et Dahlia.

Un immense merci à vous tous pour les échanges scientifiques que nous avons eus, mais également pour votre incroyable gentillesse, l'ambiance chaleureuse et la convivialité que vous avez apportées. Merci infiniment à chacun de vous. Je suis aussi très reconnaissante envers Camille, Elodie, Mélissa, Marjo et Sandy pour tous les conseils avisés qu'ils ont pu me donner en culture cellulaire.

Passons maintenant au côté Sfax... Je souhaite accorder une mention spéciale à ma compagne d'arme Fatma "brane", avec qui j'ai partagé de longues journées et week-ends au labo, et qui m'a prodiguée son aide et son soutien moral. Je suis vraiment reconnaissante de l'avoir eue à mes côtés pendant ce travail. De même, j'adresse un immense merci à notre chercheuse Nouha pour sa bonne humeur, son énergie et pour tous les services qu'elle peut nous rendre au quotidien dans le labo. J'adresse un très sincère merci à tous mes collègues du laboratoire des Biopesticides notamment : Imen, Hanen, Sahar, Samar et Jihen pour la bonne humeur qu'elles apportent dans le labo et leurs compétences. Mes vifs remerciements vont aussi à Fathi Hirtelli, Saoussen Gafsi et Zina Salhi pour leurs aides et leurs gentilleses.

Cette liste est bien sûr incomplète et je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à rendre cette expérience aussi enrichissante sur le plan humain que sur le plan scientifique

## Résumé

La maladie de la galle du collet, causée par *Agrobacterium tumefaciens*, représente une menace majeure pour les fruits à noyau, en particulier dans les pays méditerranéens. Dans une étude précédente, la souche 32a de *Bacillus velezensis* a été isolée et identifiée comme étant une souche efficace contre les souches phytopathogènes d'*A. tumefaciens*. La compréhension de l'implication des métabolites spécifiques issus des souches microbiennes est essentielle pour le développement de produits de biocontrôle basés sur ces microorganismes. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'investiguer spécifiquement les composés actifs de *B. velezensis* 32a impliqués dans l'antagonisme contre ce pathogène. Pour atteindre cet objectif, une approche intégrée combinant des analyses biochimiques, des techniques moléculaires a été adoptée. Une fois caractérisées, la cytotoxicologie de ces composés a été investiguée.

La caractérisation du surnageant de culture par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (RP-HPLC-MS) a révélé la capacité de la souche 32a à synthétiser diverses isoformes de lipopeptides, de polykétides, de la bacilysine et son dérivé chloré, la chlorotétaine. L'étude de l'implication spécifique des lipopeptides purs dans l'antagonisme contre *A. tumefaciens* a été réalisée selon la méthode de diffusion à partir d'un puits et la méthode de microdilution en série. Les résultats ont montré que ces molécules ne présentaient pas d'activité antagoniste. Ensuite, des souches mutantes de trois polykétides et de la bacilysine ont été générées par génie génétique et l'évaluation de leur activité antagoniste a indiqué le rôle crucial de la difficidine dans la suppression d'*A. tumefaciens*. Une étude plus approfondie comparant les mutants de la souche 32a avec 17 mutants d'une souche similaire de *B. velezensis* GA1 a confirmé la contribution significative de la difficidine et a souligné son effet synergique avec la macrolactine. De même, les résultats ont montré que le mutant déficient en bacillibactine a considérablement réduit l'activité antibactérienne, suggérant ainsi sa capacité à inhiber la croissance d'*A. tumefaciens*. Enfin, afin d'étudier la synergie de ces molécules anti-*A. tumefaciens* et leur cytotoxicité, une purification de ces composés a été réalisée par HPLC préparative. L'évaluation du pouvoir antagoniste des fractions purifiées a confirmé l'effet synergique entre la macrolactine A et l'oxydifficidine, ainsi que l'implication significative de la bacillibactine dans l'antagonisme contre *A. tumefaciens*. La partie portant sur la cytotoxicité qui reste à confirmer montre une très faible cytotoxicité de ces molécules ou de leurs mélanges avec des IC<sub>50</sub> supérieures à 500 mg/L.

**Mots-clés** : *Bacillus velezensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, Lipopeptides, Polykétides, Oxydifficidine, Macrolactine

## Abstract

Crown gall disease, caused by *Agrobacterium tumefaciens*, poses a major threat to stone fruits, especially in Mediterranean countries. In a previous study, strain 32a of *Bacillus velezensis* was isolated and identified as an effective strain against phytopathogenic strains of *Agrobacterium*. Understanding the involvement of specific metabolites derived from microbial strains is essential for the development of new biocontrol products based on these microorganisms. In this context, the objective of this thesis was to specifically investigate the active compounds of *B. velezensis* involved in antagonism against this pathogen. To achieve this goal, an integrated approach combining biochemical analyses and molecular techniques was adopted. Once characterized, the cytotoxicity of these compounds was investigated. Characterization of the culture supernatant by high-performance reverse-phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry (RP-HPLC-MS) revealed the ability of 32a strain to synthesize various isoforms of lipopeptides, polyketides, bacilysin, and its chlorinated derivative, chlorotetaine. The study of the specific involvement of pure lipopeptides in antagonism against *A. tumefaciens* was conducted using well diffusion and serial microdilution methods. The results showed that these molecules did not exhibit antagonistic activity. Subsequently, mutant strains of three polyketides and bacilysin were generated through genetic engineering, and evaluation of their antagonistic activity indicated the crucial role of difficidin in suppressing *A. tumefaciens*. An in-depth study comparing 32a mutants with 17 mutants of a similar *B. velezensis* GA1 strain confirmed the significant contribution of difficidin and highlighted its synergistic effect with macrolactin. Similarly, the results showed that the bacillibactin-deficient mutant significantly reduced antibacterial activity, suggesting its ability to inhibit the growth of *A. tumefaciens*. Finally, to study the synergy of these anti-*A. tumefaciens* molecules and their cytotoxicity, purification of these compounds was performed by preparative HPLC. Evaluation of the antagonistic activity of the purified fractions confirmed the synergistic effect between macrolactin A and oxydifficidin, as well as the significant involvement of bacillibactin in *A. tumefaciens* antagonism. The part regarding the cytotoxicity which remains to be further investigated indicates a very low cytotoxicity of these molecules, with an IC<sub>50</sub> value exceeding 500 mg/L.

**Key words** : *Bacillus velezensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, Lipopeptides, Polyketides, Oxydifficidin, Macrolactin

## TABLE DES MATIERES

|   |    |
|---|----|
| Dédicace .....  | 1  |
| Remerciements.....  | 2  |
| Résumé .....  | 4  |
| Abstract.....   | 5  |
| Table des matières.....   | 6  |
| Liste des abbréviations.....  | 12 |
| Liste des figures.....  | 15 |
| Liste des tableaux.....   | 17 |
| <b>Contexte scientifique, problématique de la recherche et plan de thèse</b>                        |    |
| Introduction.....   | 20 |
| <b>Synthèse bibliographique</b>   |    |
| I. La maladie de la galle du collet .....   | 26 |
| I.1 Généralités sur <i>A. tumefaciens</i> .....   | 26 |
| I.2 Données taxonomiques .....  | 27 |
| I.3 Identification cellulaire et métabolique d' <i>Agrobacterium</i> .....                          | 28 |
| I.4 Ecologie.....   | 29 |
| I.5 Organisation générale du plasmide Ti.....   | 30 |
| I.6 Cycle d'infection d' <i>A. tumefaciens</i> .....  | 31 |
| I.6.1 Reconnaissance et adhésion de la bactérie aux cellules de la plante hôte.....                 | 31 |
| I.6.2 Transfert et intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale.....                | 32 |
| I.6.3 Expression des gènes de l'ADN-T par la cellule végétale.....                                  | 32 |
| I.7 Symptômes de la maladie .....   | 33 |
| I.8 Dégâts provoqués par la maladie .....   | 34 |
| I.9 Contrôle d' <i>A. tumefaciens</i> .....   | 35 |
| I.9.1 Contrôle chimique.....  | 35 |
| I.9.2 Contrôle cultural .....   | 35 |
| I.9.3 Contrôle biologique.....  | 36 |
| II. <i>Bacillus velezensis</i> : excellent modèle de PGPR pour le biocontrôle en agriculture.....   | 36 |
| II.1 Description de l'espèce <i>B. velezensis</i> .....   | 38 |
| II.2 Classification .....   | 39 |
| II.3 Implication de <i>B. velezensis</i> dans la lutte contre les phytopathogènes : Antibiose ..... | 42 |
| II.3.1 Synthèse non ribosomique des lipopeptides, des polykétides et de la bacilysine .....         | 45 |
| II.3.1.1 Synthèse peptidique non ribosomique .....  | 45 |
| II.3.1.1.1 Organisation structurale des NRPS.....   | 45 |
| II.3.1.1.2 Mode de synthèse des NRPS.....   | 49 |
| II.3.1.1.3 Les lipopeptides (LPs).....  | 50 |

|   |  |    |
|---|--|----|
| II.3.1.1.3.1  | Métabolites secondaires présentant une forte valeur ajoutée .....  | 50 |
| II.3.1.1.3.2  | Surfactines .....  | 51 |
| II.3.1.1.3.3  | Iturines .....   | 53 |
| II.3.1.1.3.4  | Fengycines .....   | 55 |
| II.3.1.1.3.5  | Implication dans le biocontrôle .....  | 56 |
| II.3.1.1.3.6  | Cytotoxicité des lipopeptides de <i>Bacillus</i> .....   | 58 |
| II.3.1.2  | Les polykétides synthétases (PKS) .....  | 59 |
| II.3.1.2.1  | Découverte des polykétides .....   | 59 |
| II.3.1.2.2  | Organisation structurale des PKS .....   | 60 |
| II.3.1.2.3  | Les polykétides (PKs) .....  | 64 |
| II.3.1.2.3.1  | Métabolites secondaires présentant une forte valeur ajoutée .....  | 64 |
| II.3.1.2.3.2  | Macrolactines .....  | 67 |
| II.3.1.2.3.3  | Difficidines .....   | 69 |
| II.3.1.2.3.4  | Bacillaènes .....  | 69 |
| II.3.1.2.3.5  | Implication dans le biocontrôle .....  | 70 |
| II.3.1.2.3.6  | Cytotoxicité des polykétides de <i>Bacillus</i> .....  | 72 |
| II.3.1.3  | Bacilysine .....   | 72 |
| II.3.1.3.1  | Structure et mode d'action .....   | 72 |
| II.3.1.3.2  | Implication dans le biocontrôle .....  | 73 |
| III.  | <i>B. velezensis</i> 32a, une souche de biocontrôle efficace contre la maladie de la galle du collet .....                         | 74 |
| IV.   | Objectifs du travail .....   | 75 |
| <b>Matériel et méthodes</b>   |  |    |
| I.  | Matériel .....   | 79 |
| I.1   | Souches et conditions de culture .....   | 79 |
| I.2   | Plasmides utilisés .....   | 82 |
| I.3   | Liste des amorces utilisées .....  | 85 |
| I.4   | Milieux de culture, solutions, marqueurs de sélection antibiotiques et lipopeptides purs utilisés .....                            | 86 |
| II.   | Méthodes .....   | 90 |
| <b>II.1 Chapitre 1: Caractérisation des métabolites produits par <i>B. velezensis</i> 32a et évaluation du pouvoir antagoniste des lipopeptides purs contre <i>A. tumefaciens</i> .....</b> |  |    |
| II.1.1  | Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche <i>B. velezensis</i> 32a contre les souches d' <i>A. tumefaciens</i> ..... | 90 |
| II.1.2  | Identification des lipopeptides, des polykétides et de la bacilysine par RP-HPLC-MS ...  | 91 |
| II.1.2.1  | Culture de <i>B. velezensis</i> en fioles d'Erlenmeyer .....   | 91 |
| II.1.2.2  | Caractérisation biochimique des métabolites de 32a par RP-HPLC-MS .....  | 91 |
| II.1.3  | Analyse par spectrométrie de masse à haute résolution des lipopeptides ituriniques de <i>B. velezensis</i> 32a .....               | 92 |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| II.1.4       | Activité antibactérienne des lipopeptides purs contre <i>A. tumefaciens</i> .....  | 93         |
| II.1.4.1     | Evaluation qualitative .....   | 93         |
| II.1.4.2     | Evaluation quantitative .....  | 93         |
| <b>II.2</b>  | <b>Chapitre 2: Etude de l'implication des polykétides et de la bacilysine des mutants de <i>B. velezensis</i> 32a et GA1 contre <i>A. tumefaciens</i> .....</b>                  | <b>94</b>  |
| II.2.1       | Construction des mutants de <i>B. velezensis</i> 32a incapables de produire les polykétides et de la bacilysine .....  | 94         |
| II.2.1.1     | Extraction de l'ADN génomique de <i>B. velezensis</i> 32a.....   | 94         |
| II.2.1.2     | Amplification par PCR.....   | 94         |
| II.2.1.3     | Electrophorèse sur gel d'agarose .....   | 95         |
| II.2.1.4     | Digestion enzymatique et purification.....   | 95         |
| II.2.1.5     | Clonage des gènes dans pGEM-T Easy .....   | 95         |
| II.2.1.5.1   | Ligation .....   | 95         |
| II.2.1.5.2   | Préparation des cellules chimiocompétentes d' <i>Escherichia coli</i> .....  | 97         |
| II.2.1.5.3   | Transformation par choc-thermique.....   | 97         |
| II.2.1.6     | Validation de l'intégration d'un plasmide dans une cellule bactérienne .....   | 98         |
| II.2.1.6.1   | Extraction de plasmides à partir d' <i>E. coli</i> .....   | 98         |
| II.2.1.6.2   | Détermination de la présence de l'insert dans le vecteur pGEM-T Easy .....   | 99         |
| II.2.1.6.2.1 | Vérification par PCR .....   | 99         |
| II.2.1.6.2.2 | Vérification par digestion .....   | 99         |
| II.2.1.7     | Clonage de la cassette de résistance à la kanamycine (km) dans les vecteurs générés .....  | 100        |
| II.2.1.8     | Essais de transformation de la souche <i>B. velezensis</i> 32a.....  | 101        |
| II.2.1.8.1   | Electro-transformation selon Cao et al. (2011).....  | 102        |
| II.2.1.8.2   | Electro-transformation selon Zhang et al. (2011) .....   | 103        |
| II.2.1.8.3   | Transformation par utilisation des protoplastes .....  | 103        |
| II.2.1.8.4   | Transformation suivant un protocole d' <i>Enterococcus faecalis</i> optimisée au laboratoire BioEcoAgro .....  | 104        |
| II.2.1.8.5   | Transformation de <i>B. velezensis</i> 32a par compétence naturelle induite par la limitation en azote.....  | 105        |
| II.2.2       | Essais antibactériens des mutants de <i>B. velezensis</i> 32a et de GA1 contre les souches d' <i>A. tumefaciens</i> .....  | 106        |
| <b>II.3</b>  | <b>Chapitre 3: Purification des métabolites anti-<i>Agrobacterium</i> de <i>B. velezensis</i> et étude de leurs cytotoxicités sur des lignées cellulaires de type Vero .....</b> | <b>107</b> |
| II.3.1       | Ultrafiltration membranaire pour une meilleure purification des composés anti- <i>A. tumefaciens</i> de <i>B. velezensis</i> 32a.....  | 107        |
| II.3.1.1     | Préparation de l'échantillon.....  | 107        |

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| II.3.1.2 | Purification des composés actifs de <i>B. velezensis</i> 32a ..... | 107 |
| II.3.2   | Caractérisations biologique et biochimique des fractions.....      | 108 |
| II.3.3   | Evaluation de la cytotoxicité des fractions actives .....          | 109 |
| II.3.3.1 | Culture des cellules.....  | 109 |
| II.3.3.2 | Essais de viabilité cellulaire par CCK-8 .....                     | 110 |
| II.4     | Analyse statistique .....  | 110 |

## Résultats et discussion

### Chapitre 1: Caractérisation des métabolites secondaires de *B. velezensis* 32a et évaluation du pouvoir antagoniste des lipopeptides purs contre *A. tumefaciens*

|      |  |     |
|------|--|-----|
|      | Introduction.....  | 115 |
| I.   | Effet du surnageant de <i>B. velezensis</i> 32a sur l'inhibition des souches d' <i>A. tumefaciens</i> .....                  | 115 |
| II.  | Identification des lipopeptides, des polykétides et de la bacilysine par analyse RP-HPLC-MS.                                 | 116 |
| III. | Identification de la synthèse de l'iturine A par <i>B. velezensis</i> 32a via spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ..... | 120 |
| IV.  | Activité antibactérienne des lipopeptides purs contre <i>A. tumefaciens</i> .....  | 123 |
| V.   | Discussion.....  | 125 |
| VI.  | Conclusion.....  | 127 |

### Chapitre 2: Etude de l'implication des polykétides et de la bacilysine dans l'antagonisme contre *A. tumefaciens* via l'utilisation de mutants de *B. velezensis* 32a et GA1

|       |   |     |
|-------|---|-----|
|       | Introduction.....   | 131 |
| I.    | Amplification par PCR des gènes codant pour la biosynthèse des polykétides et de bacilysine   | 132 |
| II.   | Clonage des gènes dans pGEM-T Easy .....  | 132 |
| III.  | Validation du clonage de la cassette de résistance à la kanamycine (km) dans les vecteurs générés .....   | 134 |
| IV.   | Transformation de la souche de <i>B. velezensis</i> 32a.....  | 134 |
| V.    | Caractérisation des mutants déficients dans la biosynthèse des métabolites de <i>B. velezensis</i> 32a vis-à-vis du pathogène <i>A. tumefaciens</i> ..... | 135 |
| VI.   | Étude approfondie de l'interaction des métabolites à l'aide des mutants de <i>B. velezensis</i> GA1 vis-à-vis d' <i>A. tumefaciens</i> .....              | 137 |
| VII.  | Analyse de la concentration minimale inhibitrice de GA1 et de ses mutants.....  | 140 |
| VIII. | Discussion.....   | 141 |
| IX.   | Conclusion.....   | 147 |

### Chapitre 3: Purification des métabolites anti-*A. tumefaciens* de *B. velezensis* 32a et étude de leur synergie et de leur cytotoxicité

|      |   |     |
|------|---|-----|
|      | Introduction.....   | 151 |
| I.   | Purification des composés anti- <i>Agrobacterium</i> par HPLC préparative et étude de la synergie d'action des métabolites.....                 | 152 |
| I.1  | Caractérisation biologique des fractions .....  | 154 |
| I.2  | Caractérisation biochimique des fractions .....   | 155 |
| I.3  | Etude de l'effet synergique entre la macrolactine A, l'oxydifficidine et la bacillibactine dans l'inhibition d' <i>A. tumefaciens</i> C58 ..... | 157 |
| II.  | Etude de l'activité cytotoxique de la synergie entre les molécules anti- <i>Agrobacterium</i> .....   | 158 |
| II.1 | Cytotoxicité de la fraction individuelle F13.....   | 159 |

|   |            |
|---|------------|
| II.2 Cytotoxicité de la synergie entre les molécules dans les fractions F11+F13, F9+F13 et F9+F11   | 159        |
| III. Discussion.....  | 161        |
| <b>Conclusion générale et perspectives.....</b>   | <b>165</b> |
| <b>Valorisation des résultats et formations doctorales.....</b>   | <b>173</b> |
| <b>Annexe 1</b> Analyse RP-HPLC-MS et identification des lipopeptides, polykétides, bacilysine et chlorotétaine dans le surnageant de culture de la souche 32a de <i>B. velezensis</i> après 72 heures de croissance en milieu Landy..... | 176        |
| <b>Annexe 2</b> Article Yousfi et al. (2024) : Characterization of <i>Bacillus velezensis</i> 32a metabolites and their synergistic bioactivity against crown gall disease (IF2023= 6.7) (DOI : 10.1016/j.micres.2023.127569).....        | 182        |
| <b>Références bibliographiques .....</b>  | <b>197</b> |



## Liste des abréviations

### Milieux :

BSA: Sérum Albumine Bovine

DMEM: Milieu Eagle modifié de Dulbecco

LB: Milieu Luria-Bertani

MHB: Mueller Hinton Broth

PAB: Bouillon de Penassay

### Techniques :

RP-HPLC-MS: Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse

RP-HPLC-MS/MS: RP-HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem

MS: Spectrométrie de masse

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne

UF: Ultrafiltration

### Acides aminés :

Ala: Alanine

Asn: Asparagine

Asp: Acide aspartique

Glu: Acide glutamique

Gln: Glutamine

Leu: Leucine

Orn: Ornithine

Pro: Proline

Ser: Sérine

Tyr: Tyrosine

Thr: Thréonine

Val: Valine

### Paramètres et unités :

°C: Degré Celsius

CFU: Colony Forming Unit

Da: Dalton

DO<sub>600</sub>: Densité optique pour une absorbance de 600 nm

F: Amorçe sens

h: Heure

g: Gramme

kb: Kilobase

kDa: Kilodalton  
kV: Kilovolt  
L: Litre  
M: Molaire  
mg: Milligramme  
M+H: Masse moléculaire de la molécule additionnée de la masse moléculaire d'un hydrogène  
min: Minute  
M+K: Masse moléculaire de la molécule additionnée de la masse moléculaire d'un potassium  
mL: Millilitre  
mm: Millimètre  
mM: Millimolaire  
M+Na: Masse moléculaire de la molécule additionnée de la masse moléculaire d'un sodium  
m/z: Rapport masse sur charge  
ng: Nanogramme  
pH : Potentiel hydrogène  
rpm: Rotation par minute  
R: Amorçe anti-sens  
sec: Seconde  
V: Volt  
v/v: Volume par volume  
µm: Micromètre  
µL: Microlitre  
x g: Force gravitationnelle

**Chimie :**

AF: Acide formique  
AIA: Acide Indole Acétique  
CO<sub>2</sub>: Dioxyde de carbone  
CuSO<sub>4</sub>: Sulfate de cuivre  
DMSO: Dimethyl sulfoxide  
FeSO<sub>4</sub>: Sulfate de fer  
H<sub>2</sub>O: Eau  
IPTG: Isopropyl -β-D-thiogalactopyranoside  
KCL: Chlorure de potassium  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Phosphate de monopotassium  
KOH: Hydroxyde de potassium  
MgSO<sub>4</sub>: Sulfate de magnésium  
MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NaOH: Hydroxyde de sodium

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Ammonium

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfate d'ammonium

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrate

PBS: Phosphate Buffered Saline

TAE: Tris acétate EDTA

TBE: Tris-borate-EDTA

TFA: Acide trifluoroacétique

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-galactopyranoside

**Molécules :**

ADN: Acide désoxyribonucléique

AMP: Adénosine monophosphate

CA: Cellulose

COV: Composés organiques volatiles

LPs: Lipopeptides

MOPS: Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

NRP: Peptide nonribosomique

NRPS: Peptide nonribosomique synthétase

PKS: Polykétide synthase

PKs: Polykétides

**Divers :**

A: Adénylation

ACP: Acyl carrier Protein

ANOVA: Analyse de la variance

AT: Domaine acyltransférase

ATP: Adenosine Triphosphate

C: Condensation

CMI: Concentration minimale inhibitrice

E: Epimérisation

KS: Domaine kétoynthase

M: Méthylation

PGPR: Rhizobactérie promotrice de la croissance des plantes

## Liste des figures

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 1:</b> La galle du collet sur l'amandier .....   | 26  |
| <b>Figure 2:</b> Observation microscopique des cellules de la souche <i>A. tumefaciens</i> B6 (x100).....  | 29  |
| <b>Figure 3:</b> Organisation du plasmide Ti.....  | 31  |
| <b>Figure 4:</b> Mécanisme d'infection des cellules végétales par <i>Agrobacterium</i> .....   | 33  |
| <b>Figure 5:</b> Mécanismes d'action des PGPR .....  | 38  |
| <b>Figure 6:</b> A: Observation microscopique des cellules de <i>B. velezensis</i> 32a (x100).....   | 39  |
| <b>Figure 7:</b> Classification et regroupement phylogénique des souches de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ....   | 41  |
| <b>Figure 8 :</b> Réaction d'activation d'un acide aminé en aminoacyl adénylate par le domaine A.....  | 46  |
| <b>Figure 9:</b> Thiolation de l' aminoacyl adénylate activé .....   | 47  |
| <b>Figure 10:</b> Établissement de la liaison peptidique entre deux acides aminés par le domaine de condensation .....   | 47  |
| <b>Figure 11:</b> Réaction de libération du peptide néoformé par le domaine Te.....  | 48  |
| <b>Figure 12:</b> Représentation schématique de la structure modulaire des NRPS avec les domaines de base pour l'initiation, l'élongation et la terminaison .....                                      | 48  |
| <b>Figure 13:</b> Structures des membres représentatifs des lipopeptides .....   | 51  |
| <b>Figure 14:</b> Architecture de la surfactine synthétase et mode schématique de la biosynthèse .....   | 53  |
| <b>Figure 15:</b> Synthèse et structure de la famille des iturines .....   | 54  |
| <b>Figure 16:</b> Représentation schématique de l'opéron codant pour la plipastatine et la fengycine avec les acides aminés associés .....   | 56  |
| <b>Figure 17:</b> Représentation de la réaction de recrutement de l'unité d'extension par le domaine AT et réaction du transfert du polykétide du domaine AT vers le domaine ACP .....                 | 62  |
| <b>Figure 18:</b> Réaction de transfert du groupement phosphopantéthéine du coenzyme A sur la sérine de l'ACP catalysée par la PPTase.....   | 62  |
| <b>Figure 19:</b> Réaction de condensation de type Claisen catalysée par le domaine KS.....  | 63  |
| <b>Figure 20:</b> Représentation d'une PKS de type I modulaire.....  | 64  |
| <b>Figure 21:</b> Structures des membres représentatifs des polykétides .....  | 66  |
| <b>Figure 22:</b> Organisation de la macrolactine synthétase .....   | 67  |
| <b>Figure 23:</b> Structures chimiques des macrolactines précédemment identifiées (1–33) .....   | 68  |
| <b>Figure 24:</b> Organisation de la difficidine synthétase.....   | 69  |
| <b>Figure 25:</b> La PksX synthase de la bacillaène .....  | 70  |
| <b>Figure 26:</b> Synthèse de bacilysine à partir de L-alanine et de L-anticapsine.....  | 73  |
| <b>Figure 27:</b> Mode d'action de la bacilysine synthétisée par <i>B. velezensis</i> .....  | 73  |
| <b>Figure 28:</b> Carte du plasmide pDG792, Km <sup>r</sup> .....  | 82  |
| <b>Figure 29:</b> Carte du plasmide p $kdfnD$ , Km <sup>r</sup> .....  | 83  |
| <b>Figure 30:</b> Carte du plasmide p $kmlnA$ , Km <sup>r</sup> .....  | 83  |
| <b>Figure 31:</b> Carte du plasmide p $kbaeJ$ , Km <sup>r</sup> .....  | 84  |
| <b>Figure 32:</b> Carte du plasmide p $kbaeC$ , Km <sup>r</sup> .....  | 84  |
| <b>Figure 33:</b> Schéma de la stratégie d'un exemple de clonage du gène $dfnD$ dans le vecteur pGEM-T Easy .....  | 96  |
| <b>Figure 34:</b> Cartes de restriction des plasmides $pdfnD$ , $pmlnA$ , $pbaeJ$ et $pbaeC$ .....   | 92  |
| <b>Figure 35:</b> Schéma de la double recombinaison homologue (double cross-over) entre le fragment d'ADN $baeC$ de 32a et le fragment $baeC$ (F)-km <sup>r</sup> - $baeC$ (R) porté par $pbaeC$ ..... | 102 |
| <b>Figure 36:</b> Workflow pour l'évaluation antibactérienne des fractions et leurs analyses par RP-HPLC-MS .....  | 100 |
| <b>Figure 37:</b> Activité antibactérienne du surnageant de 32a contre les souches d' <i>A. tumefaciens</i> .....  | 116 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 38:</b> Analyse par RP-HPLC-MS/MS de la forme C <sub>16</sub> du lipopeptide iturinique de <i>B. velezensis</i> 32a et les standards, l'iturine A et la mycosubtiline .....   | 122 |
| <b>Figure 39:</b> Evaluation de l'activité antagoniste des lipopeptides purs (A et B) et de la synergie (C et D) à 100 mg/L contre <i>A. tumefaciens</i> C58 et B6.....   | 123 |
| <b>Figure 40:</b> Analyse du taux d'inhibition de la croissance d' <i>A. tumefaciens</i> C58 (A) et B6 (B) sous différentes concentrations de lipopeptides commercialisés et leurs synergies .....  | 125 |
| <b>Figure 41:</b> Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments amplifiés par PCR des gènes de biosynthèse de polykétides.....   | 132 |
| <b>Figure 42:</b> Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments digérés de <i>pmlnA pbaeJ, pdfnD</i> et <i>pbacC</i> .....   | 133 |
| <b>Figure 43:</b> Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments amplifiés par PCR avec les amorces T7 et SP6.....  | 133 |
| <b>Figure 44:</b> Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments digérés de <i>pkmlnA, pkbaeJ, pkdfnD</i> et <i>pkbacC</i> .....  | 134 |
| <b>Figure 45:</b> Construction de mutants de délétion de <i>mlnA, baeJ, dfnD</i> et <i>bacC</i> chez <i>B. velezensis</i> 32a. A. ....  | 135 |
| <b>Figure 46:</b> Comparaison de l'effet antibactérien des surnageants de <i>B. velezensis</i> 32a (WT) et de ses mutants contre <i>A. tumefaciens</i> C58 et B6 .....  | 136 |
| <b>Figure 47:</b> Activité antibactérienne de <i>B. velezensis</i> 32a (WT) et de ses différents mutants contre <i>A. tumefaciens</i> C58 (A) et B6 (B).....  | 137 |
| <b>Figure 48:</b> Inhibition de la croissance des phytopathogènes d' <i>A. tumefaciens</i> C58 et B6 en réponse à GA1 et ses mutants (a1 et b1), leurs cartes thermiques (a2 et b2) et leurs tests de diffusion de disque correspondants (a3 et b3), respectivement. .... | 139 |
| <b>Figure 49:</b> Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de <i>B. velezensis</i> GA1 et de ses mutants contre les souches d' <i>A. tumefaciens</i> (C) par le test de microdilution en utilisant le MTT comme indicateur.....                       | 141 |
| <b>Figure 50:</b> Fractionnement de 28,2 mg/mL de filtrat de <i>B. velezensis</i> 32a par HPLC préparative  | 153 |
| <b>Figure 51:</b> Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions individuelles du filtrat de la souche 32a contre <i>A. tumefaciens</i> C58 .....   | 155 |
| <b>Figure 52:</b> Identification des molécules actives dans les fractions F9, F11 et F13.....   | 156 |
| <b>Figure 53:</b> Évaluation de l'activité antibactérienne des mélanges de fractions de la souche 32a contre <i>A. tumefaciens</i> C58.....   | 158 |
| <b>Figure 54:</b> Evaluation de l'effet de la fraction F13 sur la viabilité des cellules Vero .....   | 159 |
| <b>Figure 55:</b> Evaluation de l'effet du mélange des fractions (F11+ F13) sur la viabilité des cellules Vero .....  | 160 |
| <b>Figure 56:</b> Evaluation de l'effet du mélange des fractions (F9+ F13) sur la viabilité des cellules Vero .....   | 161 |
| <b>Figure 57:</b> Evaluation de l'effet du mélange des fractions (F9+ F11) sur la viabilité des cellules Vero .....   | 161 |

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 1:</b> Espèces actuellement incluses dans le genre <i>Agrobacterium</i> .....  | 28  |
| <b>Tableau 2:</b> Métabolites secondaires de <i>B. velezensis</i> et leur efficacité contre les phytopathogènes.....  | 44  |
| <b>Tableau 3:</b> Valeurs de masse molaires calculées (m/z) des ions $[[M]+H, +Na, +K]^+$ correspondant aux isoformes des surfactines .....                                   | 52  |
| <b>Tableau 4:</b> Différence entre les membres de la famille des surfactines au niveau de la séquence d'acides aminés.....  | 52  |
| <b>Tableau 5:</b> Différence entre les membres de la famille des iturines au niveau de la séquence d'acides aminés.....   | 55  |
| <b>Tableau 6:</b> Valeurs des masses molaires calculées des ions $[[M]+H, +Na, +K]^+$ correspondant aux isoformes de l'iturine A/mycosubtiline et de la bacillomycine D ..... | 54  |
| <b>Tableau 7:</b> Valeurs des masses molaires calculées (m/z) des ions $[[M]+H, +Na, +K]^+$ et $[[M]+H, +Na, +K]^{2+}$ correspondant aux isoformes de fengycine A et B.....   | 56  |
| <b>Tableau 8:</b> Valeurs des masses molaires calculées (m/z) des ions $[[M]+H, +Na, +K]^+$ correspondant aux isoformes de polykétides .....                                  | 66  |
| <b>Tableau 9:</b> Souches utilisées et plasmides construits dans ce travail .....   | 80  |
| <b>Tableau 10:</b> Liste des amorces PCR utilisées dans ce travail.....   | 85  |
| <b>Tableau 11:</b> Milieux de culture, solutions, marqueurs de sélection antibiotiques et lipopeptides purs utilisés au cours de cette étude .....                            | 86  |
| <b>Tableau 12:</b> Enzymes utilisées pour la vérification des clones positifs.....  | 99  |
| <b>Tableau 13:</b> Enzymes utilisées pour la digestion des vecteurs générés et le plasmide portant la cassette de résistance à la kanamycine (pDG792).....                    | 101 |
| <b>Tableau 14:</b> Composés antimicrobiens de <i>B. velezensis</i> 32a détectés par RP-HPLC-MS et leurs masses respectives.....   | 118 |
| <b>Tableau 15:</b> Tableau récapitulatif des concentration finales des différentes fractions testées.....   | 154 |
| <b>Tableau 16:</b> Composition des différentes fraction purifiées .....   | 157 |
| <b>Tableau 17:</b> Les fractions testées en combinaison contre <i>A. tumefaciens</i> C58 .....  | 158 |

*Contexte scientifique, problématique  
de la recherche et plan de thèse*



## Introduction

Le monde actuel est confronté à des défis majeurs, notamment en ce qui concerne la croissance démographique, la sécurité alimentaire et la santé humaine et végétale (**Jones & Naidu, 2019**). Selon les projections des Nations unies, la population mondiale devrait atteindre environ 10 milliards d'ici 2050 (**Gerland et al., 2014**). Cette croissance démographique a des répercussions sur la sécurité alimentaire. Par conséquent, la production alimentaire devra augmenter de 60 % pour satisfaire les besoins croissants de la population, ce qui exerce une forte pression sur la sécurité alimentaire au 21<sup>ème</sup> siècle (**FAO, 2019**). En effet, un des défis majeurs auquel le monde est confronté est de garantir le droit à l'alimentation pour tous et partout. Les plantes constituent la principale source d'alimentation pour les êtres Humains, représentant plus de 80 % de leur consommation alimentaire (**Rizzo et al., 2021**). Cependant les pertes globales causées par les agents pathogènes et les ravageurs peuvent atteindre jusqu'à 40 % de la production mondiale des agrosystèmes chaque année (**FAO, 2021**). Leur capacité à causer des dommages aux cultures entraîne une diminution de la quantité de la nourriture disponible, rendant ainsi l'alimentation moins accessible et augmentant les prix des produits alimentaires (**Rehman et al., 2021**). C'est ainsi que, conscientes de l'importance de la protection des plantes pour maintenir la sécurité alimentaire, depuis 2020, les Nations Unies ont déclaré le 12 mai comme « Journée internationale de la santé des plantes ». Pour protéger les cultures, les producteurs utilisent depuis des dizaines d'années des intrants chimiques, ce qui a entraîné des répercussions graves sur l'environnement ainsi que la santé humaine, mettant parfois en péril leur potentiel de production (**Pathak et al., 2022**). C'est pourquoi l'adoption de l'agriculture durable est aujourd'hui considérée comme l'une des approches les plus respectueuses de l'environnement pour assurer la sécurité alimentaire mondiale tout en préservant les écosystèmes naturels desquels nous dépendons.

Les bactéries pathogènes des plantes provoquent plus de 1 milliard de dollars de pertes chaque année dans la chaîne de production alimentaire (**Kannan & Bastas, 2015**). *Agrobacterium tumefaciens* occupe la troisième position des bactéries phytopathogènes les plus virulentes en fonction de leur pathogénicité, leur impact économique et leur aspect moléculaire, notamment en raison de son utilisation pour la transformation génétique des plantes (**Mansfield et al., 2012**). Elle provoque la maladie de la galle du collet chez de nombreuses espèces d'importance agricole et économique, telles que la plupart des dicotylédones, certains monocotylédones et certains gymnospermes (un peu plus de 600 espèces réparties en 93 familles) (**Chandrasekaran et al., 2019**). Lors d'une blessure, la plante libère des composés

chimiques qui induisent les gènes de virulence (vir) présents sur le plasmide Ti d'*A. tumefaciens*. Ces chimio-attractants attirent la bactérie qui se déplace vers la blessure grâce à ses flagelles. Une fois à l'intérieur de la cellule végétale, le fragment d'ADN oncogène (brin-T) qui code pour la synthèse incontrôlée des hormones de croissance est acheminé puis intégré dans le génome de la plante, d'où l'apparition de tumeurs (**Moriya et al., 2021**).

Une fois que la plante est infectée par *A. tumefaciens*, la lutte curative contre la maladie devient extrêmement difficile, car même en l'absence de la bactérie, la croissance de la tumeur continue à progresser. Ainsi, les moyens de lutte préconisés sont préventifs et se limitent à des mesures prophylactiques ou à la lutte biologique au moyen de la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* K84 et de son dérivé génétiquement modifié K1026 (**Shim, 1987**). Néanmoins, une résistance peut se produire par transfert de gènes de K84 aux souches pathogènes d'*Agrobacterium*. En plus, en raison des restrictions légales de l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM), K1026 n'est plus utilisée actuellement dans de nombreux pays (**Jones & Kerr, 1989**). Par conséquent, la lutte contre *Agrobacterium* est un domaine de recherche en évolution et de nouvelles stratégies de prévention et de lutte biologique peuvent être développées pour gérer efficacement la maladie de la galle du collet et réduire les restrictions liées à l'utilisation de souches OGM.

Pour lutter contre les maladies des plantes, les agents de contrôle biologique (ACB), y compris les microbes spécialisés ou leurs métabolites reçoivent de plus en plus l'attention des scientifiques et des agriculteurs. Diverses études ont souligné le potentiel de certaines espèces appartenant au genre *Bacillus* classées comme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), pour stimuler la croissance des plantes et les protéger contre les pathogènes telluriques (**Rabbee et al., 2019; Im et al., 2020; Pei et al., 2022**). Les membres de ce genre sont largement utilisés pour augmenter le rendement des cultures agricoles en raison de leur capacité à former des spores résistantes aux conditions environnementales défavorables telles que les rayons ultraviolets, la chaleur et la sécheresse (**Etesami et al., 2023**).

Particulièrement, les souches de *Bacillus velezensis* se distinguent des autres espèces de *Bacillus* en raison de leur richesse en gènes responsables de la biosynthèse de métabolites secondaires bioactifs représentant environ 12 % du génome total (**Pandin et al., 2018**). Parmi ces gènes, *urfA*, *fen* et *itu* codent pour la synthèse de lipopeptides non ribosomiques (LPs), à savoir les surfactines, les fengycines et les iturines, respectivement (**Zhang & Sun, 2018**). Ces lipopeptides sont connus pour leur activité antifongique contre les agents pathogènes des plantes (**Desmyttere et al., 2019; Platel et al., 2021; Leconte et al., 2022**). De plus, trois autres groupes de gènes : *mln*, *bae* et *dfn* ont été identifiés comme étant responsables de la synthèse

de trois polykétides (PKs) : les macrolactines, les bacillaènes et les difficidines, respectivement, tandis que le gène *bac* guide la synthèse d'un dipeptide appelé bacilysine (Chen et al., 2006; Chen et al., 2009). Les polykétides sont largement utilisés en tant qu'agents antimicrobiens (Sopheareth et al., 2013; Sui et al., 2022) et immunosuppresseurs (Li et al., 2014).

Dans une étude précédente, la souche 32a de *B. velezensis* a été isolée et identifiée comme étant une souche de biocontrôle efficace contre les souches phytopathogènes d'*A. tumefaciens* C58 et B6 (Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017). Les métabolites présents dans le surnageant de la souche 32a ont présenté une forte activité bactéricide contre les souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6 et ont significativement inhibé la formation de tumeurs sur des disques de carotte et des plants de tomate (Ben Abdallah et al., 2015, 2018a). Ces résultats suggèrent que l'application de ces métabolites peut représenter un outil de lutte biologique contre la maladie de la galle du collet.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'investiguer les composés actifs de *B. velezensis* 32a impliqués dans l'antagonisme contre *A. tumefaciens*, suivi de l'évaluation de l'effet cytotoxique des molécules anti-*Agrobacterium* en tant qu'étude nécessaire pour le développement d'un nouveau biobactéricide contre la galle du collet. Pour atteindre ces deux objectifs, une première approche intégrée combinant des analyses biochimiques et des techniques moléculaires a été développée. Puis dans un second temps, les métabolites actifs ont été purifiés et leur synergie et leur cytotoxicité ont été investigués. Pour répondre au premier objectif, le contenu en métabolites secondaires du surnageant de culture de la souche 32a a été caractérisé par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (RP-HPLC-MS). Ensuite, l'implication spécifique des lipopeptides dans l'activité antagoniste contre *A. tumefaciens* a été évaluée en utilisant les lipopeptides purs seuls et leurs mélanges. Pour étudier la contribution des polykétides et de la bacilysine dans l'antagonisme contre *Agrobacterium*, des mutants de la souche 32a déficients dans la biosynthèse de la difficidine, des macrolactines, des bacillaènes et de la bacilysine ont été construits. Par la suite, pour analyser plus en profondeur l'interaction entre ces composés, les mutants de la 32a ont été comparés à 17 mutants issus d'une souche similaire de *B. velezensis* GA1, fournies par l'unité de BioEcoAgro en Belgique. Concernant le deuxième objectif, les molécules bioactives contre *Agrobacterium* ont été séparées en les fractionnant selon leurs tailles par un procédé d'ultrafiltration membranaire (UF) puis purifiés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative. Enfin, leur cytotoxicité sur les cellules rénales de singe vert africain (Vero) a été entreprise. Cette étude est encore en cours d'évaluation.



# *SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*



## I. La maladie de la galle du collet

### I.1 Généralités sur *A. tumefaciens*

Le genre *Agrobacterium* regroupe différentes espèces de bactéries, majoritairement saprophytes et non pathogènes qui vivent grâce à la décomposition de la matière organique. Cependant, certaines espèces d'*Agrobacterium* sont des phytopathogènes. En effet, lorsqu'elles possèdent des éléments génétiques particuliers déterminant la virulence, certaines espèces dont *A. tumefaciens* peuvent provoquer des maladies néoplasiques (Escobar & Dandekar, 2003). *A. tumefaciens* est l'espèce la plus étudiée dans ce genre (Mary & Baron, 2019) et occupe la troisième position des bactéries les plus phytopathogènes (Mansfield et al., 2012). Cette espèce, aussi dénommée *Rhizobium radiobacter* selon la nomenclature scientifique officielle, est responsable d'une maladie appelée galle du collet (Singh et al., 2020). Elle provoque des tumeurs chez de nombreuses espèces végétales d'importance agricole et économique, telles que la plupart des dicotylédones, certains monocotylédones et certains gymnospermes (un peu plus de 600 espèces réparties en 93 familles) (Chandrasekaran et al., 2019). Les souches d'*A. tumefaciens* sont naturellement présentes dans les sols et sont plus particulièrement retrouvées dans les sols rhizosphériques. Cette  $\alpha$ -protéobactérie appartient à la famille des Rhizobiaceae (Guo et al., 2017). Lors d'une blessure, la plante libère un large nombre de composés chimiques qui induisent les gènes de virulence (vir) présents sur le plasmide Ti d'*A. tumefaciens*. Ces chimio-attractants attirent la bactérie qui se déplace vers la blessure grâce à ses flagelles. Une fois pénétré, le fragment d'ADN oncogène (brin-T) qui code pour la synthèse incontrôlée des hormones de croissance est transféré vers le génome de la plante d'où l'apparition de tumeurs (Mary & Baron, 2019) (Figure 1).



Figure 1: La galle du collet sur l'amandier

## I.2 Données taxonomiques

La classification taxonomique des souches d'*Agrobacterium* est parfois difficile car celle-ci reste discutée et toujours en évolution continue. La première classification de ce genre a été réalisée en fonction de la pathogénicité des souches. En effet, elle a été initialement divisée en six espèces: *A. radiobacter*; comme une souche non pathogène (**Beijerinck et Delden, 1902**), *A. tumefaciens*; a été décrite comme responsable de la galle du collet (**Smith & Townsend, 1907**), *A. rhizogenes* comme responsable du chevelu racinaire ou « hairy root » et qui consiste en une prolifération incontrôlée des racines au site d'infection (**Riker et al., 1930**), *A. rubi* à l'origine de tumeurs sur les tiges des plantes du genre *Rubus* (**Hildebrand et al., 1940**), *A. vitis*, agent causal de la galle de la vigne (**Ophel & Kerr, 1990**) et la dernière *A. larrymorrei*, se développant sur les tiges de *Ficus benjamina* L (**Bouzar & Jones, 2001**). Également, selon la 1<sup>ère</sup> édition du Bergey's Manual of systematic bacteriology publié en 1984, **Kerstens et De Ley** ont divisé les *Agrobacterium* en trois groupes taxonomiques ou biovars en fonction de leurs caractéristiques biochimiques et phénotypiques. Le biovar 1 regroupe les souches d'*A. tumefaciens* et les biovars 2 et 3 sont respectivement les souches de *R. rhizogenes* et *A. vitis*. Par la suite, les souches du genre *Agrobacterium* ont été distribuées dans des groupes génomiques G1 à G9, G11, deux groupes génomiques non nommés et G13. Le G4 inclut les souches type d'*A. tumefaciens* et *A. radiobacter*. Les G10 et G11 sont respectivement *A. rhizogenes* et *A. rubi* (**Costechareyre et al., 2009**). Les deux groupes sans nom comprenaient les souches d'*A. larrymoorei* et *A. vitis*. La G8 correspond à l'espèce d'*A. fabrum* (**Lassalle et al., 2011**). A ce groupe appartient la souche C58 qui est une des plus utilisées et qui appartient au biovar 1, tandis que la souche B6 fait partie du biovar 1 et du groupe G4. Le G2 est celui incluant *R. pusense* (**Aujoulat et al., 2015**). La G14, un nouveau groupe génomique définie, inclue les souches de *R. nepotum* (**Shams et al., 2013**).

Actuellement le genre *Agrobacterium* contient 14 espèces (**Flores-Félix et al., 2020**) (**Tableau 1**). Selon cette nouvelle classification, la plupart des *Agrobacterium* sont responsables des tumeurs au niveau des plantes. Néanmoins, ces dernières années, le nombre d'espèces non phytopathogènes a augmenté incluant *A. salinitolerans* capable de former des nodules chez *Sesbania cannabina* (**Yan et al., 2017**) et *A. pusense* capable de provoquer une septicémie humaine (**Kuchibiro et al., 2018**).

**Tableau 1:** Espèces actuellement incluses dans le genre *Agrobacterium* (Flores-Félix et al., 2020)

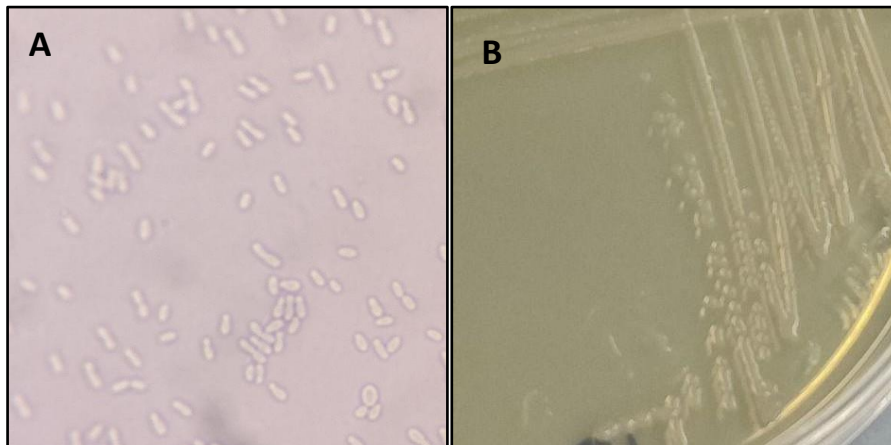
| Espèce                          | Source d'isolement  | Symptôme de pathogénicité | Référence                 |
|---------------------------------|---|---------------------------|---------------------------|
| Espèces d' <i>Agrobacterium</i> |   |                           |                           |
| <i>A. radiobacter</i>           | Sol et rhizosphère  | Non-pathogène             | (Conn, 1942)              |
| <i>A. tumefaciens</i>           | Tumeurs chez <i>Malus</i> sp.   | Tumeurs                   | (Conn, 1942)              |
| <i>A. rubi</i>                  | Tumeurs chez <i>Rubus</i> sp.   | Tumeurs                   | (Starr et al., 1943)      |
| <i>A. larrymoorei</i>           | Tumeurs chez <i>Ficus benjamina</i>   | <i>Ficus benjamina</i>    | (Bouzar & Jones, 2001)    |
| <i>A. albertimagni</i>          | <i>Potamogeton pectinatus</i>   | NA                        | (Salmassi et al., 2002)   |
| <i>A. fabrum</i>                | Tumeurs chez <i>Prunus</i> sp. , <i>Humulus lupulus</i> , <i>Euonymus alata</i> , <i>Rubus macropetalus</i> | Tumeurs                   | (Lassalle et al., 2011)   |
| <i>A. pusense</i>               | Rhizosphère de <i>Cicer arietinum</i>   | NA                        | (Mousavi et al., 2015)    |
| <i>A. nepotum</i>               | Tumeurs chez <i>Prunus</i> , <i>Vitis</i> et <i>Rubus</i>   | Tumeurs                   | (Pulawska et al., 2012)   |
| <i>A. skierniewicense</i>       | Tumeurs chez <i>Chrysanthemum</i> et <i>Prunus</i>  | Tumeurs                   | (Pulawska et al., 2012)   |
| <i>A. arsenijevicei</i>         | Tumeurs chez <i>Prunus</i> et <i>Rubus</i>  | Tumeurs                   | (Kuzmanović et al., 2015) |
| <i>A. deltaense</i>             | Nodules chez <i>Sesbania cannabina</i>  | NA                        | (Yan et al., 2017)        |
| <i>A. salinitolerans</i>        | Nodules chez <i>Sesbania cannabina</i>  | NA                        | (Yan et al., 2017)        |
| <i>A. bohemicum</i>             | <i>Papaver somniferum</i>   | Non-pathogène             | (Zahradník et al., 2018)  |
| <i>A. rosae</i>                 | <i>Rosa hybrida</i>   | Tumeurs                   | (Zahradník et al., 2018)  |

NA : données manquantes ("Not available ")

### I.3 Identification cellulaire et métabolique d'*Agrobacterium*

Les bactéries du genre *Agrobacterium* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulantes et peuvent exister seules ou par paires (Lacroix & Citovsky, 2013). Elles sont de taille d'environ 1 à 3 µm de longueur et de 0,6 à 1 µm de largeur. Les cellules possèdent un à six flagelles péritriches leur conférant une certaine mobilité dans leur milieu. L'observation macroscopique d'*A. tumefaciens* montre des colonies circulaires de couleur blanche et d'une

élévation convexe (**Figure 2**). Du point de vue génomique, les *Agrobacterium* ont la particularité d'avoir un chromosome linéaire en plus d'un chromosome circulaire, contrairement aux autres genres appartenant aux Rhizobiaceae qui possèdent deux chromosomes circulaires (**Ramírez-Bahena et al., 2014**). En culture sur des milieux contenant des glucides, les cellules produisent de grandes quantités de polysaccharides extracellulaires, donnant aux colonies un aspect visqueux. Leur croissance se fait à une température optimale comprise entre 24 °C et 28 °C. Etant des chimio-organotrophes, les souches d'*Agrobacterium* utilisent les glucides, les acides aminés et les acides phénoliques comme sources de carbone (**Mary & Baron, 2019**). Le métabolisme respiratoire de la plupart de ces bactéries est aérobie strict. Toutefois, elles sont capables de croître dans les tissus de la plante sous des conditions réduites en oxygène en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons (**Bergaust et al., 2008**). Elles produisent de la catalase et généralement aussi de l'uréase et de l'oxydase.



**Figure 2:** A : Observation microscopique des cellules de la souche *A. tumefaciens* B6 (x100).

**B:** Colonies d'*A. tumefaciens* C58

#### I.4 Ecologie

L'étude de l'écologie des agents pathogènes permet de mieux comprendre la persistance et la dissémination de la maladie. En fait, d'après **Cho (2021)**, l'écologie microbienne est l'étude des microorganismes dans la nature. Plus particulièrement, elle se concentre sur les interactions microbiennes avec les éléments biotiques et abiotiques. Les souches d'*A. tumefaciens* sont des bactéries ubiquitaires naturellement présentes dans les sols. Elles établissent des relations à long terme avec les plantes et ce, dans deux modes de vie différents, rhizosphérique et pathogénique (tumeur).

La persistance de la bactérie dans la rhizosphère nécessite la résistance à la fois aux stress biotique et abiotique et une grande capacité à accéder rapidement aux éléments nutritifs (Leonard et al., 2017). Le mode de vie pathogène implique, la capacité à faire face aux mécanismes de défense de la plante, la disponibilité des ressources nutritives et les interactions avec le microbiote de l'hôte (Brader et al., 2017).

### I.5 Organisation générale du plasmide Ti

Le génome des souches d'*Agrobacterium* est généralement composé de quatre éléments génétiques : un chromosome circulaire de 2,84 Mb, un chromosome linéaire de 2 Mb, un plasmide At de 0,54 Mb et un plasmide de virulence Ti « Tumor inducing » de 0,21 Mb (Wibberg et al., 2011).

Le plasmide Ti comporte 233 gènes, et n'est pas indispensable à la survie de la bactérie. Il est en revanche responsable de son caractère pathogène. Ce plasmide porte cinq types de gènes (Clark et al., 2019) (Figure 3):

- La région T ou ADN-T (ADN de transfert) : Dans cette région, se trouve les gènes responsables de la production des hormones végétales (auxine et cytokinine) qui induisent la formation de tumeurs, ainsi que les gènes responsables de la production d'opines utilisées comme source de carbone par les souches d'*Agrobacterium*. Cette zone est encadrée par des répétitions inversées de 25 pb. Tout l'ADN présent à l'intérieur de ces répétitions sera transféré dans la cellule végétale.
- La région *rep* : Requisite pour la réplication du plasmide Ti.
- La région *vir* : Codant pour les protéines Vir, permettant, entre autres, le transfert de cet ADN-T.
- La région *tra/trb* : Impliquée dans le processus de transfert conjugal du plasmide depuis une bactérie virulente vers une autre bactérie.
- La région *acc* et *noc* : Des gènes permettant l'importation et le catabolisme des opines par les bactéries.

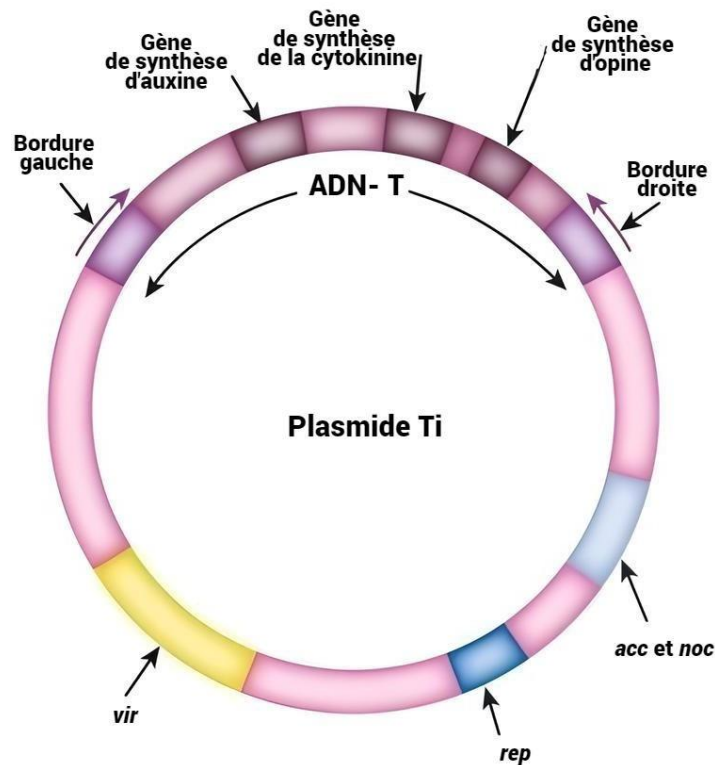


Figure 3: Organisation du plasmide Ti (Clark et al., 2019)

## I.6 Cycle d'infection d'*A. tumefaciens*

Le mécanisme d'infection d'*A. tumefaciens* repose sur l'existence de son plasmide Ti. Lors de l'infection d'une plante, la bactérie transfère une région spécifique appelée ADN-T (ADN transféré) qui s'intègre ensuite dans le génome de la plante hôte (Figure 4). Ce transfert d'ADN d'*Agrobacterium* vers la plante est remarquable, car il constitue le seul exemple connu de transfert horizontal naturel de gènes entre une bactérie et un organisme eucaryote (Lacroix & Citovsky, 2022). Le mécanisme général de l'infection par *A. tumefaciens* implique trois étapes :

- 1: Reconnaissance et adhésion de la bactérie aux cellules de la plante hôte,
- 2: Transfert et intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale,
- 3: Expression des gènes de l'ADN-T par la cellule végétale,

### I.6.1 Reconnaissance et adhésion de la bactérie aux cellules de la plante hôte

Lorsqu'une blessure survient, la plante sécrète des molécules chimio-attractantes comme des sucres, des acides aminés et des composés phénoliques. Ces substances attirent les bactéries, qui se déplacent ensuite en suivant un gradient de concentration à l'aide de leurs flagelles et se fixent à la paroi cellulaire de la plante (Brencic & Winans, 2005).

Pour que l'attachement se produise, différentes molécules sont nécessaires. Trois gènes chromosomiques *chvA*, *chvB* et *pscA* ont été identifiés comme étant essentiels pour ce processus. Ils sont impliqués dans la synthèse de polysaccharides de type  $\beta$ -1-2-glucane. Ces polysaccharides interagissent ensuite avec des molécules présentes dans la paroi végétale, comme la vitronectine, facilitant ainsi l'attachement de la bactérie aux cellules de la plante (Pitzschke & Hirt, 2010).

### **I.6.2 Transfert et intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale**

Après le contact physique, les composés phénoliques (ex : acetosyringone), certains sucres, un pH acide ou une faible concentration en phosphate déclenchent l'expression des gènes de virulence (*vir*) présents sur le plasmide Ti (Subramoni et al., 2014). Ces signaux entraînent l'autophosphorylation de la protéine kinase transmembranaire VirA, qui phosphoryle à son tour la protéine régulatrice cytoplasmique VirG (Tzfira et al., 2017). Lorsqu'il est activé, le VirG se fixe sur les régions promotrices des gènes *vir*, ce qui entraîne la transcription de ces gènes (Agrawal & Rami, 2022). En fait, pour que l'ADN-T soit transféré, il doit être préparé sous forme de molécule simple brin. Les endonucléases VirD1 et VirD2 vont interagir de manière spécifique pour cliver un fragment du plasmide Ti. Grâce à son activité hélicase, VirD1 facilite la séparation des deux brins de l'ADN-T alors que VirD2 clive l'ADN-T au niveau des séquences spécifiques répétées de 25 nucléotides, qui se trouvent dans les régions bordant ce fragment. VirD2 reste fixé de manière covalente à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T. Après la séparation, le complexe VirD2-ADN-T ou brin-T a la capacité d'être transféré dans la plante hôte grâce au système de type IV (Pitzschke & Hirt, 2010). Composé de trois unités distinctes, ce système crée un canal reliant la bactérie à la cellule hôte. Lorsqu'il pénètre dans une cellule végétale, le brin-T se recouvre de protéines VirE2 pour le protéger de la dégradation par les nucléases endogènes, formant ainsi le complexe-T. Ensuite, grâce aux protéines VirD2 et VirE2, ce complexe est dirigé vers le noyau de cette cellule hôte. Dans le noyau, l'ADN-T s'intègre de manière aléatoire dans le génome de l'hôte.

### **I.6.3 Expression des gènes de l'ADN-T par la cellule végétale**

Une fois intégrés dans le génome de la plante, les gènes présents dans l'ADN-T sont transcrits et traduits par la machinerie cellulaire de la plante hôte. Au sein de l'ADN-T, on trouve deux catégories de gènes : les oncogènes et les gènes liés à l'opine. Les oncogènes sont impliqués dans la biosynthèse des phytohormones : le gène *iaaM* code pour l'enzyme tryptophane mono-oxygénase, qui transforme le tryptophane en indole-3-acétamide (IAM).

La protéine *IaaH* agit par la suite en hydrolysant l'IAM pour former de l'acide 3-indole-acétique (AIA : fait partie de la famille des auxines). Le gène *ipt* code pour une isopentényl transférase qui catalyse la synthèse de la cytokinine. L'accumulation de l'AIA et de la cytokinine perturbe l'équilibre hormonal, provoquant une prolifération incontrôlée des cellules transformées et aboutissant à la formation de tumeurs sur le site de l'infection (Tzfira & Citovsky, 2007). Les gènes de la deuxième catégorie de l'ADN-T sont essentiels pour la production d'opines, qui sont des composés à faible poids moléculaire dérivés d'acides aminés. La nature de ces opines varie selon le type de plasmide porté par la souche pathogène d'*Agrobacterium*, les plus étudiées étant l'octopine et la nopaline. Par exemple, la souche *A. tumefaciens* C58 contient un plasmide ADN-T de type nopaline, tandis que celui de B6 est liée à l'octopine (Kim et al., 2001).

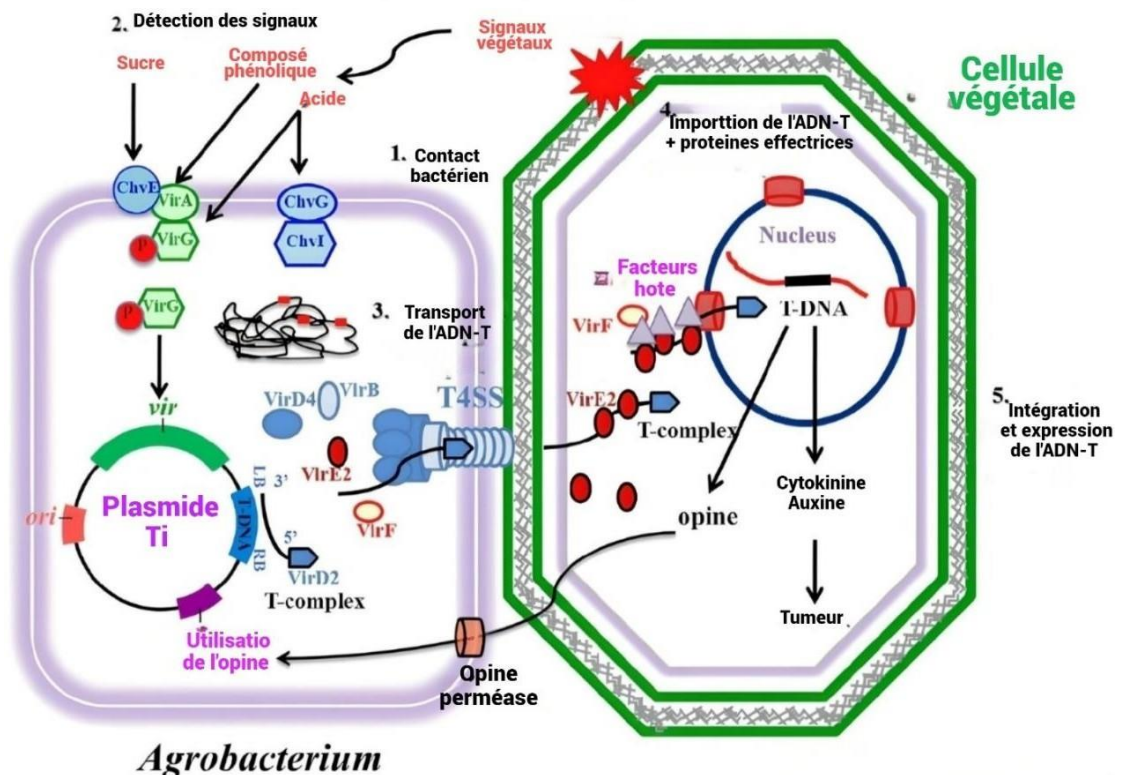


Figure 4: Mécanisme d'infection des cellules végétales par *Agrobacterium* (Hwang et al., 2017)

## I.7 Les symptômes de la maladie

La galle du collet se caractérise par la formation de croissances tissulaires anormales ou tumeurs au niveau du collet des plantes. Dans certains cas, ces excroissances peuvent également se développer sur les parties aériennes de la plante.

Les tumeurs observées sont généralement de forme plus ou moins sphérique, avec une couleur blanchâtre, une texture spongieuse et une surface irrégulière. Les dimensions et les couleurs de ces tumeurs varient en fonction de l'espèce infectée, de la partie de la plante touchée et de l'évolution de la maladie au fil du temps. À mesure que les galles vieillissent, elles augmentent en taille, prennent une teinte brunâtre, se durcissent et finissent par craqueler (Marty, 2016). Lorsque ces excroissances deviennent volumineuses, le système racinaire de l'arbre devient altéré, entraînant des problèmes de transport de l'eau et des nutriments. Lors des attaques sévères, l'arbre peut faire face à des problèmes de malnutrition, paraît frêle, demeure nain, présente des anomalies de coloration du feuillage et produit peu de fruits. Dans le cas extrême, la galle du collet peut causer la mort des plantes, principalement en raison de l'invasion de pathogènes secondaires dans les plantes affaiblies (El Arbi et al., 2011).

### **I.8 Dégâts provoqués par la maladie**

La galle du collet est considérée comme l'une des maladies bactériennes des plantes transmises par le sol ayant le plus d'impact économique à travers le monde pouvant aller jusqu'à 60 % (Kado, 2002). Elle affecte négativement une grande variété de plantes, en particulier dans le bassin méditerranéen et dans plusieurs autres régions où les cultures arboricoles sont cultivées dans des conditions climatiques similaires à celles de la région méditerranéenne (Bouri et al., 2016). Les plantes qui ont été enregistrées comme étant touchées par la maladie comprennent la vigne, les arbres fruitiers de la famille des prunoïdes et pommoïdes, les plantes ornementales telles que les rosiers, ainsi que les arbres forestiers, les noyers et les eucalyptus (Hert & Jones, 2003). En Tunisie, la maladie de la galle du collet a été initialement identifiée en 1958 suite à l'introduction de plants de diverses espèces fruitières par le biais d'importations (Rhouma et al., 2004). En 1995 et 2004, des attaques massives ont été enregistrées, entraînant l'incinération d'environ 197600 plants en moyenne chaque année. En 2011, des tumeurs au niveau des racines des oliviers de la variété Chemlali ont été détectées pour la première fois dans la région de Kairouan (El Arbi et al., 2011). À l'heure actuelle, cette maladie est largement répandue dans tout le pays, ce qui constitue une menace sérieuse pour la production de fruits, notamment pour les espèces à noyau. Afin de limiter la propagation de la maladie, la réglementation tunisienne fixe un seuil strict de 1 %, au-delà duquel les lots infectés doivent être incinérés (décret ministériel du 31/12/1980).

## I.9 Contrôle d'*A. tumefaciens*

Une fois que la plante est infectée par *A. tumefaciens*, la lutte curative contre la maladie devient extrêmement difficile, car même en l'absence de la bactérie, la croissance de la tumeur continue à progresser. Par conséquent, la méthode de contrôle la plus efficace est la prévention de la galle du collet (**Escobar & Dandekar, 2003**). Diverses méthodes biologiques, chimiques et culturales sont utilisées pour limiter la propagation de la maladie.

### I.9.1 Contrôle chimique

La méthode de lutte chimique, qui implique l'utilisation de pesticides tels que l'hydroxyde de cuivre couramment utilisé, s'est avérée inefficace. Cela est dû en partie à la résistance développée par les agents pathogènes, ainsi qu'à sa phytotoxicité potentielle pour certaines espèces végétales (**Agrios, 2008**). Il n'y a actuellement pas de méthodes de contrôle chimiques efficaces pour traiter la galle du collet. Bien que les antibiotiques et les bactéricides à base de cuivre puissent tuer la bactérie au contact, ils ne sont pas en mesure de pénétrer dans les plantes et ne peuvent donc pas éliminer les bactéries qui y résident de manière systémique (**Burr, 2004**). Le traitement préalable des sols par fumigation au bromure de méthyle avant la plantation s'avère une méthode efficace pour réduire temporairement les populations d'*Agrobacterium* dans le sol (**Agrios, 2005**).

### I.9.2 Contrôle cultural

Les pratiques culturales jouent un rôle primordial dans la prévention de l'installation et de la propagation de la maladie. Bien qu'elles soient efficaces pour limiter le risque, il est important de souligner qu'elles ne sont pas en mesure de réprimer la maladie de manière absolue. Maintenir une hygiène rigoureuse sur le terrain est absolument essentielle dans toutes les activités afin d'empêcher l'installation des souches d'*Agrobacterium*. Pour minimiser les risques de pénétration de ce phytopathogène dans les plantes, il est important de veiller à ne pas causer de blessures lors des activités agronomiques courantes telles que le désherbage et la taille. Certaines mesures prophylactiques de prévention, telles que la solarisation et les amendements du sol, se sont avérées efficaces dans certains cas comme applications préalables à la plantation pour contrôler la propagation de la bactérie responsable de la galle du collet (**Gupta & Khosla, 2007; Gupta & Kamal, 2011**).

### I.9.3 Contrôle biologique

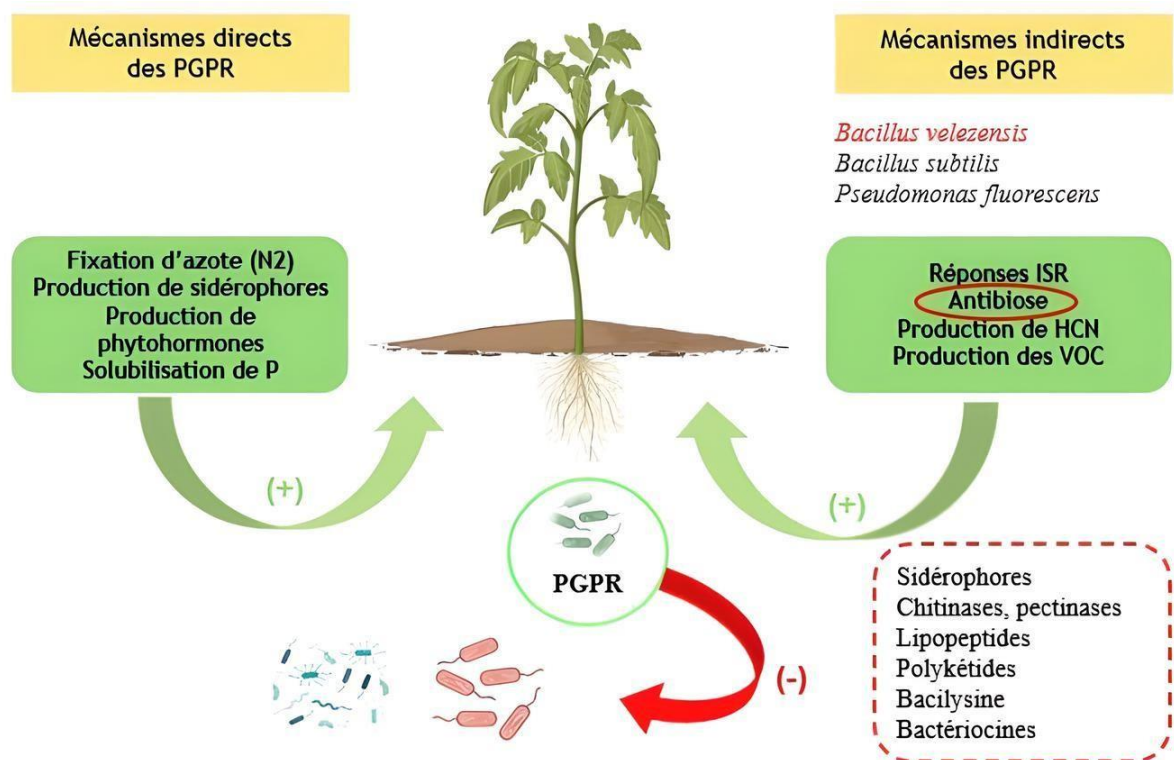
La lutte biologique contre la galle du collet a connu des avancées significatives grâce à l'utilisation de la souche non pathogène *A. radiobacter* K84 (également connue sous le nom d'*A. rhizogenes*), qui porte le plasmide de résistance pAg84 codant pour la bactériocine agrocin 84. L'utilisation de cette méthode a été fructueuse pendant plusieurs décennies (**Shim, 1987**). Cependant, malgré son efficacité passée, des défis se sont présentés. Le transfert conjugal des gènes contrôlant l'agrocin 84 vers les souches d'*Agrobacterium* a entraîné l'émergence d'une résistance, limitant ainsi l'efficacité de cette stratégie. Pour surmonter cette résistance, une souche génétiquement modifiée appelée K1026 a été spécialement développée, bien qu'elle soit soumise à des restrictions légales dans certains pays (**Jones & Kerr, 1989**). Par conséquent, il devient impératif d'explorer des méthodes novatrices pour une gestion efficace de la maladie de la galle du collet et prévenir l'établissement d'*A. tumefaciens*. Plusieurs travaux ont été entrepris pour la recherche de nouveaux microorganismes plus efficaces. Diverses bactéries appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Bacillus* ont été testées (**Rhouma et al., 2008**). Parmi ces dernières, certaines se sont avérées très actives *in vitro*, mais sans avoir un effet significatif au champ (**Rhouma et al., 2008**).

## II. *Bacillus velezensis* : excellent modèle de PGPR pour le biocontrôle en agriculture

À l'interface entre le sol et le système racinaire de la plante, il existe une niche écologique très particulière, à savoir la rhizosphère. Celle-ci correspond à la fraction du sol attachée aux racines où les propriétés biologiques et chimiques du sol sont affectées par les racines (**Prasad et al., 2019**). Dans ce microenvironnement, la plante libère divers éléments carbonés appelés exsudats racinaires (ou photosynthétats : carbohydrates, sucres, acides organiques, flavonoïdes, nucléotides, enzymes, hormones, composés volatils et ions inorganiques), représentant 15 à 20 % du carbone net fixé par la photosynthèse (**Haichar et al., 2014**). Ceci en fait une niche écologique privilégiée, comparée au sol nu relativement pauvre en nutriments pour de nombreux microorganismes tels que les champignons, protozoaires, algues et bactéries. Il a été démontré que ces microbes peuvent avoir soit un impact bénéfique, soit nocif ou neutre en termes d'interaction avec les plantes (**Glick, 2015**). Parmi ces microorganismes, les bactéries connues sous le nom de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont les plus

prometteuses et les plus abondantes parmi toutes les autres dans la rhizosphère (Vejan et al., 2016; Prasad et al., 2019). Généralement, environ 2 à 5 % des bactéries de la rhizosphère sont des PGPR (Siddikee et al., 2010). Ces PGPR améliorent directement la croissance des plantes en augmentant l'absorption des nutriments (azote, phosphore, potassium et minéraux essentiels), en modulant les niveaux des hormones végétales, ou indirectement en sécrétant des métabolites pour inhiber les agents pathogènes. Ils assurent une protection contre les pathogènes en restreignant directement l'accès aux nutriments, en produisant des métabolites qui inhibent la croissance des pathogènes, ou indirectement en induisant des réponses systémiques chez les plantes hôtes (Backer et al., 2018). Les modes d'action des PGPR sont résumés dans la [figure 5](#). En effet, pour les personnes préoccupées par la protection de l'environnement et la durabilité agricole, les PGPR sont considérées comme l'une des meilleures stratégies pour relever le double défi de la sécurité alimentaire mondiale et la stabilité environnementale. Un large éventail d'espèces appartenant au genre *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* et *Serratia* ont montré la capacité de coloniser la rhizosphère et d'améliorer la croissance des plantes (Arora et al., 2017). Le genre *Bacillus* est largement étudié parmi les PGPR, et des recherches ont établi son efficacité pour stimuler la croissance, renforcer les mécanismes de défense des plantes et supprimer la croissance des agents pathogènes (Pršić & Ongena, 2020; Luo et al., 2022; Etesami et al., 2023). L'activité de biocontrôle des espèces de *Bacillus* découle principalement de leur aptitude à générer une large gamme de composés chimiques diversifiés. Suite au séquençage du génome de diverses espèces de ce genre à l'aide de la méthode de séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing, NGS) et de l'exploitation de l'outil d'analyse du génome antiSMASH, plusieurs clusters de gènes biosynthétiques codant pour la synthèse de métabolites secondaires bioactifs, ont été repérés (Chen et al., 2007; Kunst et al., 1997; Xu et al., 2018). Particulièrement, les souches de *B. velezensis* se distinguent des autres espèces de *Bacillus* en raison de leur richesse en gènes de biosynthèse de métabolites secondaires représentant environ 12 % du génome total (Chowdhury et al., 2015; Molinatto et al., 2016; Pandin et al., 2018). Alors que, les souches de *B. subtilis* ne consacrent que 5 % de leur génome à cette fonction (Stein, 2005). Cela fait de *B. velezensis* une des espèces de *Bacillus* les plus efficaces et les plus couramment utilisées en biocontrôle et pour la promotion de la croissance des plantes (Trinh et al., 2018; Rabbee et al., 2019; Luo et al., 2022). En revanche, d'autres espèces du groupe *Bacillus*, telles que *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. subtilis*, produisent une diversité plus limitée de métabolites

secondaires (Harwood et al., 2018; Andrić et al., 2020). En tant que PGPR, ces bactéries assurent la protection des plantes en utilisant différentes stratégies telles que l'antibiose directe, la compétition avec d'autres microbes pathogènes pour les nutriments et l'espace, ainsi que leur capacité à induire une résistance systémique des plantes (ISR) (Dimkić et al., 2022). Dans cette étude, un intérêt est porté envers le mode d'action antibiose des bactéries de *B. velezensis*. Après avoir détaillé leurs différentes caractéristiques, nous présenterons leur intérêt en tant qu'agents de biocontrôle ainsi que leur potentiel à produire des métabolites secondaires bioactifs utilisés pour la protection des plantes.



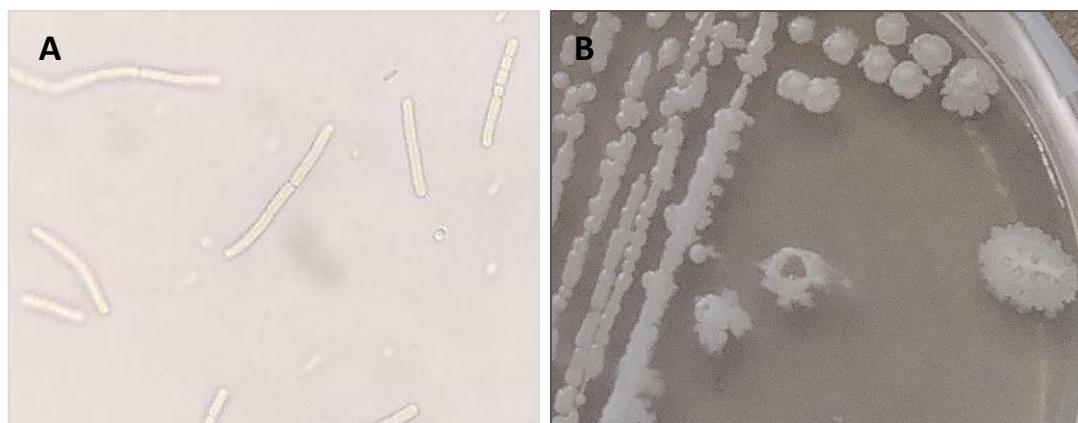
**Figure 5:** Mécanismes d'action des PGPR (Rhizobactéries Promotrices de la Croissance des Plantes).

Leur action bénéfique sur la croissance des plantes se manifeste par plusieurs mécanismes : Elles améliorent la disponibilité des éléments nutritifs essentiels en favorisant une meilleure nutrition minérale, produisent des hormones et d'autres substances qui stimulent la croissance des végétaux, renforcent les systèmes de défense des plantes contre les stress biotiques et abiotiques, et participent à la protection des plantes contre les agents pathogènes (d'après Nazir et al., 2019)

## II.1 Description de l'espèce *B. velezensis*

*B. velezensis* est une espèce de bactérie aérobie à Gram-positif, formatrice d'endospores résistantes à des conditions environnementales défavorables, ce qui lui permet de survivre dans des environnements hostiles pendant de longues périodes. Cette caractéristique en fait un candidat particulièrement adapté à la formulation de bioproduits (Kumar et al., 2011).

Les cellules sont des bâtonnets (bacilles), de taille 0,5 x 1,5–3,5 µm. Elles sont observées tant individuellement qu'en paires, et parfois en courtes chaînes. Elles sont mobiles grâce à des flagelles péritriches. Leur capacité à survivre aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies facultatives leur permet de croître dans divers environnements. Sur le milieu tryptone soja (TSA), on observe la croissance de colonies de couleur blanc crème, présentant une texture rugueuse et des bords légèrement irréguliers (**Figure 6**). Elles sont capables de supporter des concentrations de NaCl allant jusqu'à 12 %, une plage de température allant de 15 à 45 °C, et une plage de pH de 5 à 10 (**Ruiz-García et al., 2005**). *B. velezensis* est une bactérie ubiquitaire retrouvée fréquemment dans divers environnements, principalement dans le sol, l'eau, les racines des plantes et les aliments fermentés (**Cho et al., 2018; Nguyen et al., 2019; Wekesa et al., 2022**). Cette bactérie est réputée pour sa capacité à synthétiser une large variété de métabolites secondaires, incluant des antibiotiques, des enzymes, des antifongiques et d'autres composés bioactifs. Elle bénéficie du statut d'organisme généralement reconnu comme safe (GRAS) délivré par la loi fédérale américaine sur les produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (FDCA) (**Sewalt et al., 2016**). Ces caractéristiques font de *B. velezensis* un microorganisme d'un grand intérêt pour de multiples applications dans les secteurs industriel, agricole et médical.



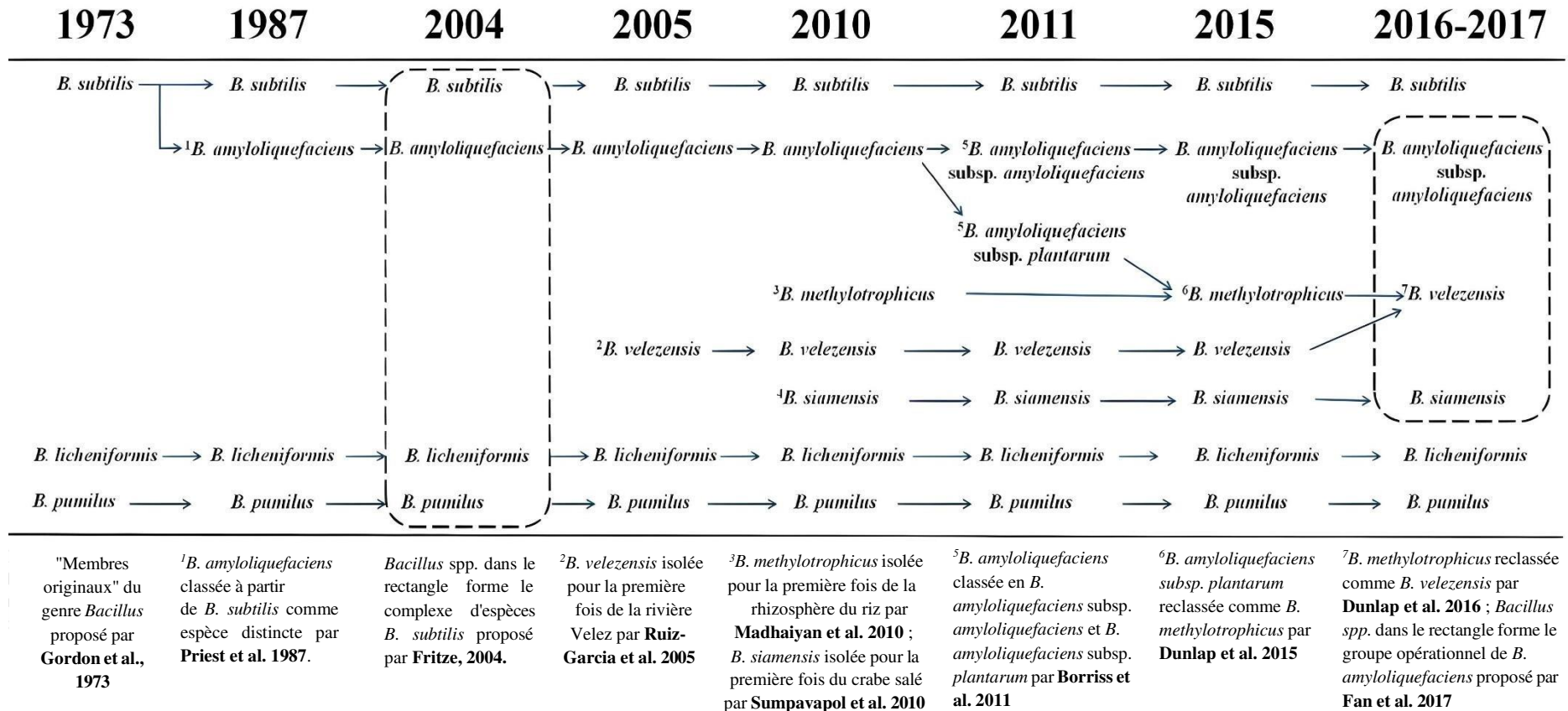
**Figure 6:** A: Observation microscopique des cellules de *B. velezensis* 32a (x100) B: Colonies de *B. velezensis* 32a

## II.2 Classification

Le complexe de *B. subtilis* englobe *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* (**Fritze, 2004**) (**Figure 7**). Plus tard, d'autres espèces ont été isolées et attribuées à ce complexe à savoir; *B. velezensis* (**Ruiz-García et al., 2005**), *B. siamensis* (**Sumpavapol et al., 2010**) et *B. methylotrophicus* (**Madhaiyan et al., 2010**).

---

En 2005, *B. velezensis* a été isolée pour la première fois à partir d'échantillons environnementaux prélevés à l'embouchure de la rivière Vélez à Torredelmar, dans la province de Malaga en Espagne (**Ruiz-García et al., 2005**). Puis, en 2011, le séquençage génomique des bactéries de *B. amyloliquefaciens* a permis de distinguer deux sous espèces qui sont *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (bactérie modèle DSM7) et *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (bactérie modèle FZB42) (**Borriss et al., 2011**). En 2015, une analyse génomique a révélé des similarités de 95 % entre *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* et *B. methylotrophicus*, ce qui a conduit à les considérer comme synonymes (**Dunlap et al., 2015**). Ensuite, *B. methylotrophicus* a été considérée comme synonyme de *B. velezensis* en raison de la similitude phénotypique et génotypique élevée entre ces deux taxons (**Dunlap et al., 2016**). En 2017, en analysant la sous-unité bêta de l'ARN polymérase complète (*rpoB*) ainsi que d'autres données, 66 souches étroitement liées à *B. amyloliquefaciens* ont été regroupées dans un ensemble appelé le "groupe opérationnel de *B. amyloliquefaciens*". Ce groupe se divise en trois branches très liées : (1) *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*, (2) *B. siamensis* et (3) *B. velezensis*, un groupe qui englobe toutes les souches précédemment classées comme *B. velezensis*, *B. methylotrophicus* et *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (**Fan et al., 2017**). Depuis, plusieurs espèces de *B. amyloliquefaciens*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* et *B. methylotrophicus* ont été reclassées sous *B. velezensis* (**Rabbee et al., 2019**). Toutefois, dans de nombreuses publications récentes, le terme *B. amyloliquefaciens* est encore utilisé au lieu de *B. velezensis* (**Luo et al., 2022; Xin et al., 2022**).



**Figure 7:** Classification et regroupement phylogénique des souches de *Bacillus amyloliquefaciens* dans le "groupe opérationnel de *B. amyloliquefaciens*" divisé en trois branches: (1) *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*, (2) *B. siamensis* et (3) *B. velezensis*, un groupe conspécifique qui englobe toutes les souches précédemment classées comme *B. velezensis*, *B. methylotrophicus* et *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (**Dunlap et al., 2016; Fan et al., 2017**)

### II.3 Implication de *B. velezensis* dans la lutte contre les phytopathogènes: Antibiose

Le revenu annuel généré par le biocontrôle à l'échelle mondiale s'élève à 4 milliards de dollars, avec une prévision de demande atteignant les 10,6 milliards de dollars d'ici 2027 (Collinge et al., 2022). En particulier, les agents de biocontrôle à base de *Bacillus*, présentent généralement une activité plus élevée que ceux dérivés d'autres PGPR (tels que les *Pseudomonas* ou *Streptomyces*), en raison de leur capacité à sécréter divers métabolites secondaires, à coloniser efficacement les racines et à former des spores, ce qui contribue à l'amélioration de la viabilité cellulaire dans les formulations commerciales (Dunham Trimmer, 2023; Helepciuc & Todor, 2023). Par exemple, Botrybel (*B. velezensis*), RhizoVital® (*B. velezensis* FZB42<sup>T</sup>), Serenade (*B. velezensis* QST713), Kodiak TM (*B. velezensis* GB03) et Taegro® (*B. velezensis* FZB24) sont des illustrations d'agents de biocontrôle couramment utilisés dans la gestion des maladies des plantes (Fazle Rabbee & Baek, 2020). Des recherches antérieures ont mis en évidence le potentiel de *B. velezensis* dans le contrôle de pathogènes tels que *Rhizoctonia solani* (Ali et al., 2022), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Kang et al., 2019), *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Jiang et al., 2019), *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* et *Phytophthora infestans* (Yan et al., 2021). L'implication de *B. velezensis* dans le biocontrôle par le mécanisme d'antibiose repose sur sa capacité à produire une variété de métabolites secondaires bioactifs, qui lui confèrent une capacité de biocontrôle efficace contre divers pathogènes des plantes tels que les champignons et les bactéries (Tableau 2). Contrairement aux métabolites primaires, qui sont essentiels aux fonctions vitales des bactéries, les composés secondaires n'ont pas un rôle direct dans ces processus (Vaishnav & Demain, 2011). Toutefois, ils peuvent procurer un avantage évolutif significatif à ces microorganismes. En effet, la production de ces métabolites secondaires par l'espèce bactérienne peut lui permettre de se défendre plus efficacement, en préservant son espace vital face à la concurrence pour les ressources dans son habitat ou biotope (Demain & Fang, 2000). De plus, certains de ces composés peuvent jouer un rôle essentiel dans la communication interspèces (Dufour & Rao, 2011). Ils peuvent également aider les bactéries à s'adapter à des environnements difficiles ou à des conditions stressantes, contribuant ainsi à leur résilience et à leur survie (Mandwal, 2022). Les métabolites secondaires sont des dérivés des précurseurs qui sont fournis par le processus du métabolisme primaire. Ils sont produits par les souches sauvages, mais généralement en faible quantité, et cela se produit généralement dans certaines conditions environnementales spécifiques ou en réponse à des stimulations particulières (Ruiz et al., 2010).

---

Ces métabolites sont généralement inoffensifs pour les plantes et les animaux, ce qui en fait des agents de biocontrôle safe et respectueux de l'environnement (EFSA, 2014). Une part significative du patrimoine génétique de *B. velezensis* est réservée à la synthèse de composés antimicrobiens (Pandín et al., 2018). La production de métabolites secondaires bactériens par *B. velezensis* est un processus complexe qui peut s'effectuer *via* deux voies majeures de biosynthèse: la synthèse ribosomique et la synthèse non ribosomique. Dans la synthèse ribosomique, les peptides sont générés à partir de l'assemblage de leurs acides aminés constitutifs par les ribosomes, suivi éventuellement de modifications post-traductionnelles. La synthèse non ribosomique implique l'action de méga-enzymes complexes, nommées peptides synthétases non ribosomique (NRPS) ou polykétide synthases (PKS). Ces méga-enzymes sont responsables de l'assemblage séquentiel des acides aminés ou des dérivés de malonyl en chaînes peptidiques (NRPS) ou polykétides, respectivement (Fazle Rabbie & Baek, 2020). Les produits finaux de ces voies de synthèse peuvent être variés, incluant les bactériocines, les lipopeptides (LPs), les polykétides (PKs) et la bacilysine.

Tableau 2: Métabolites secondaires de *B. velezensis* et leur efficacité contre les phytopathogènes (Rabbee et al., 2023)

| Souches de <i>B. velezensis</i> | Composés antimicrobiens             | Pathogènes cibles (Maladies des plantes)   | Références            |
|---------------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------|
| <i>B. velezensis</i> FZB42      | Bacillomycine D                     | <i>Fusarium graminearum</i> (Fusariose de l'épi)   | (Gu et al., 2017)     |
| <i>B. velezensis</i> FZB42      | Difficidine et bacilysine           | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Brûlure bactérienne du riz); <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (Strie bactérienne des feuilles) | (Wu et al., 2015)     |
| <i>B. velezensis</i> FZB42      | Bacilysine                          | <i>Phytophthora sojae</i> (Pourriture des racines du soja)   | (Han et al., 2021)    |
| <i>B. velezensis</i> Y6 et F7   | Surfactines, iturines et fengycines | <i>Ralstonia solanacearum</i> (Flétrissement de la tomate);<br><i>F. oxysporum</i> (Flétrissement de la banane)                                  | (Cao et al., 2018)    |
| <i>B. velezensis</i> SQR9       | Bacillomycine D                     | <i>F. oxysporum</i><br>(Flétrissement vasculaire du concombre)   | (Xu et al., 2013)     |
| <i>B. velezensis</i> MEP218     | Fengycines                          | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i><br>(Maladie des taches bactériennes)  | (Medeot et al., 2019) |
| <i>B. velezensis</i> G341       | Bacillomycine L et fengycine A      | <i>Alternaria panax</i> , <i>F. oxysporum</i> ,<br><i>B. cinerea</i> , <i>Phytophthora capsici</i>   | (Lim et al., 2017)    |
| <i>B. velezensis</i> CC09       | Iturine A                           | <i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i><br>(Piétin-échaudage) et<br><i>Bipolaris sorokiniana</i> (tache de blé)                                   | (Kang et al., 2018)   |
| <i>B. velezensis</i> NJN-6      | Macrolactines                       | <i>Ralstonia solanacearum</i>  | (Yuan et al., 2012)   |

### II.3.1 Synthèse non ribosomique des lipopeptides des polykétides et de la bacilysine

Dans les années 1960, des recherches menées par des scientifiques norvégiens et japonais sur la biosynthèse de la gramicidine S, un décapeptide cyclique produit par *Bacillus brevis*, ont révélé que les extraits cellulaires de la bactérie, en présence de RNAses ou d'inhibiteurs de la synthèse ribosomique, étaient incapables de synthétiser des protéines mais pouvaient toujours produire cet antibiotique (Tomino et al., 1967). En 1968, sous la direction de Fritz Lipmann, l'équipe a pu isoler les enzymes responsables de la synthèse de la gramicidine S. Ces enzymes sont appelées peptide synthétases non ribosomique ou « Non Ribosomal Peptide Synthetases » (NRPS) (Gevers et al., 1968). Ce mécanisme non ribosomique est responsable de la synthèse des métabolites secondaires assemblés par des complexes enzymatiques appelés des synthétases de peptides nonribosomique et des synthétases de polykétides (PKS pour l'anglais Polyketide Synthase). On retrouve également des métabolites synthétisés par des complexes enzymatiques hybrides PKS-NRPS (Arguelles Arias, 2011). Ces complexes multi-enzymatiques sont produits par la voie ribosomique traditionnelle, à travers les étapes de transcription, traduction et maturation (Finking & Marahiel, 2004). Les NRPS utilisent comme substrat des acides aminés, et l'élongation est réalisée par liaison peptidique. Les PKS utilisent comme substrat l'acylcoenzyme A, et les monomères sont assemblés *via* une réaction de condensation de Claisen. Ces métabolites présentent des particularités au niveau de leur composition chimique, de leur structure et de leur spectre d'activités biologiques. Pour les microorganismes producteurs tels que les bactéries et les champignons, ces molécules jouent un rôle important dans la défense contre des espèces concurrentes lorsque les ressources nutritives sont limitées.

#### II.3.1.1 Synthèse peptidique non ribosomique

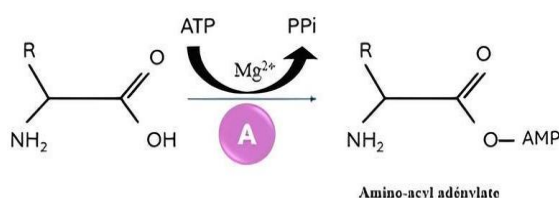
La synthèse peptidique non ribosomique est un processus complexe qui permet la formation de peptides à partir des acides aminés sans impliquer les ribosomes mais réalisée par des complexes multienzymatiques nommés NRPS.

##### II.3.1.1.1 Organisation structurale des NRPS

Pendant la synthèse d'un peptide, plusieurs gènes codant pour des synthétases peuvent intervenir. Ces gènes sont généralement organisés en opérons ou en « clusters » au niveau du génome (Ongena & Jacques, 2008). Chaque gène du cluster code pour des synthétases qui sont organisées en modules dont le nombre varie de 2 à une vingtaine (Stachelhaus &

**Marahiel, 1995**). Ces modules sont responsables de l'incorporation d'un acide aminé, de son activation et de la formation des liaisons peptidiques avec l'acide aminé reconnu par le module précédent (**Felnagle et al., 2008**). Les modules sont classés en trois catégories : les modules d'initiation, d'élongation et de terminaison. Les modules sont eux même subdivisés en domaines catalytiques. Parmi les différents domaines présents chez les NRPS, 2 catégories peuvent être distinguées : les domaines principaux et les domaines secondaires. Les principaux domaines d'adénylation (A), de thiolation (T), de condensation (C) et de thioestérase (Te) sont essentiels à la synthèse et la libération d'un peptide. Ces domaines assument les fonctions suivantes :

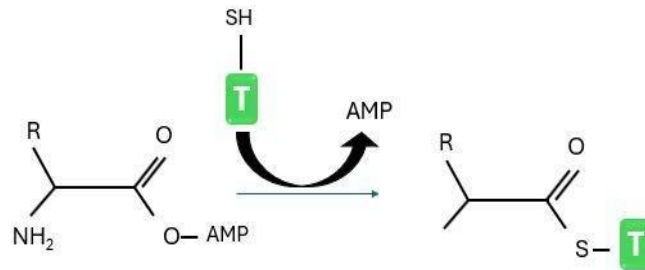
- **Le domaine d'adénylation (A)** : responsable de la sélection et de l'activation des acides aminés spécifiques incorporés dans le peptide non ribosomique. Le domaine A se structure en deux sous-domaines, l'un plus court du côté C-terminal et l'autre plus long, où le site actif est situé, du côté N-terminal. Initialement, l'acide aminé spécifiquement reconnu va se fixer dans la poche catalytique du domaine d'adénylation. Ensuite, une molécule d'ATP est consommée, entraînant la fixation de la fraction adénosine de l'AMP sur le monomère présent, ce qui génère un amino-acyl adénylate (**Challis & Naismith, 2004**) (**Figure 8**).



**Figure 8** : Réaction d'activation d'un acide aminé en aminoacyl adénylate par le domaine A (d'après **Bricout, 2020**)

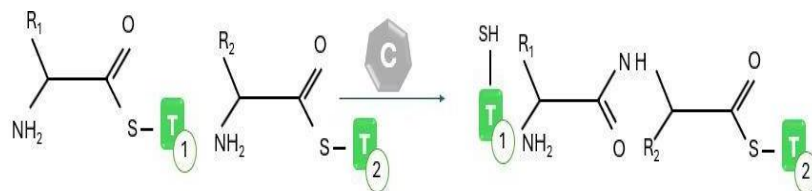
- **Le domaine de thiolation (T)**: aussi appelé domaine **PCP** pour « Peptidyl Carrier Protein », permet à l' amino-acyl adénylate préalablement activé par le domaine d'adénylation de se fixer de manière covalente sur la synthétase par l'intermédiaire d'une liaison thioester pour former un intermédiaire amino-acyl-thioester. Cette fixation est effectuée en présence d'un bras **phosphopantéthéine** terminé par un groupement sulfhydryle ajouté à la NRPS lors des modifications post-traductionnelles (**Weber et al., 2000**). L'ajout de ce bras sur le domaine de thiolation est réalisé par une phosphopantéthéine transférase (**PPTase**) codée chez *Bacillus* sp. par le gène *sfp*.

Cette enzyme catalyse la fixation du groupement 4'- phosphopantéthéine, provenant du coenzyme A, sur le groupement hydroxyl d'une sérine du domaine de thiolation. Ce bras est indispensable pour convertir la NRPS de la forme apo à la forme active holo (**Beld et al., 2014**) (**Figure 9**).



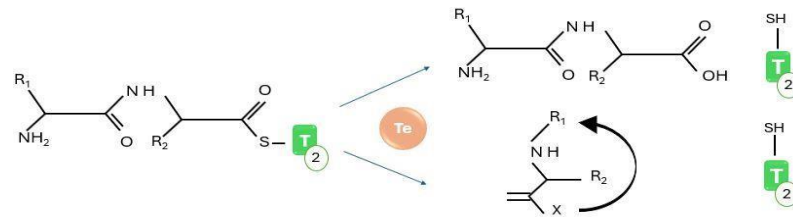
**Figure 9:** Thiolation de l' aminoacyl adénylate activé (d'après **Bricout, 2020**)

- **Le domaine de condensation (C) :** Catalyse la formation de la liaison peptidique entre les différents acides aminés composant le peptide non ribosomique. Ce domaine s'organise en deux sous-domaines contenant respectivement des sites de fixation permettant d'accueillir les monomères, portés par les domaines de thiolation de deux modules successifs, entre lesquels la liaison va s'établir (**Weber & Marahiel, 2001**) (**Figure 10**).



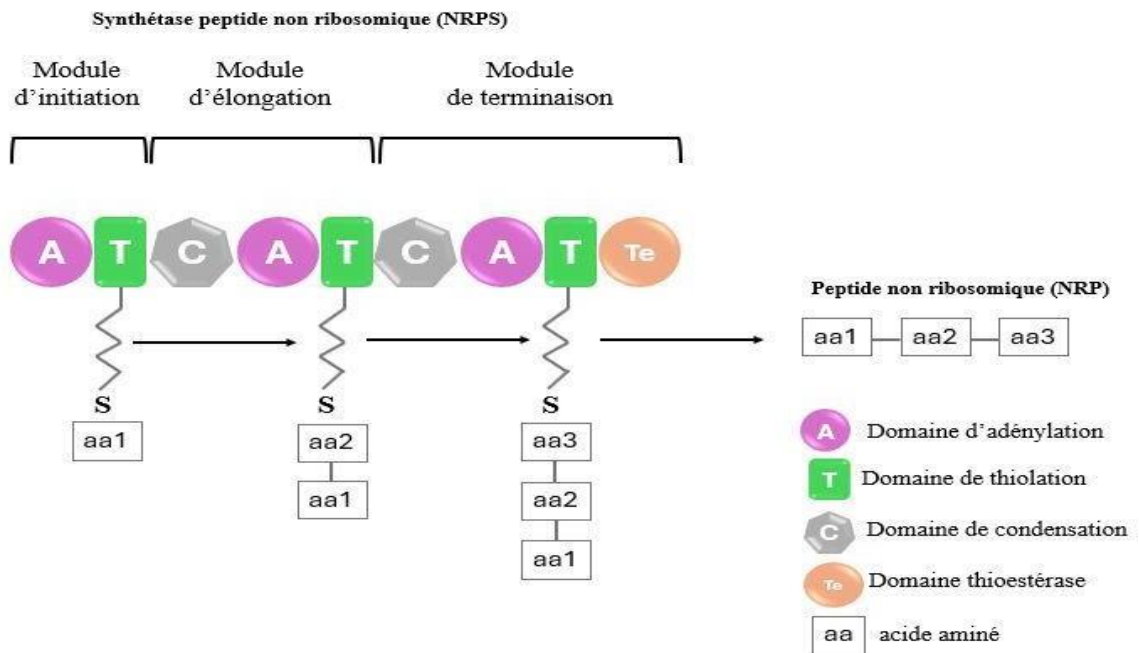
**Figure 10:** Établissement de la liaison peptidique entre deux acides aminés par le domaine de condensation (d'après **Bricout, 2020**)

- **Le domaine thioestérase (Te) :** Favorise la libération du peptide nouvellement formé de deux manières, soit en déclenchant l'hydrolyse de la liaison thioester qui lie le peptide au domaine T du module de terminaison pour produire un peptide linéaire (**Bruner et al., 2002**); soit en favorisant une cyclisation donnant ainsi naissance à un peptide cyclique ou partiellement cyclique (**Sieber & Marahiel, 2003**). À la différence des autres domaines qui sont présents de manière répétitive, le domaine Te n'est présent que dans le module de terminaison (**Figure 11**).



**Figure 11:** Réaction de libération du peptide néoformé par le domaine Te (d'après **Bricout, 2020**)

Une synthétase débute par un module d'initiation qui contient seulement un domaine A et un domaine T. Ensuite le module 2 d'élongation est composé de trois domaines à savoir un domaine C, un domaine A et un domaine T (**Lautru & Challis, 2004**). Enfin, le troisième module de terminaison comprend en plus des domaines C, A et T un domaine Te (**Finking & Marahiel, 2004**) (**Figure 12**).



**Figure 12:** Représentation schématique de la structure modulaire des NRPS avec les domaines de base pour l'initiation, l'élongation et la terminaison (d'après **Bricout, 2020**)

En plus des domaines principaux, les domaines secondaires qui ne sont pas indispensables à l'assemblage des acides aminés, interviennent dans la modification structurale supplémentaire des peptides. Ces domaines assurent la rigidité structurale et la stabilité contre la dégradation protéolytique des peptides. Ils sont représentés principalement par les domaines de méthylation (Mt), d'épimérisation (E), de cyclisation (Cy) et d'oxydation (Ox). Ces domaines assurent les fonctions suivantes :

- **Le domaine d'épimérisation (E)** : Localisé entre les domaines T et C, ce domaine catalyse la conversion stéréochimique des acides aminés initialement reconnus et activés sous leur forme L, en leur isomère de forme D (**Stachelhaus & Walsh, 2000**).
- **Le domaine de méthylation (Mt)** : Incorporé à l'extrémité C-terminale du domaine A responsable de l'activation de l'acide aminé méthylé. Il existe deux types de méthylation : une N-méthylation effectuée par les N-méthyltransférases qui ajoutent un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) à l'atome d'azote de l'acide aminé et une C-méthylation effectuée par les C-méthyltransférases qui ajoutent un groupement méthyle sur un noyau thiazole (**Grünwald & Marahiel, 2006**).
- **Le domaine de cyclisation (Cy)** : Présente une forte homologie avec le domaine de condensation. Il catalyse la formation de petits hétérocycles obtenus par cyclisation de la chaîne latérale de la cystéine, la sérine ou la thréonine au cours de la synthèse du NRP. Le produit de cette cyclisation est un noyau thiazoline si une cystéine est impliquée; ou un noyau oxazoline s'il s'agit d'une sérine ou d'une thréonine (**Duerfahrt et al., 2004**).
- **Le domaine d'oxydation (Ox)**: Impliqué dans l'oxydation des cycles thiazolines et oxazolines formés par le domaine Cy en cycles thiazoles et oxazoles (**Schwarzer et al., 2003**).

#### II.3.1.1.2 Mode de synthèse des NRPS

Il existe trois types de biosynthèse selon le mode d'assemblage des acides aminés. Le mode d'assemblage linéaire est le plus fréquent où il existe une correspondance entre le nombre et l'ordre des modules de la synthétase et le nombre d'acides aminés incorporés dans le peptide. Il existe d'autres modes de synthèse plus atypiques comme celui de la synthèse itérative. Dans cette biosynthèse, les modules ou domaines de la synthétase peuvent être utilisés plus d'une fois lors de l'assemblage d'un même peptide. Le nombre d'acides aminés incorporés dans le peptide est alors supérieur au nombre de modules de la synthétase. C'est le cas des synthétases de la gramicidine S (**Kohli et al., 2001**). Le dernier mode rencontré est la biosynthèse non linéaire, caractérisée par une incorporation de petites molécules provenant d'une autre voie de synthèse. La mycosubtiline synthétase se distingue par sa capacité à regrouper les synthétases PKS et NRPS sur un seul gène (**Mareš et al., 2014**). La voie NRPS permet effectivement la production d'une variété de peptides linéaires ou cycliques, présentant une diversité en termes

de longueur et de structure, souvent sujettes à des modifications telles que la glycosylation, la phosphorylation, l'acylation, la cyclisation, ou d'autres transformations chimiques (**Grünewald & Marahiel, 2013**). Ces modifications contribuent à la diversité structurale et fonctionnelle des peptides en leur conférant de nouvelles propriétés biologiques, telles que des activités antibiotiques, antifongiques, antitumorales, immunosuppressives et d'autres activités thérapeutiques ou biologiques spécifiques (**Roongsawang et al., 2010**).

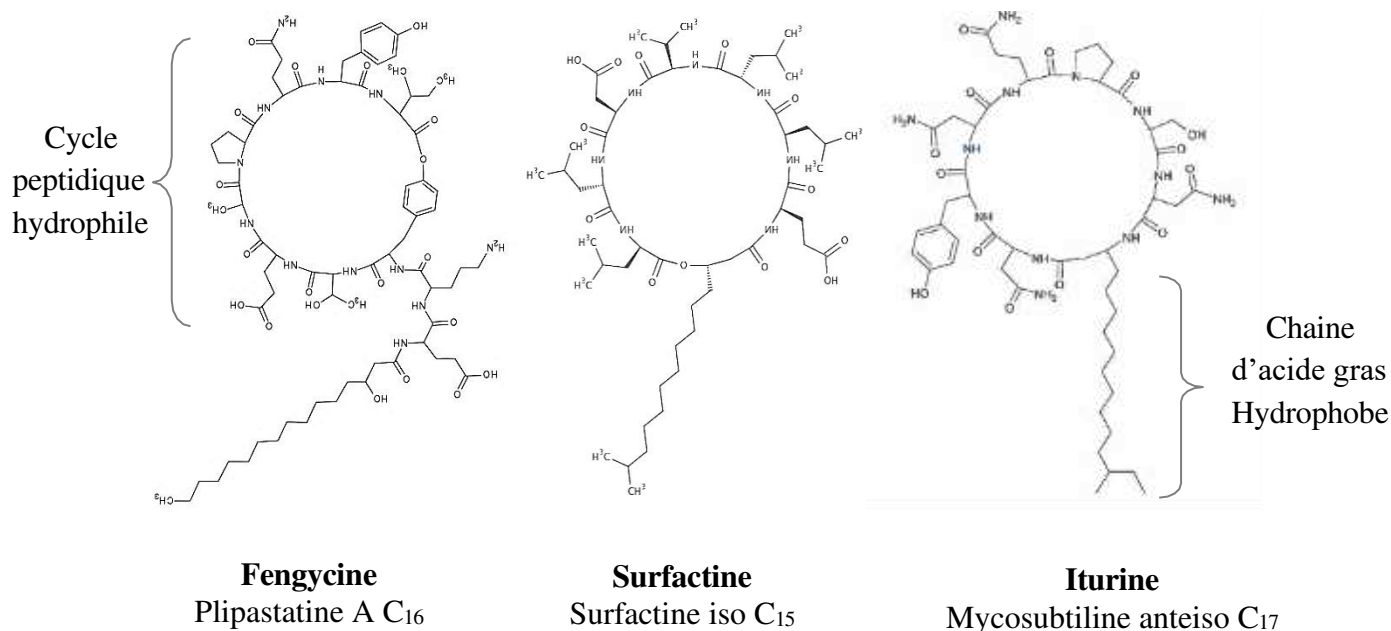
### **II.3.1.1.3 Les lipopeptides (LPs)**

#### **II.3.1.1.3.1 Métabolites secondaires présentant une forte valeur ajoutée**

Les lipopeptides (LPs) sont des molécules amphiphiles qui se composent à la fois d'une partie polaire et d'une partie apolaire dans leur structure. La partie polaire est en fait un peptide tandis que la partie apolaire est constituée d'un acide gras linéaire ou ramifié (**Ahimou et al., 2000**). Jusqu'à présent, les lipopeptides cycliques sont considérés comme le groupe le plus biologiquement actif, tandis que la recherche sur les lipopeptides linéaires a été peu développée (**Tran et al., 2019**). Les LPs ont été identifiés dans plusieurs genres de bactéries à Gram positif tels que *Bacillus*, *Paenibacillus* ou *Streptomyces*, ainsi que dans des bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas*. Ils ont également été isolés dans une variété de genres fongiques tels que *Phoma* et *Emericella* (**Oh et al., 2007; Herath et al., 2009; Zhao et al., 2019; Bekiesch et al., 2020**). La structure amphipathique confère aux lipopeptides diverses propriétés et applications dans plusieurs industries, y compris le domaine pharmaceutique (**Schultz & Rosado, 2020**), la transformation des aliments (**Meena & Kanwar, 2015**), les cosmétiques (**Hamley, 2015**), l'agriculture (**Penha et al., 2020**), et même la bioremédiation des métaux lourds et des hydrocarbures (**Bezza & Chirwa, 2015**). Il est rapporté que les lipopeptides présentent des activités biologiques diverses, dont des propriétés antimicrobiennes (**Heerklotz & Seelig, 2007**), immunomodulatrices (**Kelesidis, 2014**), antitumorales (**Wu et al., 2017**), ainsi que des propriétés tensioactives (**Desai & Banat, 1997**). Les LPs connaissent un essor significatif sur le marché, avec des projections de revenus annuels aux États-Unis excédant 1 milliard de dollars américains. Leur utilisation a également été approuvée dans plus de 70 pays à travers le monde (**Meena & Kanwar, 2015**).

Les lipopeptides produits par *Bacillus* sont de petites molécules composées généralement de 7 à 10 acides aminés associés à un acide gras bêta-hydroxylé contenant de 13 à 19 atomes de carbone (**Zhao et al., 2017**). Ces lipopeptides ont fait l'objet de nombreuses études approfondies (**Ongena & Jacques, 2008; Jacques, 2011; Dunlap et al., 2019**).

Ils peuvent être regroupés en trois familles selon la structure des peptides cycliques qui les composent : la surfactine, la fengycine et l'iturine (**Figure 13**). Chacune de ces familles possède une structure distinctive qui détermine leurs différentes propriétés biologiques.



**Figure 13:** Structures des membres représentatifs des lipopeptides (Desmyttere et al., 2019)

### II.3.1.1.3.2 Surfactines

La famille des surfactines est constituée de trois membres, notamment la surfactine produite par les souches de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* et *B. spizizeni*, la lichenysine produite par les souches de *B. licheniformis* (Horowitz et al., 1990), et la pumilacidine produite par les souches de *B. pumilus* (Naruse et al., 1990) et *B. safensis* (Domingos et al., 2015). En 1968, Arima et al. ont été les premiers à purifier et à caractériser la surfactine à partir du milieu de culture de *B. subtilis* où ils l'ont identifiée en tant que nouveau composé bioactif. Ces molécules amphiphiles, possèdent une structure cyclique heptapeptidique hydrophile qui consiste en une séquence d'acides aminés (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) reliée à une chaîne d'acide gras  $\beta$ -hydroxylée. Cette chaîne d'acide gras compte généralement entre 13 et 17 atomes de carbone (Zhou et al., 2019). À ce jour, quinze isoformes de surfactine (allant de C<sub>12</sub> à C<sub>17</sub>) ont été identifiées (Théâtre et al., 2021) (Tableau 3). La pumilacidine se distingue de la surfactine par la substitution d'une leucine en position 4, à la place d'une valine, et par la présence d'une isoleucine ou d'une valine en position 7, au lieu d'une leucine. La lichenysine, en revanche, diffère de la surfactine par une modification du premier acide aminé, où une glutamine (Gln) remplace l'acide glutamique présent dans la surfactine

(**Tableau 4**). La diversité structurale de la surfactine est accrue grâce à la plus faible spécificité des domaines d'adénylation des modules 2, 4 et 7 des synthétases qui peuvent activer différents résidus d'acides aminés, comme Leu, Val ou Ile, ainsi que Ala pour le module 4 (**Peypoux et al., 1991; Bonmatin et al., 2003**). Les surfactines A, B et C sont trois variantes de tensioactifs qui se distinguent par des variations dans leurs séquences d'acides aminés. La présence de L-leucine, L-valine et L-isoleucine à une position spécifique impliquée dans la formation du cycle lactone permet de différencier respectivement la surfactine A, B et C (**Singh & Cameotra, 2004**). La biosynthèse des surfactines est catalysée par un grand complexe multienzymatique non ribosomal composé de quatre blocs de construction modulaires : SrfAA, SrfAB, SrfAC, SrfAD (**Figure 14**).

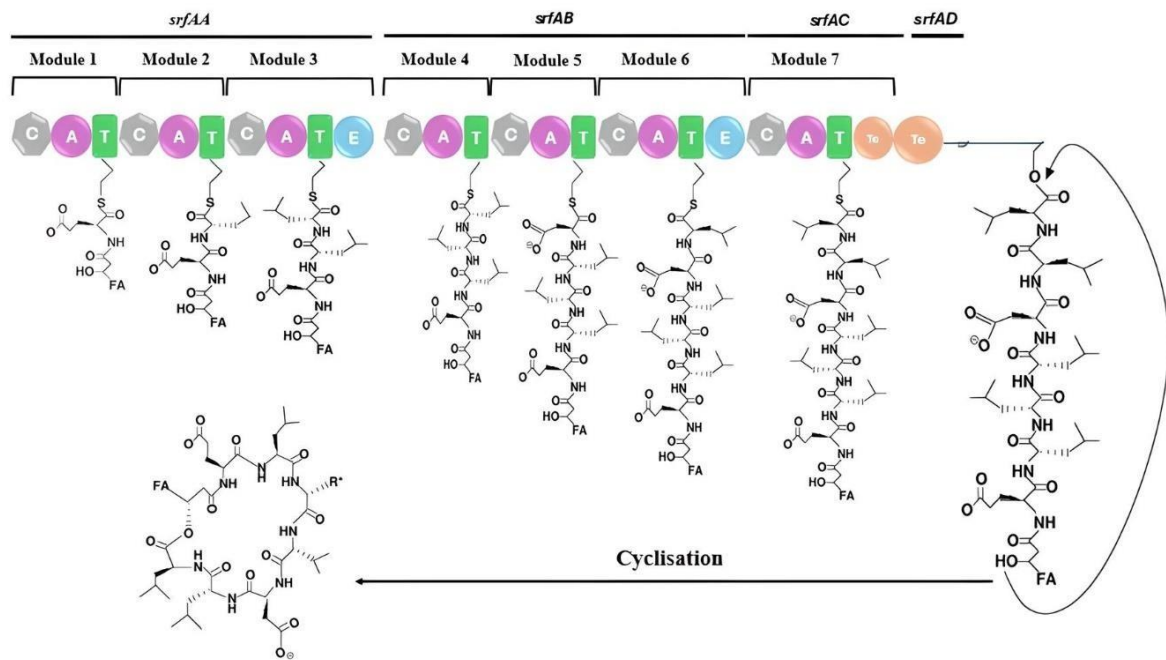
**Tableau 3:** Valeurs des masses molaires calculées (m/z) des ions  $[[M]+H, +Na, +K]^+$  correspondant aux isoformes des surfactines (d'après **la base de données de peptides non-ribosomiques : Norine et Qin et al., 2023**)

| Longueur de chaîne d'acide gras | Masse molaire théorique (m/z) | $[M+H]^+$ | $[M+Na]^+$ | $[M+K]^+$ |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|------------|-----------|
| 12                              | 993,63                        | 994,63    | 1016,61    | 1032,27   |
| 13                              | 1007,65                       | 1008,65   | 1030,63    | 1046,74   |
| 14                              | 1021,66                       | 1022,66   | 1044,64    | 1060,75   |
| 15                              | 1035,68                       | 1036,68   | 1058,66    | 1074,77   |
| 16                              | 1049,69                       | 1050,69   | 1072,67    | 1088,78   |
| 17                              | 1063,72                       | 1064,72   | 1086,70    | 1102,81   |

**Tableau 4:** Différence entre les membres de la famille des surfactines au niveau de la séquence d'acides aminés (d'après **Théâtre et al., 2021**)

| Famille     | Membre              | Séquence d'acides aminés |     |     |     |     |     |                  |
|-------------|---------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
|             |                     | AA1                      | AA2 | AA3 | AA4 | AA5 | AA6 | AA7              |
| Surfactines | <b>Surfactine</b>   | Glu                      | Leu | Leu | Val | Asp | Leu | Leu              |
|             | <b>Pumilacidine</b> | Glu                      | Leu | Leu | Leu | Asp | Leu | Val <sup>1</sup> |
|             | <b>Lichénysine</b>  | Gln                      | Leu | Leu | Val | Asp | Leu | Leu              |

1: Peut aussi être Ile. Les acides aminés en gras sont ceux qui sont différents entre les membres de la famille des surfactines



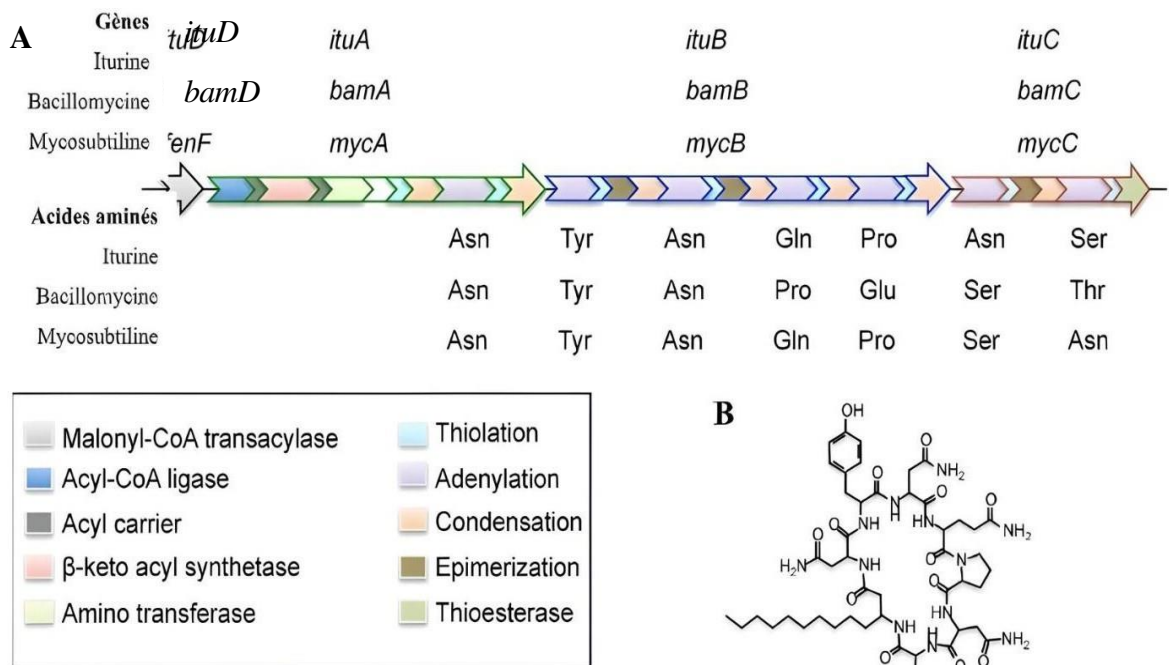
**Figure 14:** Architecture de la surfactine synthétase et mode schématique de la biosynthèse : *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* et *srfAD* codant pour les synthétases non ribosomiques responsables de l'incorporation des 7 monomères composant la surfactine (d'après Martínez-Núñez & López, 2016)

### II.3.1.1.3.3 Iturines

Les iturines sont aussi des lipopeptides cycliques formés d'un noyau peptidique constitué de 7 acides aminés (L-Asn–D-Tyr–D-Asn–L-Gln–L-Pro–D-Asn–L-Ser) liés à un acide gras  $\beta$ -aminé, qui est à son tour lié à une chaîne d'acides gras constituée de 14 à 18 atomes de carbone. La taille des iturines est d'environ 1,1 kDa ([tableau 5](#)). Il a été découvert que plusieurs autres lipopeptides sont étroitement liés à la structure des iturines, notamment la mycosubtiline ([Peypoux et al., 1976](#)) ([Tableau 6](#)), la bacillomycine L ([Besson et al., 1977](#)), l'iturine C ([Peypoux, Besson, et al., 1978](#)), D, E ([Besson & Michel, 1987](#)) ainsi que la bacillomycine D ([Peypoux et al., 1980](#)) ([Tableau 6](#)), la bacillomycine F ([Mhammedi et al., 1982](#)) et la mojovensine A ([Ma et al., 2012](#)). En association avec l'iturine A, ces composés forment la famille iturinique des lipopeptides multigènes ([Dunlap et al., 2016](#)). L'opéron codant pour l'iturine A est composé de quatre gènes : *ituD*, *ituA*, *ituB* et *ituC* ([Figure 15](#)). La séquence peptidique des iturines varie en fonction des différents membres comme indiqué dans le [tableau 6](#).

**Tableau 5:** Valeurs des masses molaires calculées des ions  $[[M]+H, +Na, +K]^+$  correspondant aux isoformes de l'iturine A/mycosubtiline et de la bacillomycine D (d'après la base de données de peptides non-ribosomiques: Norine et Li et al., 2021)

| Molécules                                | Masse molaire théorique (m/z) | $[M+H]^+$ | $[M+Na]^+$ | $[M+K]^+$ |
|--|-------------------------------|-----------|------------|-----------|
| Iturine A/Myco-subtiline C <sub>14</sub> | 1042,54                       | 1043,54   | 1065,52    | 1081,63   |
| Iturine A/Myco-subtiline C <sub>15</sub> | 1056,55                       | 1057,55   | 1079,53    | 1095,64   |
| Iturine A/Myco-subtiline C <sub>16</sub> | 1070,57                       | 1071,57   | 1093,55    | 1109,66   |
| Iturine A/Myco-subtiline C <sub>17</sub> | 1084,59                       | 1085,59   | 1107,57    | 1123,68   |
| Bacillomycine D C <sub>14</sub>          | 1030,53                       | 1031,53   | 1053,51    | 1069,62   |
| Bacillomycine D C <sub>15</sub>          | 1044,54                       | 1045,54   | 1067,52    | 1083,63   |
| Bacillomycine D C <sub>16</sub>          | 1058,56                       | 1059,56   | 1081,54    | 1097,65   |
| Bacillomycine D C <sub>17</sub>          | 1072,59                       | 1073,59   | 1095,51    | 1111,68   |



**Figure 15:** Synthèse et structure de la famille des iturines. A : Représentation schématique des représentants des opérons codant pour la famille des iturines et leurs acides aminés associés. B : Structure de l'iturine (Harwood et al., 2018)

**Tableau 6 :** Différence entre les membres de la famille des iturines au niveau de la séquence d'acides aminés (d'après **Coutte, 2019**)

| Molécules                                  | AA1                        | AA2   | AA3                            | AA4                        | AA5 | AA6                            | AA7 | Réf.                             |
|--|----------------------------|-------|--------------------------------|----------------------------|-----|--------------------------------|-----|----------------------------------|
| <b>Famille des iturines</b>                |                            |       |                                |                            |     |                                |     |                                  |
| Iturine A                                  | Asn                        | D-Tyr | D-Asn                          | Gln                        | Pro | D-Asn                          | Ser | (Peypoux, Guinand, et al., 1978) |
| Iturine C                                  | Asp                        | D-Tyr | D-Asn                          | Gln                        | Pro | D-Asn                          | Ser | (Peypoux, Besson, et al., 1978)  |
| Iturine D*                                 | Asn ou Asp                 | D-Tyr | D-Asn ou D-Asp                 | Gln ou Glu                 | Pro | D-Asn ou D-Asp                 | Ser | (Besson & Michel, 1987)          |
| Iturine E*                                 | Asn ou Asp-CH <sub>3</sub> | D-Tyr | D-Asn ou D-Asp-CH <sub>3</sub> | Gln ou Glu-CH <sub>3</sub> | Pro | D-Asn ou D-Asp-CH <sub>3</sub> | Ser | (Besson & Michel, 1987)          |
| Mycosubtiline                              | Asn                        | D-Tyr | D-Asn                          | Gln                        | Pro | D-Ser                          | Asn | (Peypoux et al., 1986)           |
| Mycosubtiline <sub>[Gln<sup>3</sup>]</sub> | Asn                        | D-Tyr | D-Gln                          | Gln                        | Pro | D-Ser                          | Asn | (Béchet et al., 2013)            |
| Bacillomycine L ou L <sub>c</sub>          | Asn                        | D-Tyr | D-Asn                          | Ser                        | Glu | D-Ser                          | Thr | (Volpon et al., 2007)            |
| Bacillomycine D                            | Asn                        | D-Tyr | D-Asn                          | Pro                        | Glu | D-Ser                          | Thr | (Peypoux et al., 1981)           |
| Bacillomycine F                            | Asn                        | D-Tyr | D-Asn                          | Gln                        | Pro | D-Asn                          | Thr | (Peypoux et al., 1985)           |
| Mojavensine                                | Asn                        | D-Tyr | D-Asn                          | Gln                        | Pro | D-Asn                          | Asn | (Ma et al., 2012)                |

\*Uniquement un changement d'Asn par Asp ou Gln par Glu pour l'iturine D et un changement d'Asn par Asp-CH<sub>3</sub> ou Gln par Glu-CH<sub>3</sub> pour l'iturine E.

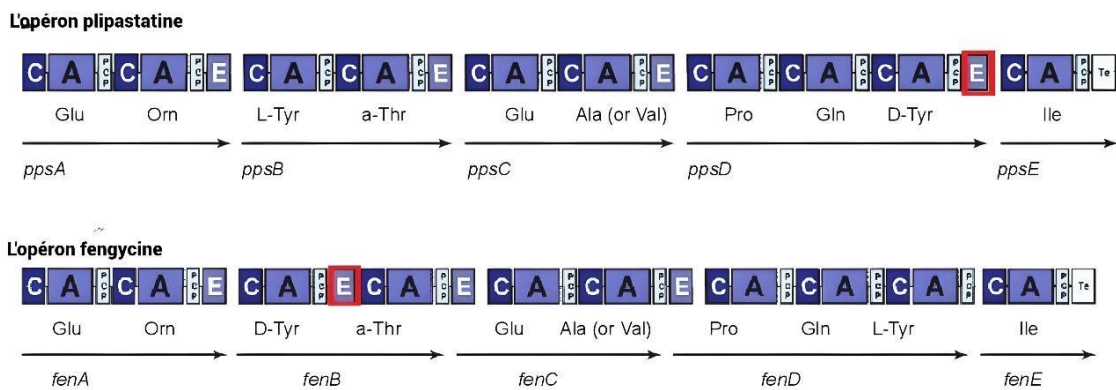
### II.3.1.1.3.4 Fengycines

La fengycine ou plipastatine (~1,5 kDa) a été découverte pour la première fois à partir de *B. subtilis* F-29-3 en 1986 (**Vanittanakom et al., 1986**). Ces molécules étroitement apparentées sont constituées d'une chaîne peptidique cyclique comprenant 10 acides aminés, à savoir L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Thr-L-Glu-D-Ala/Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile. Cette chaîne peptidique est attachée à une chaîne lipidique  $\beta$ -hydroxylée de longueur variable, comprenant entre 12 et 19 atomes de carbone (**Xu et al., 2018**). La fengycine A est caractérisée par la présence de D-Tyr en position 3 et de L-Tyr en position 9. Par contre, au sein de la plipastatine A, nous retrouvons L-Tyr en position 3 et D-Tyr en position 9 (**Hussein, 2019**). La fengycine B qui contient une D-Valine en position 6 se distingue de la fengycine A qui, à cet emplacement, présente une D-Alanine (**Tableau 7**). La fengycine est synthétisée de manière non ribosomique par 5 fengycines synthétases: FenA, FenB, FenC, FenD et FenE (**Figure 16**).

**Tableau 7:** Valeurs des masses molaires calculées (m/z) des ions  $[[M]+H, +Na, +K]^+$  et  $[[M]+H, +Na, +K]^{2+}$  correspondant aux isoformes de fengycine A et B.

| Molécules                   | Masse molaire théorique (m/z) | $[M+H]^+$ | $[M+Na]^+$ | $[M+K]^+$ | $[M+2H]^+$ | $[M+2Na]^+$ | $[M+2K]^+$ |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|-------------|------------|
| Fengycine A C <sub>14</sub> | 1434,76                       | 1435,77   | 1457,75    | 1473,72   | 718,38     | 740,37      | 756,34     |
| Fengycine A C <sub>15</sub> | 1448,77                       | 1449,78   | 1471,76    | 1487,74   | 725,39     | 747,37      | 763,35     |
| Fengycine A C <sub>16</sub> | 1462,79                       | 1463,80   | 1485,78    | 1501,75   | 732,40     | 754,38      | 770,36     |
| Fengycine A C <sub>18</sub> | 1490,82                       | 1491,83   | 1513,81    | 1529,78   | 746,42     | 768,40      | 784,37     |
| Fengycine A C <sub>17</sub> | 1476,81                       | 1477,81   | 1499,79    | 1515,77   | 739,41     | 761,39      | 777,36     |
| Fengycine B C <sub>16</sub> | 1490,82                       | 1491,83   | 1513,81    | 1529,78   | 746,42     | 768,40      | 784,37     |
| Fengycine B C <sub>17</sub> | 1504,84                       | 1505,84   | 1527,83    | 1543,80   | 753,42     | 775,41      | 791,38     |

D'autres isoformes pourraient être identifiées par la présence d'une insaturation possible sur la chaîne d'acide gras et une différence de  $m/z=2$

**Figure 16:** Représentation schématique de l'opéron codant pour la plipastatine et la fengycine avec les acides aminés associés (Ongena & Jacques, 2008)

### II.3.1.1.3.5 Implication dans le biocontrôle

Les lipopeptides sont principalement reconnus pour leur activité antifongique contre les phytopathogènes. En tant que tensioactifs, les surfactines sont bien connues pour leur capacité à modifier les caractéristiques de surface des cellules, ce qui joue indirectement un rôle important dans des processus tels que la colonisation des tissus de la plante hôte, la formation de biofilms, et la stimulation du système immunitaire des plantes (Leclère et al., 2006; Ghelardi et al., 2012; Luo et al., 2015; Le Mire et al., 2018). La surfactine a été décrite pour son antagonisme direct en s'intégrant dans les bicouches lipidiques, en chélatant les cations et en créant des pores, ce qui favorise l'instabilité membranaire (Inès & Dhouha, 2015), alors qu'elle ne possède pas de propriétés antimicrobiennes seule, en l'absence de métabolites synergiques (Lilge et al., 2022).

Par exemple, il a été rapporté qu'elle présente une action synergique puissante en combinaison avec la fengycine contre *Phytophthora infestans* (Wang et al., 2020), *Venturia inaequalis* (Desmyttere et al., 2019; Leconte et al., 2022) et avec la mycosubtiline contre *Bremia lactucae* (Deravel et al., 2014b).

Le mode d'action des iturines a été étudié à partir de membranes lipidiques synthétiques, celles-ci forment des pores au sein des membranes responsables de l'activité antifongique (Maget-Dana et al., 1985; Wang et al., 2022). Par exemple, il a été montré que l'iturine A modifiait la perméabilité membranaire de *F. oxysporum* (Wang et al., 2022). De plus, il a été démontré que l'iturine A peut perturber les membranes cytoplasmiques des cellules de levure, entraînant une fuite d'ions K<sup>+</sup> et d'autres constituants essentiels parallèlement à la mort des cellules de levure (Aranda et al., 2005; Zhao et al., 2017). En plus de leur activité antifongique, il a également été démontré qu'elle active le système de défense des plantes (Wu et al., 2018). Les bacillomycines D ont démontré aussi leur efficacité antifongique en agissant sur différents aspects de la biologie et de la pathogénicité de *F. graminearum* (Gu et al., 2017).

La mycosubtiline agit comme un agent porogène qui active les phospholipases *in situ* afin de générer des oligomères. Ces oligomères pénètrent et perturbent la bicouche lipidique. Les pores se dilatent progressivement, entraînant la mort de la cellule cible (Nasir et al., 2012). Il a été signalé que ce membre d'iturine avait un effet de biocontrôle sur plusieurs phytopathogènes, notamment *B. lactucae*, sur la laitue, *B. cinerea* sur la vigne et *F. oxysporum* f. sp. *iridacearum* sur *Iris* sp (Deravel et al., 2014b; Farace et al., 2015; Mihalache et al., 2018). De plus, son application foliaire à une concentration de 100 mg/L a entraîné une réduction des symptômes de *Zymoseptoria tritici* de plus de 58,1 % sur les plantes de blé (Platel et al., 2023). Cette étude a également montré que le traitement des plantes de blé à cette concentration augmente significativement l'expression des gènes impliqués dans les réponses des plantes aux stress, favorisant ainsi une réponse immunitaire accrue chez le blé.

Les fengycines sont fortement antifongiques, en particulier vis-à-vis les champignons filamenteux (Deleu et al., 2008). Bien que les fengycines soient connues pour leur forte activité antifongique contre *V. inaequalis* avec une IC<sub>50</sub> de 0,05 mg/L (Leconte et al., 2022), celles produites par *B. amyloliquefaciens* MEP218 ont également une activité antibactérienne contre *X. axonopodis* pv. *Vesicatoria* et *Pseudomonas aeruginosa* PA01 avec des CMI respectives de 25 µg/mL et 200 µg/L, en modifiant la structure et la perméabilité de leur membrane cellulaire (Medeot et al., 2019).

### II.3.1.1.3.6 Cytotoxicité des lipopeptides de *Bacillus*

Les trois familles de lipopeptides ont démontré des activités biologiques puissantes contre divers phytopathogènes (Ongena & Jacques, 2008; Deravel et al., 2014a; Leconte et al., 2022; Platel et al., 2023), ainsi que des propriétés anti-inflammatoires (Cho et al., 2006), antioxydantes (Dussert et al., 2022), antitumorales (Dan et al., 2021) et antivirales (Xia et al., 2021). Ces résultats encourageants font des lipopeptides des candidats de choix pour être utilisés comme agents de biocontrôle et thérapeutiques. De ce fait, plusieurs études ont été menées pour évaluer leur cytotoxicité. Notamment, une étude précédente (Kourmentza et al., 2020) a analysé le profil de cytotoxicité des trois familles de lipopeptides (fengycine, surfactine et mycosubtiline) à la fois individuellement et en mélange sur des cellules Caco-2 (cellules cancéreuses du côlon) et sur des cellules Vero (cellules de rein de singe vert africain). Les cellules Vero sont recommandées comme modèle par l'EFSA pour évaluer le potentiel cytotoxique des espèces de *Bacillus* utilisées en nutrition animale. Les résultats de cette étude montrent que par rapport aux autres familles de lipopeptides, la mycosubtiline a présenté la plus faible IC<sub>50</sub> sur les deux lignées cellulaires, avec une valeur comprise entre 10 et 20 mg/L, comparable à celle des conservateurs alimentaires approuvés tels que la nisine. En plus, les différents lipopeptides, qu'ils soient utilisés individuellement ou en combinaison, ont montré une réduction de cytotoxicité plus importante sur les cellules Caco-2 par rapport à l'additif alimentaire de type nisine. Cependant, d'après les résultats des tests, seules la fengycine, la surfactine et leur combinaison ont montré une moindre cytotoxicité que la nisine vis-à-vis des cellules Vero, ce qui permet de classer les trois familles de lipopeptides en deux groupes en fonction de leur cytotoxicité vis-à-vis des deux lignées cellulaires. Le groupe 1 de molécules à faible cytotoxicité comprend des composés tels que la fengycine et la surfactine, qui ont une IC<sub>50</sub> supérieure à 100 mg/L, tandis que le groupe 2 à cytotoxicité modérée comprend des composés tels que l'iturine A et la mycosubtiline, avec une IC<sub>50</sub> comprise entre 10 et 100 mg/L (Kourmentza et al., 2020). Une autre étude a montré que la viabilité des fibroblastes pulmonaires humains normaux MRC-5 n'était pas altérée même après un traitement avec la plus forte concentration de fengycines, qui était de 200 mg/L (Medeot et al., 2019). La cytotoxicité des lipopeptides est liée à leur capacité à pénétrer dans les membranes biologiques, où ils peuvent entraîner la formation de pores, induisant ainsi un déséquilibre des flux d'ions transmembranaires (Dufour et al., 2005). En plus, la variation des structures des lipopeptides influence leur potentiel de cytotoxicité. Par exemple, la surfactine se révèle généralement moins cytotoxique lorsque sa chaîne d'acides gras est plus courte (Fei et al., 2020).

## II.3.1.2 Les polykétides synthétases (PKS)

### II.3.1.2.1 Découverte des polykétides

Un des événements marquants dans l'histoire des polykétides a eu lieu en 1893, lorsque James Colie a réussi à synthétiser de l'orcinol à l'Université de Londres. Dans ses recherches, il décrit en détail la formation de ce composé en chauffant l'acide déhydroacétique avec l'hydroxyde de baryum. Ce processus de conversion implique la présence d'un intermédiaire polykétone (**Khan et al., 2014**). Cependant, la compréhension de la biosynthèse des polykétides n'a été pleinement réalisée qu'en 1950, lorsque Arthur Birch a émis l'hypothèse que les polykétones (polykétides) pouvaient être synthétisés grâce à des réactions de condensation successives d'unités d'acétate. Ensuite, il a confirmé cette hypothèse en fournissant des unités d'acétate marquées au  $^{14}\text{C}$  à *Penicillium patulum*, ce qui a permis la production de l'acide 6-méthylsalicylique, le polykétide attendu (qu'il parvient à identifier grâce à une décomposition chimique du composé). L'acide 6-méthylsalicylique est un polykétide aromatique impliqué dans la biosynthèse de la toxine patuline (**Birch et al., 1955**). A partir des années 60, l'émergence simultanée d'outils tels que la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis de déterminer la structure de nombreux polykétides complexes tels que l'aflatoxine (**Minto & Townsend, 1997**) et l'érythromycine et a fourni des informations sur leurs voies de biosynthèse (**Cane et al., 1991**). Plus tard, le développement du génie génétique a permis d'associer la synthèse de polykétides à la présence de clusters de gènes codant les enzymes PKS. En 1979, **Rudd et Hopwood** ont effectué des mutations génétiques dans *Streptomyces coelicolor*, ce qui leur a permis de localiser la partie génique responsable de la synthèse de l'actinorhodine en observant la perte de la couleur bleue caractéristique de ce polykétide (**Rudd & Hopwood, 1979**). Par la suite, une série de 76 mutations à l'intérieur de cette partie a révélé la présence d'au moins six gènes regroupés en cluster, intervenant dans la synthèse de l'actinorhodine. Le séquençage du génome de *S. coelicolor* a ensuite été réalisé, et la structure de ce cluster a été déterminée par analogie avec les Fatty Acid Synthases (FAS), qui sont responsables de la biosynthèse des acides gras. Les mécanismes de biosynthèse des acides gras et des polykétides présentent des similitudes importantes, notamment au niveau de la condensation et de la modification successive des unités acyl-CoA. De plus, les domaines enzymatiques responsables de ces processus montrent une forte similarité de séquence primaire, ce qui suggère que ces deux systèmes enzymatiques ont un ancêtre commun (**Jenke-Kodama et al., 2005**).

### II.3.1.2.2 Organisation structurale des PKS

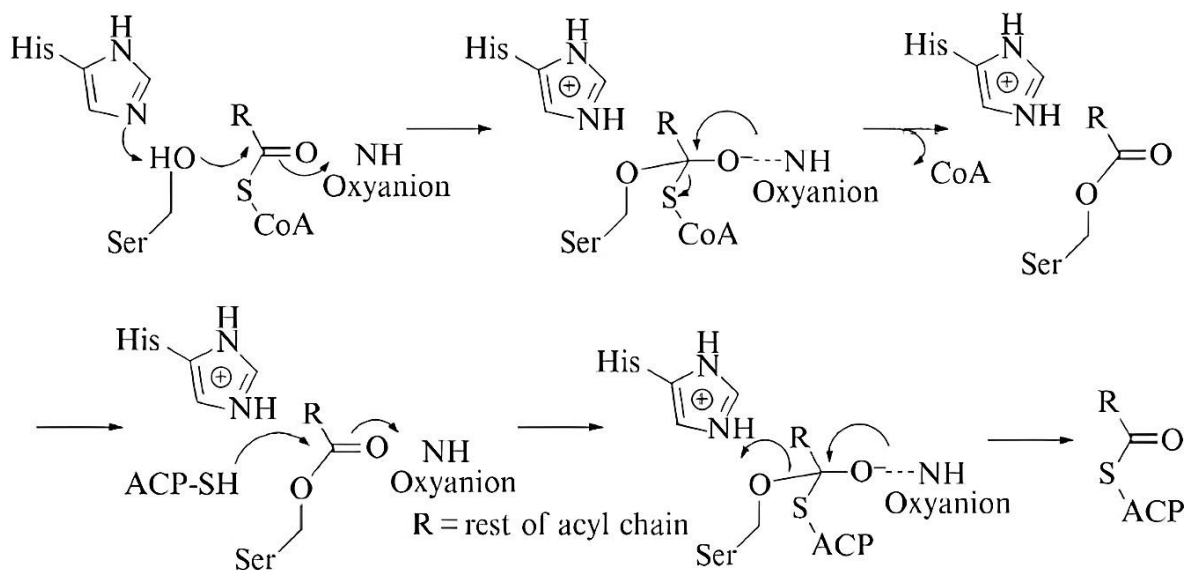
Les polykétides synthases (PKS) sont hautement homologues aux acides gras synthétases (FAS) car ces deux classes d'enzymes catalysent la condensation (condensation de Claisen) des métabolites primaires activés, tels que l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA, pour former des polymères de  $\beta$ -cétol. Cette condensation est catalysée par les PKS (Curran et al., 2018). Les PKS agissent en reliant les métabolites primaires activés les uns aux autres par des liaisons thioester (Santiago et al., 2014). Les gènes codant les polykétides synthétases s'organisent en cluster. Les PKS comme les NRPS sont constituées de modules, qui eux-mêmes sont composées de différents domaines fonctionnels. Bien que tous les types de PKS partagent un processus de synthèse similaire, il existe trois groupes de PKS connus : les PKS de type I, les PKS de type II et les PKS de type III, qui sont classées en fonction de leur organisation (Staunton & Weissman, 2001). Parmi ces groupes, les PKS de type I présentent une disposition linéaire des domaines fonctionnels et une fusion covalente. Les PKS de type I peuvent être classées en deux sous-types : les PKS itératives (PKSi) et les PKS modulaires (PKSm) (Keatinge-Clay, 2012). Les PKS itératives de type I sont principalement présentes dans les champignons et utilisent leurs domaines de manière itérative, où un seul module (ensemble de domaines) est utilisé de manière répétitive (Heimerl et al., 2018). D'un autre côté, les PKS modulaires sont principalement présentes dans les bactéries et sont structurées en plusieurs modules distincts. Chaque module fonctionne de manière linéaire (Weissman, 2015). Les PKS modulaires de type I peuvent être classées en *cis*-AT PKS et *trans*-AT PKS. Les PKS *cis*-AT contiennent les trois domaines essentiels (KS: kétosynthase; AT: acyltransférase; ACP: Acyl Carrier Protein) sur un même module, tandis que dans les PKS *trans*-AT, l'unité d'élongation est transacylée sur le domaine ACP (Helfrich & Piel, 2016). Les PKS de type II, principalement présentes chez les bactéries, sont exclusivement responsables de la synthèse de polykétides aromatiques (Hertweck et al., 2007). Ces PKS utilisent de manière itérative leurs domaines. À l'instar des PKS de type II, les PKS de type III sont itératives et se trouvent principalement dans les plantes. Chez *Bacillus*, la majorité des polykétides sont synthétisés par des enzymes PKS modulaires de type I (Hertweck, 2009). Dans cette étude, nous nous concentrerons uniquement sur ce type de PKS.

Les PKS modulaires de type I présentent généralement trois domaines essentiels à la réaction d'élongation : Ketosynthase (KS), Acyltransférase (AT) et Acyl Carrier Protein (ACP). Ces domaines sont essentiels à la réaction d'élongation de la chaîne du polykétide. En plus de ces domaines, des domaines optionnels peuvent s'ajouter.

---

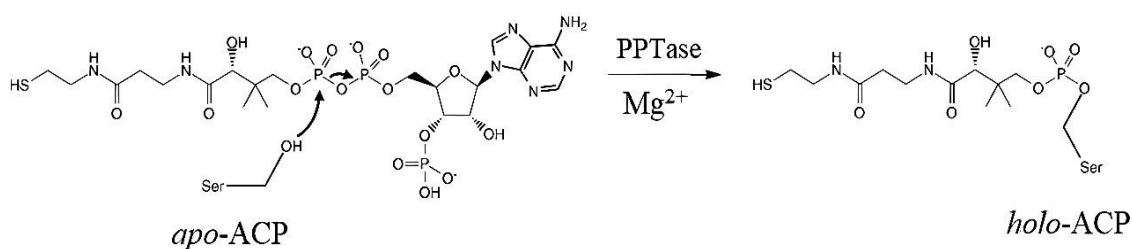
Ces domaines incluent la kétoréductase (KR), la déshydratase (DH) et ényl réductase (ER) (Robbins et al., 2016). Ils jouent un rôle important dans la diversification et la modification de la structure du polykétide. Un domaine thioestérase (TE), présent au sein du dernier module, a pour fonction de libérer la chaîne polykétidique et, dans la majorité des cas, d'entraîner sa cyclisation (Stinear et al., 2004). Ces domaines assurent la sélection et le transfert d'une  $\alpha$ -carboxyacyl-CoA vers le domaine de la protéine porteuse d'acyle (ACP).

- **Le domaine acyltransférase (AT)** : Chargé de sélectionner et de transférer (comme le fait le domaine A dans le cas des NRPS) l'unité de départ (ou unité d'extension) l' $\alpha$ -carboxyacyl-CoA sur le bras phosphopantéthéine du domaine ACP. Au sein des modules des PKS *cis*-AT, ce domaine est présent, tandis que chez les PKS *trans*-AT, il se présente sous forme de protéine distincte. Ce domaine est composé de deux sous-domaines distincts : un sous-domaine catalytique d'environ 240 acides aminés avec un repliement de type  $\alpha/\beta$  hydrolase, et un sous-domaine non-catalytique d'environ 60 acides aminés qui présente un repliement de type ferrédoxine. Le recrutement des unités de départ ou d'extension est similaire à celui des protéases à sérine. L'histidine active la sérine de l'AT par une catalyse basique au niveau du groupement hydroxyle. La sérine activée peut effectuer une attaque nucléophile au niveau du carbone de la fonction thioester du substrat ce qui permet le départ du CoA, puis le groupement thiol du bras phosphopantéthéine de l'ACP attaque l'intermédiaire AT-acyle (Figure 17)



**Figure 17:** Représentation de la réaction de recrutement de l'unité d'extension par le domaine AT et réaction du transfert du polykétide du domaine AT vers le domaine ACP (Tsai & Ames, 2009)

- Le domaine acyl carrier protein (ACP):** Est un domaine non-catalytique chargé de porter le substrat au cours des cycles de synthèse sur la PKS comme le fait le domaine T. Il est composé d'environ 80 acides aminés et adopte un repliement en 4 hélices  $\alpha$  organisées en fagot. Les domaines ACP sont activés par une modification post-traductionnelle où un groupement phosphopantéthéine est ajouté à la sérine. Lorsque l'ACP non modifié (l'apo-ACP) est doté de ce groupement, il est appelé holo-ACP. Lorsque le polykétide est attaché à l'ACP, le domaine est alors appelé acyle-ACP (Figure 18).

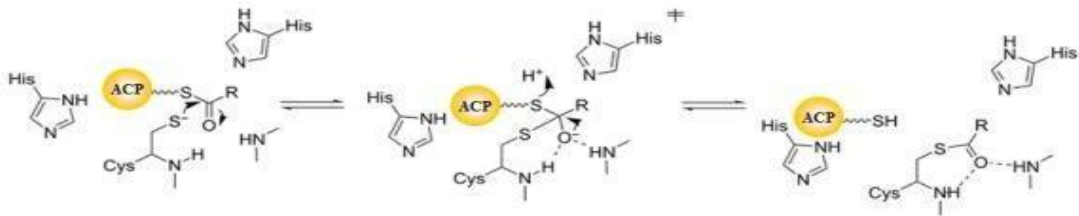


**Figure 18:** Réaction de transfert du groupement phosphopantéthéine du coenzyme A sur la sérine de l'ACP catalysée par la PPTase (Lambalot et al., 1996).

- Le domaine kétosynthase (KS):** Catalyse la formation de la liaison carbone-carbone (condensation) entre l'unité d'extension et la chaîne du polykétide en élongation. Ce domaine est homodimérique. Un monomère est composé d'environ 430 résidus et possède un repliement de type thiolase composé d'une

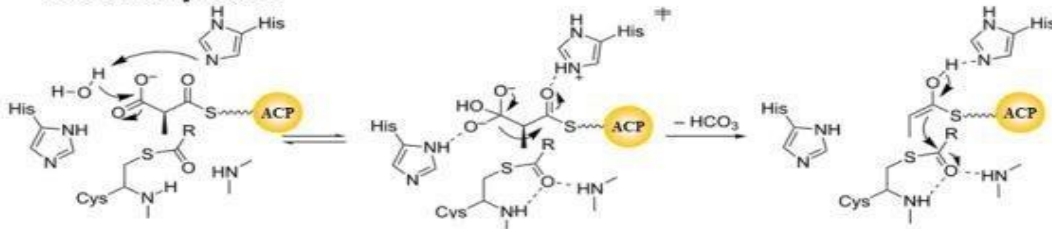
succession d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  ( $\alpha\beta\alpha\beta$ ). Le mécanisme de condensation de la chaîne du polykétide et de l'unité d'extension se déroule en deux étapes distinctes. Tout d'abord, il y a la décarboxylation de l'unité d'extension, où une attaque nucléophile sur le groupement carboxylate de l'unité d'extension, portée par l'holo-ACP, se produit. Cette attaque est réalisée par une molécule d'eau activée par catalyse basique générale, à travers l'intervention d'une histidine. Cette réaction génère un énol qui est stabilisé par une deuxième histidine. Ensuite, la deuxième étape consiste à former une liaison carbone-carbone. Cette étape commence par la catalyse basique générale d'une histidine pour activer l'énolate. Enfin, les électrons se réarrangent, permettant la libération du produit nouvellement condensé du domaine KS (**Figure 19**).

### A Réaction de transfert

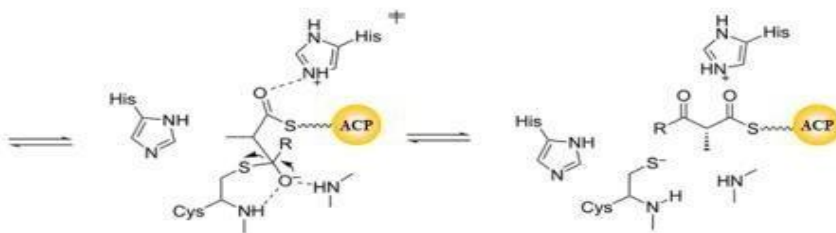


### B Condensation de Claisen

#### Décarboxylation



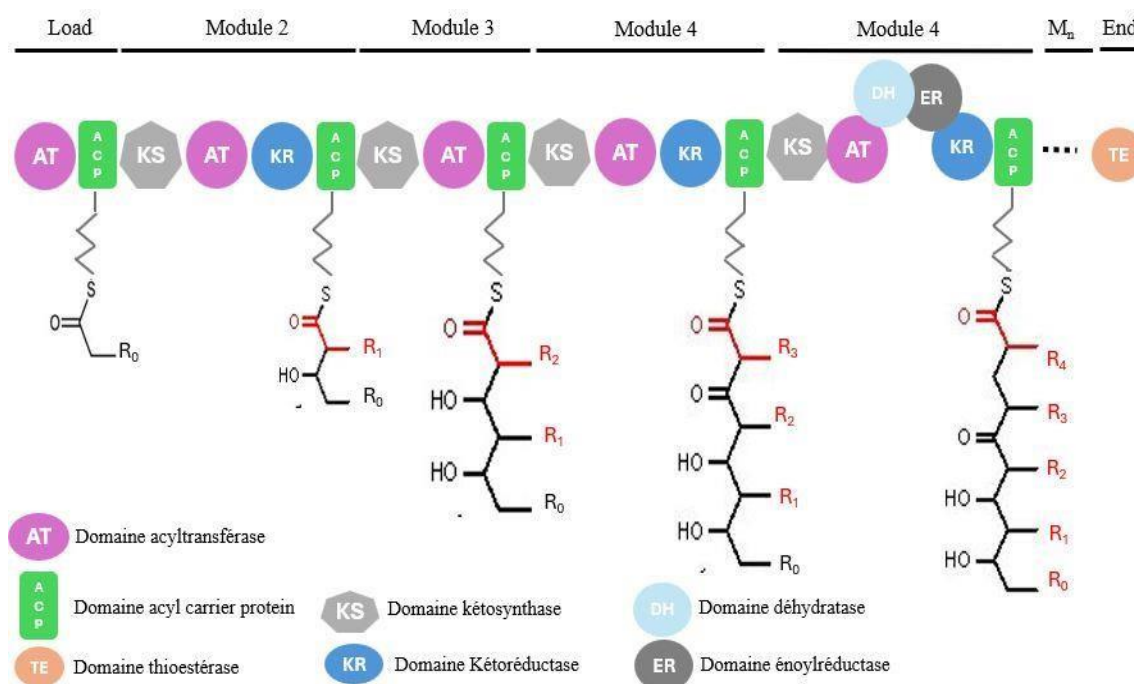
#### Formation de la liaison C-C



**Figure 19:** Réaction de condensation de type Claisen catalysée par le domaine KS. A : réaction de transfert du polykétide du domaine ACP vers le domaine KS. B : réaction de condensation décarboxylative également appelée réaction de Claisen. Cette réaction est suivie par la formation de la nouvelle liaison carbone-carbone (C-C) entre l'intermédiaire polykétidique en cours de biosynthèse et l'unité d'extension (**Weissman, 2017**).

Une synthétase commence par un module d'initiation qui charge le produit de départ sur un domaine ACP. Ce module comprend uniquement un domaine AT et un domaine ACP.

Ensuite, le produit peut être transféré au module suivant pour démarrer l'élongation de la chaîne, nécessitant la présence du domaine KS. Une fois l'élongation de la chaîne carbonée terminée, le composé final doit être libéré. Dans de nombreux cas, le dernier module d'une PKS comprend un domaine Thioestérase (TE) dont la fonction est de libérer la molécule (**Figure 20**).



**Figure 20** : Représentation d'une PKS de type I modulaire

Certains modules de PKS comprennent optionnellement d'autres domaines permettant de réduire plus ou moins la chaîne carbonée, notamment la kétoréductase (KR), la déhydratase (DH) et l'énoylréductase (ER). Ces domaines interviennent après la réaction de condensation et avant le transfert sur un autre module. La kétoréductase réduit la fonction cétone en fonction alcool, la déhydratase élimine une molécule d'eau et crée une double liaison, et l'énoylréductase réduit la double liaison. L'action de ces domaines est linéaire, c'est-à-dire que le domaine DH ne peut agir que si le domaine KR a préalablement réduit la fonction cétone en fonction alcool (**Jenke-Kodama et al., 2005**).

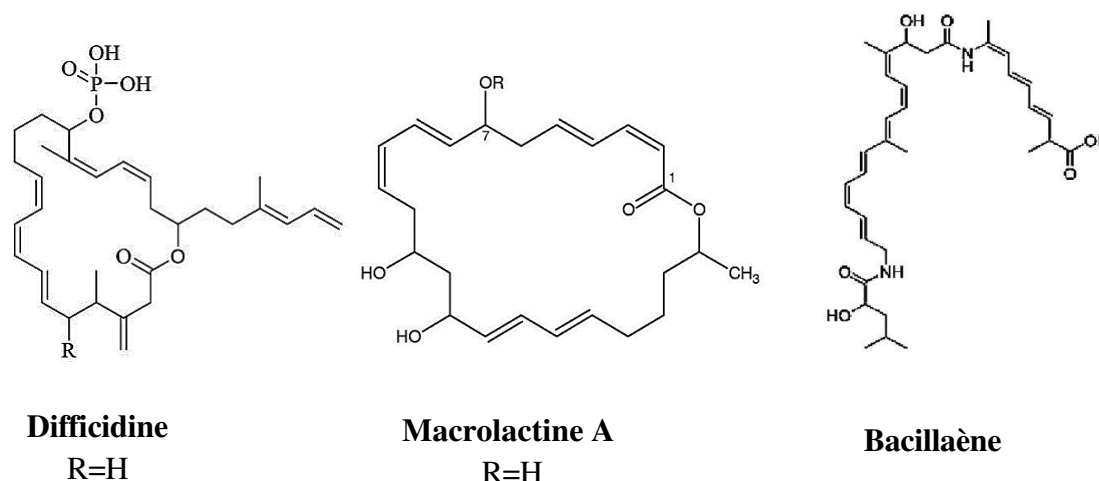
### II.3.1.2.3 Les polykétides (PKs)

#### II.3.1.2.3.1 Métabolites secondaires présentant une forte valeur ajoutée

Les polykétides, une large classe de métabolites secondaires, se caractérisent par une diversité remarquable, tant au niveau de leur structure que de leurs propriétés fonctionnelles

(Rokem et al., 2007). Ces composés sont souvent caractérisés par un haut degré d'oxygénation obtenus à partir de groupes carbonyle (Beletskaya et al., 2015). Les polykétides sont des métabolites secondaires produits par de nombreux organismes, tels que les bactéries (*Bacillus* : macrolactine, *Streptomyces* : rapamycine, *Paenibacillus* : paenimacrolidine) (Hleba et al., 2018), les champignons (la lovastatine à partir de *Phomopsis vexans*) (Parthasarathy & Sathiyabama, 2015), les plantes (l'émodyne à partir de *Rheum palmatum*) (Huang et al., 2007), les protistes (la maitotoxine-1 à partir de *Gambierdiscus australes*) (Kohli et al., 2015), les insectes (la stégobinone à partir de *Stegobium paniceum*) (Pankewitz & Hilker, 2008) et les mollusques (l'elysione à partir de *Elysia viridis*) (Cutignano et al., 2009). Ce groupe de composés comprend des macrolides, des polyéthers, des polyols et des structures aromatiques (Rocha-Santos & Duarte, 2014). Ces différentes classes de polykétides démontrent une diversité fascinante dans leurs propriétés biologiques notamment des propriétés antibactériennes (érythromycine, tétracycline) (Chopra & Roberts, 2001), des propriétés antifongiques (amphotéricine B, griséofulvine) (Ghannoum & Rice, 1999), des propriétés anticancéreuses (anthracycline, doxorubicine) (Tacar et al., 2013), des propriétés antivirales (balticolide) (Shushni et al., 2011), des propriétés immunosuppressives (rapamycine) (Li et al., 2014), des propriétés anticholestérol (lovastatine) (van de Donk et al., 2002) et des propriétés anti-inflammatoires (flavonoïdes) (Katsuyama et al., 2007). Leur synthèse revêt donc une importance capitale pour les industries pharmaceutiques et agrochimiques, en raison de leur potentiel médicinal et de leur impact économique significatif. Ainsi, les polykétides représentent chaque année plus de 20 milliards de dollars de chiffre d'affaires (Weissman, 2009).

Les polykétides produits par les espèces de *Bacillus* ont été identifiés comme des agents antimicrobiens efficaces. Ces molécules présentent un fort potentiel pour être utilisées en agriculture en tant que produits de biocontrôle durables pour lutter contre les agents pathogènes des plantes. Chez certaines souches de *Bacillus*, trois groupes de gènes distincts (*pks1*, *pks2* et *pks3*) ont été identifiés. Ces gènes codent pour des polykétide synthases de type I et sont organisés de manière modulaire de type *trans*-AT. Les groupes de gènes *pks1*, *pks2* et *pks3* codent pour la biosynthèse de bacillaènes (polyènes), macrolactines (macrolides) et difficidine ou oxydifficidine (polyènes), respectivement (Chen et al., 2006; Schneider et al., 2007) (Figure 21) (Tableau 8).



**Figure 21 :** Structures des membres représentatifs des polykétides (Caulier et al., 2019)

**Tableau 8 :** Valeurs des masses molaires calculées (m/z) des ions  $[[M]+H, +Na, +K]^+$  correspondant aux isoformes de polykétides

| Molécules   | Masse molaire théorique (m/z) | $[M + H]^+$      | $[M + Na]^+$ | $[M + K]^+$ | Réf                      |
|---|-------------------------------|------------------|--------------|-------------|--------------------------|
| Macrolactine A                                      | 402,50                        | 403,50           | 425,48       | 441,59      | (Schneider et al., 2007) |
| Macrolactine S                                      | 418,50                        | 419,50           | 441,48       | 457,59      | (Sohn et al., 2008)      |
| 7-O-malonyl macrolactine A                          | 488,60                        | 489,60           | 511,58       | 527,69      | (Schneider et al., 2007) |
| 7-O-Succinyl macrolactine A                         | 502,60                        | 503,60           | 525,58       | 541,69      | (Schneider et al., 2007) |
| Macrolactine B                                      | 564,70                        | 565,70           | 587,68       | 603,79 iso  | (Zheng et al., 2007)     |
| Macrolactine D                                      | 664,70                        | 665,70           | 687,68       | 703,79      | (Schneider et al., 2007) |
| Macrolactine M                                      | 416,50                        | 417,50           | 438,59       | 455,59      | (Nagao et al., 2001)     |
| Macrolactine N                                      | 386,50                        | 387,50           | 409,48       | 425,59      | (Zheng et al., 2007)     |
| Macrolactine H                                      | 376,39                        | 377,39           | 399,37       | 415,84      | (Nagao et al., 2001)     |
| Macrolactine T                                      | 419,42                        | 420,42           | 442,40       | 458,51      | (Xue et al., 2008)       |
| Macrolactine P                                      | 578,53                        | 579,53           | 601,51       | 617,62      | (Zheng et al., 2007)     |
| Difficidine   | 544,70                        | 545,70           | 567,68       | 583,79      | (Chen et al., 2006)      |
| Oxydifficidine                                      | 560,70                        | 561,70           | 583,68       | 599,79      | (Chen et al., 2006)      |
| Adduits ioniques mono et dialkali de la difficidine | 583,30                        | 605,30           | 621,30       | 637,00      | (Chen et al., 2006)      |
| Difficidine déphosphorylée                          |                               | 487,40 et 503,30 |              |             | (Chen et al., 2006)      |
| Oxydifficidine déphosphorylée                       |                               | 503,40 et 519,40 |              |             | (Chen et al., 2006)      |
| Bacillaène A  | 580,35                        | 581,35           | 603,33       | 619,44      | (Chen et al., 2006)      |
| Bacillaène B  | 582,50                        | 583,50           | 605,39       | 621,34      | (Chen et al., 2006)      |

### II.3.1.2.3.2 Macrolactines

Les macrolactines sont un vaste ensemble de macrolides lactones comprenant de 22 à 25 chaînons. Elles possèdent diverses activités biologiques. Ces composés ont été initialement isolés à partir d'une bactérie d'eau profonde non classée. Parmi les macrolactines connues, on compte les macrolactines de A à F. Chez *B. velezensis* FZB42, les macrolactines cycliques sont codées par le cluster *pks2 mln*, qui contient neuf gènes, à savoir *mlnA* à *mlnI* (Schneider et al., 2007; Aleti et al., 2015) (Figure 22). Jusqu'à présent, environ 33 macrolactines ont été identifiées, mais seulement six formes de macrolactine (macrolactine A, macrolactine D, macrolactine E, macrolactine U, 7-O-malonyl macrolactine A et 7-O-succinyl macrolactine A) se trouvent dans *B. velezensis* (Arguelles-Arias et al., 2009; Fazle Rabbee & Baek, 2020; Shahid et al., 2021; Wu et al., 2021) (Figure 23). Les macrolactines se distinguent par des variations structurales significatives, notamment en ce qui concerne la position et le nombre de liaisons oléfiniques dans le cycle lactone, ainsi que la présence de différents types de groupes de post-modification (Wu et al., 2021).

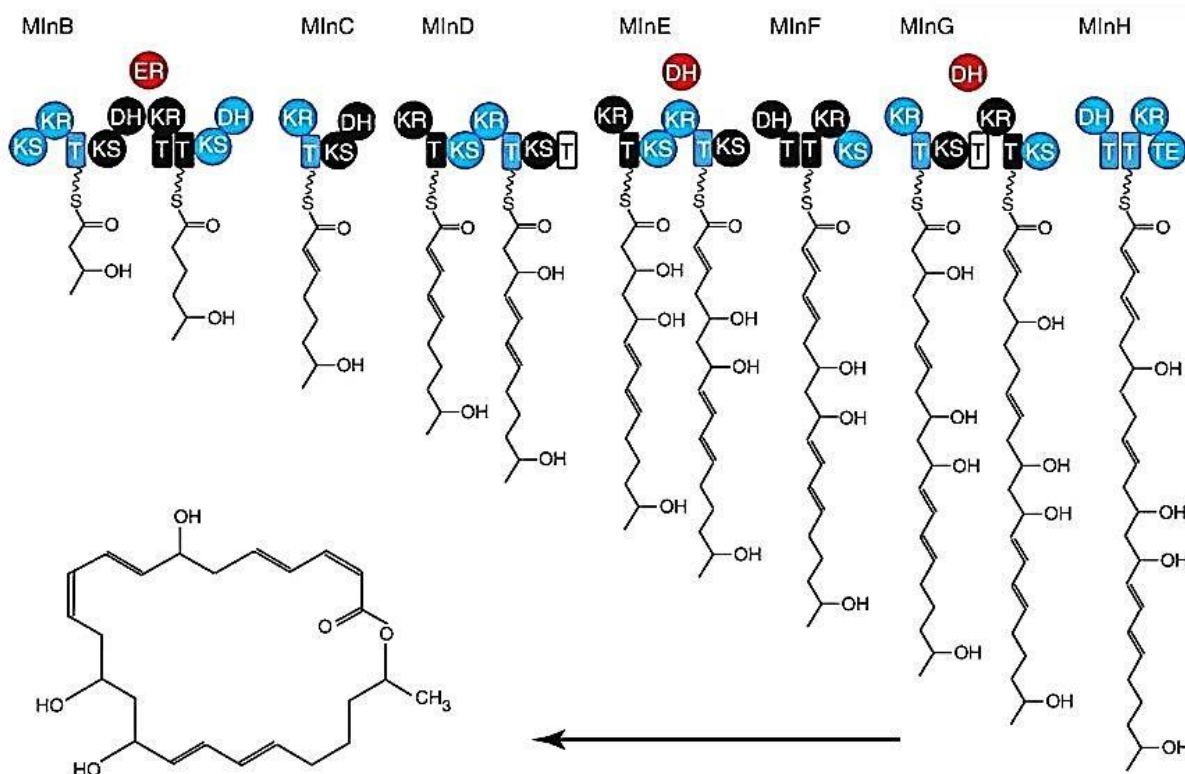
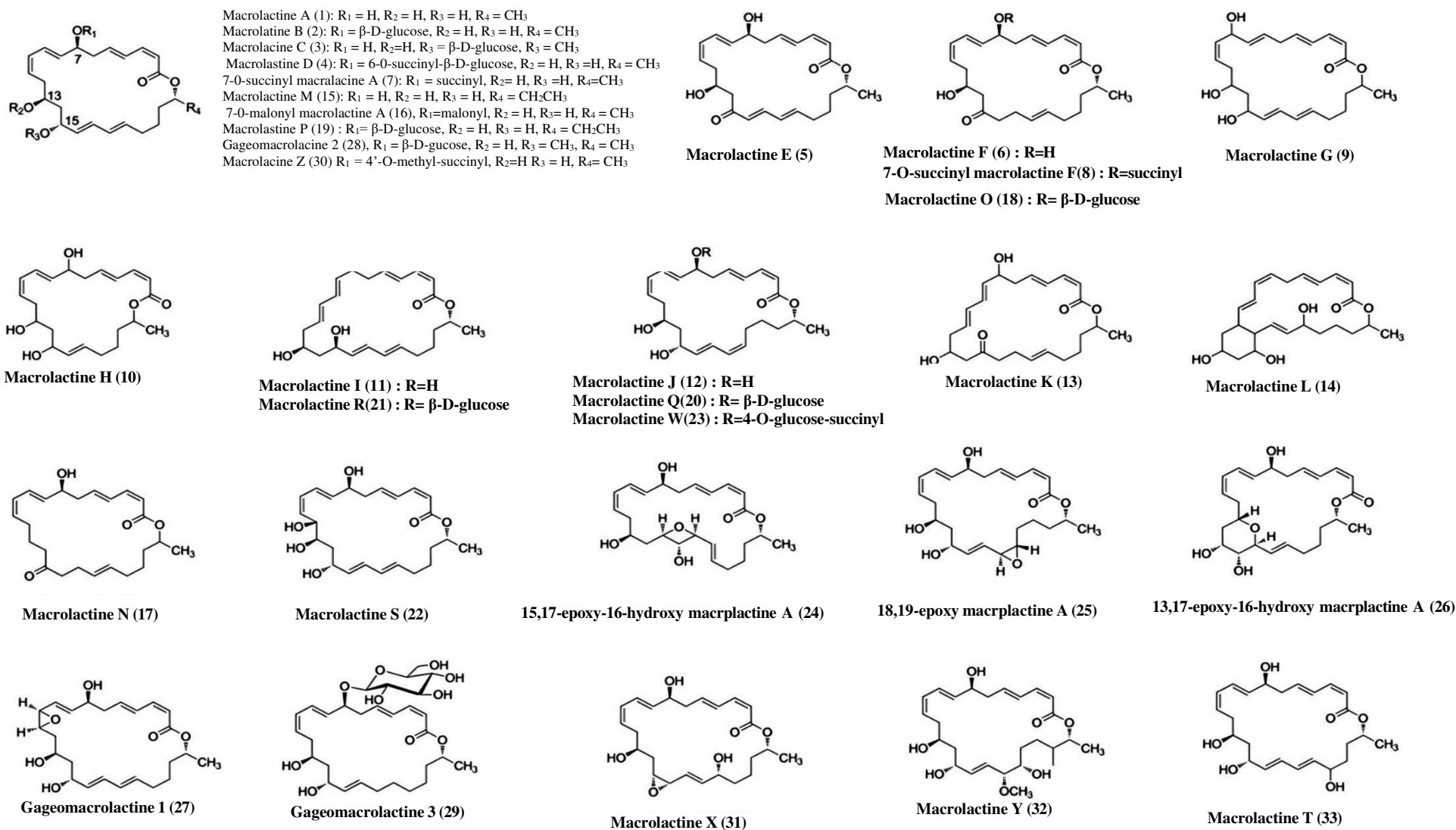


Figure 22: Organisation de la macrolactine synthétase (Chen et al., 2007)



**Figure 23 :** Structures chimiques des macrolactines précédemment identifiées (1–33) (Wu et al., 2021)

### II.3.1.2.3.3 Difficidines

La difficidine a été détectée pour la première fois dans le bouillon de fermentation de *B. subtilis* ATCC-39320. Elle a été caractérisée comme un polyène macrocyclique hautement insaturé avec un squelette carboné composé de 22 chaînons et une fraction phosphate, ce qui est rarement observée dans les métabolites secondaires des espèces de *Bacillus*. L'oxydifficidine, une variante structurale de la difficidine, possède un groupe hydroxyle incorporé en position 5 de sa structure cyclique (Wilson et al., 1987). Les difficidines sont codées par le cluster *pks3* (*dif*) avec 14 cadres de lecture ouverts de *difA* à *difN* et *difY* (Figure 24).

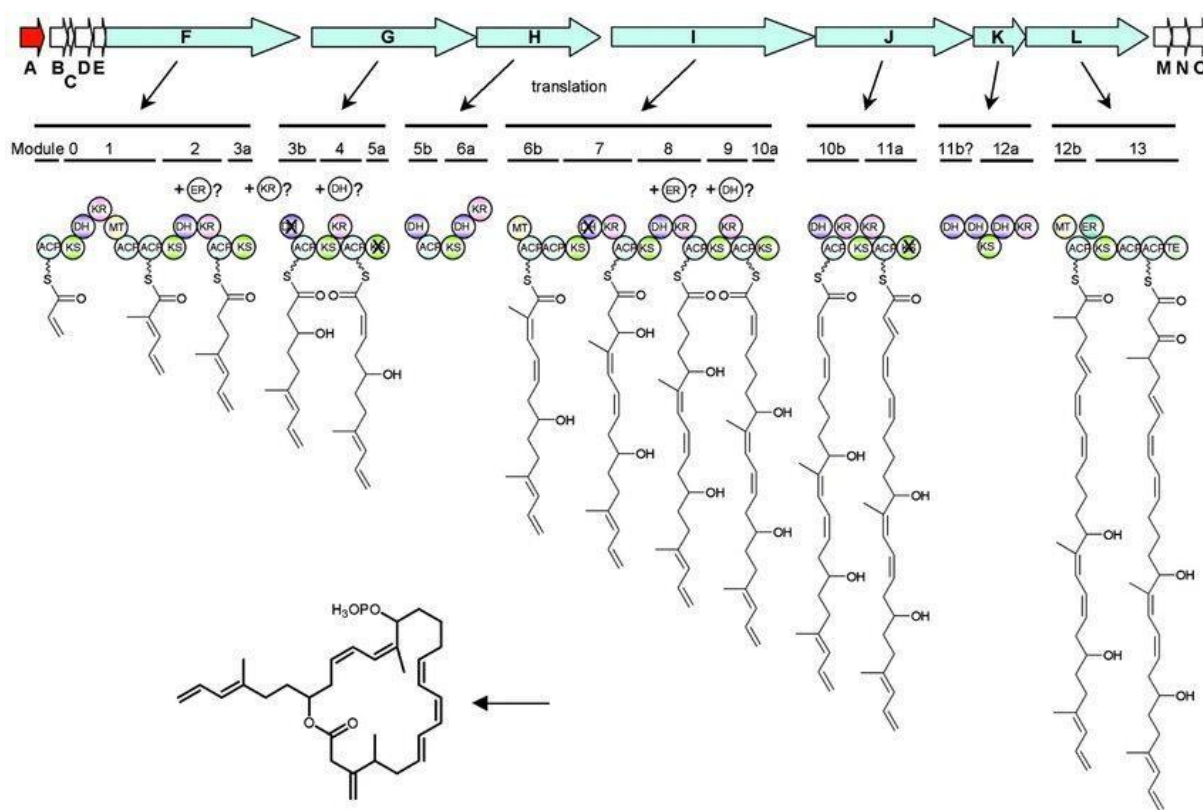


Figure 24 : Organisation de la difficidine synthétase (Chen et al., 2006)

### II.3.1.2.3.4 Bacillaènes

La bacillaène a été détectée pour la première fois dans le milieu de culture des souches de *B. subtilis* 3610 et 55422. Ce polyène présente une structure linéaire composée d'un hexane conjugué (Patel et al., 1995). Il est produit par les enzymes codées par le cluster *pks1* (*bae*), qui est un orthologue du système *pksX* chez *B. subtilis* 168. Le groupe de gènes *bae* est constitué

de cinq longs cadres de lecture ouverts, à savoir *baeJ*, *baeL*, *baeM*, *baeN* et *baeR* (Chen et al., 2006; Aleti et al., 2015) (Figure 25).

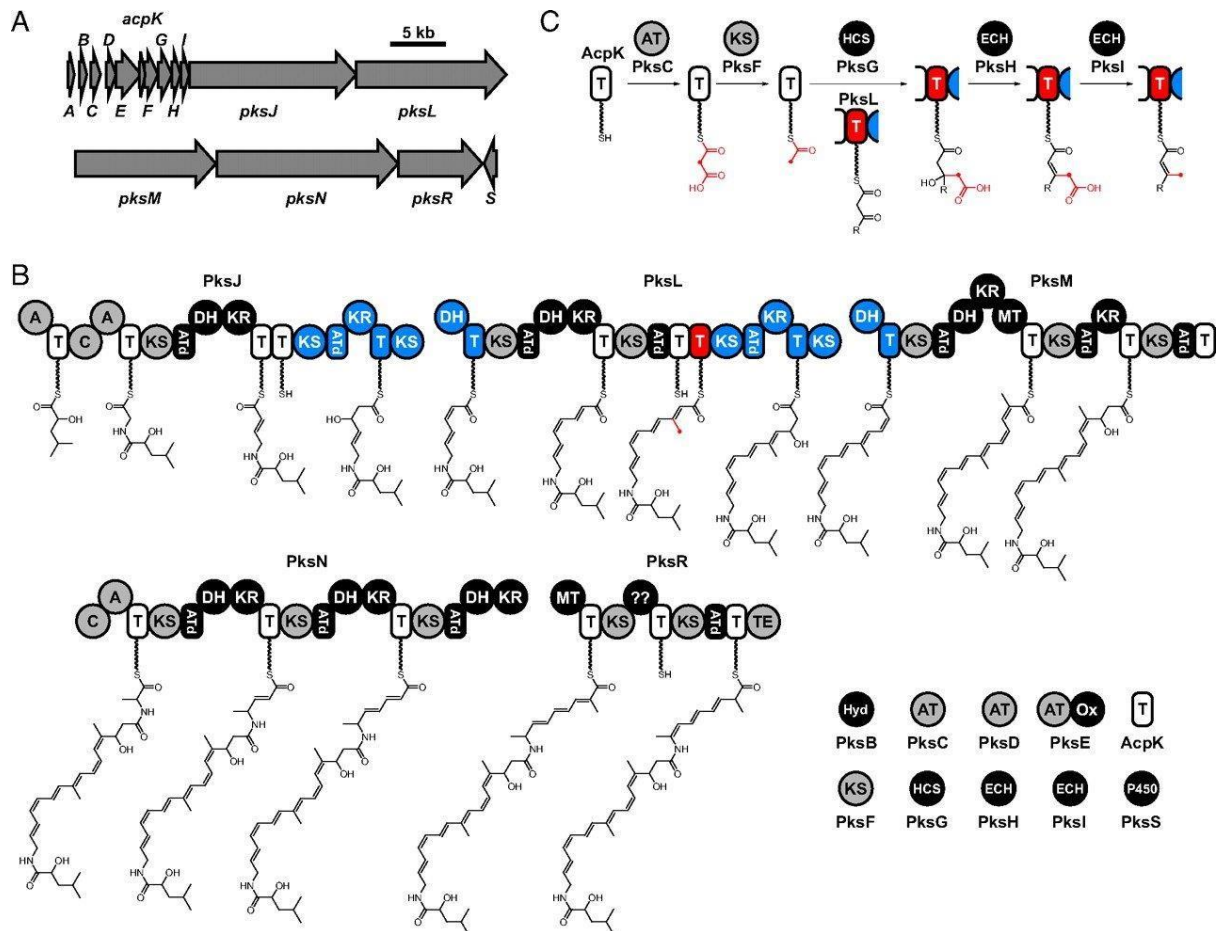


Figure 25: La PksX synthase de la bacillaène (Butcher et al., 2007)

### II.3.1.2.3.5 Implication dans le biocontrôle

Les polykétides produits par les bactéries du genre *Bacillus* ont démontré une activité antimicrobienne significative contre les phytopathogènes.

Il a été démontré que les macrolactines sont des agents antimicrobiens très efficaces contre *P. capsici*, *F. oxysporum* et *R. solanacearum* (Sopheareth et al., 2013; Salazar et al., 2020; Sui et al., 2022). De plus, ces composés ont récemment montré leur capacité à réduire significativement la diversité de la communauté bactérienne du sol (Yuan et al., 2016). Des études ont confirmé que la macrolactine A et la 7-O-succinyl-macrolactine A inhibent directement *A. tumefaciens* C58. Ces composés ont pour effet de réduire la division cellulaire de C58 tout en régulant la baisse de l'expression des gènes de virulence chromosomique de ce

pathogène (Chen et al., 2021). La 7-O-malonyl-macrolactine A est efficace pour inhiber la croissance de souches cliniques de bactéries pathogènes à gram positif multirésistantes, incluant *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, des entérocoques résistants à la vancomycine, ainsi qu'une variante de petites colonies de *Burkholderia cepacia* (Romero-Tabarez et al., 2006). Concernant la macrolactine M, une lactone constituée de 25 chaînons, des études ont révélé qu'elle possède une activité antibactérienne significative contre *S. aureus* (CMI, comprise entre 5 et 10 ppm) ainsi que contre *B. subtilis* (CMI de 30 à 60 ppm) (Nagao et al., 2001). En plus, des recherches menées par Tareq et al., 2013 ont montré que les macrolactines A, B, F et W, extraites d'un *B. subtilis* marin ont montré une capacité inhibitrice contre plusieurs organismes tels que *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Candida albicans* et *R. solani*.

La bacillaène est reconnue pour être un antibiotique à large spectre capable d'inhiber la synthèse des protéines chez les procaryotes notamment contre les bactéries phytopathogènes telles que *Erwinia carotovora*. Cependant, son isolement est compliqué avec l'approche standard basée sur le fractionnement en raison de l'instabilité chimique de la molécule à la lumière, à l'oxygène et à la température ambiante (Butcher et al., 2007; Tsalgatidou et al., 2022). Par exemple, la bacillaène n'a été détectée que dans une culture de *B. velezensis* TSA 32-1 après 24 heures (Kim et al., 2022).

La difficidine et sa forme oxydée, l'oxydifficidine, ont montré une activité antagoniste puissante contre de nombreuses souches de bactéries aérobies et anaérobies. Exceptionnellement, la croissance d'*Erwinia amylovora*, un pathogène végétal dévastateur qui cause la brûlure nécrotrophique du pommier, du poirier et d'autres plantes de la famille des Rosaceae, a été fortement inhibée par la difficidine et de son variant l'oxydifficidine (Chen et al., 2009; Dagher et al., 2021). De plus, des études ont souligné l'importance de la difficidine dans l'activité antagoniste de *B. amyloliquefaciens* AP193 contre *Pseudomonas syringae*, *R. radiobacter* et *Xanthomonas campestris* (Hossain et al., 2015). En combinaison avec la bacilysine, la difficidine produite par *B. velezensis* FZB42 a montré une forte activité antibactérienne contre *X. oryzae* pv. *oryzae* et *X. oryzae* pv. *oryzicola*, responsables respectivement de la brûlure bactérienne et de la maladie bactérienne des stries foliaires (Wu et al., 2015). En outre, une étude récente a révélé que l'extrait butanolique de la culture en bouillon de *B. methylotrophicus* DR-08, contenant de la difficidine et de l'oxydifficidine, présentait une forte activité antibactérienne contre *R. solanacearum*, principale cause du flétrissement bactérien de la tomate, avec une valeur de CMI de 12,62 µg/mL (Im et al., 2020).

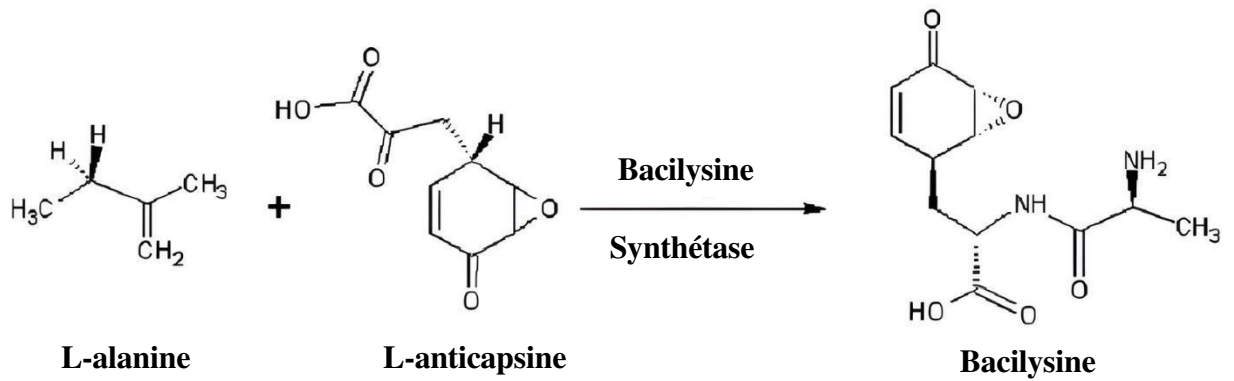
### II.3.1.2.3.6 Cytotoxicité des polykétides de *Bacillus*

Actuellement, il existe seulement quelques données disponibles concernant la cytotoxicité de ces molécules. Des études antérieures ont montré que la macrolactine A présentait des activités cytotoxique et antivirale. En fait, ce composé démontre une puissante inhibition de la croissance des cellules de mélanome murin B16-F0 (modèle des cellules des cancers de la peau humaine), avec une valeur  $IC_{50}$  *in vitro* de 3,5  $\mu\text{g/mL}$ . La macrolactine A a démontré une forte capacité d'inhibition envers le virus d'*Herpes simplex* de type I ainsi que de type II, avec des valeurs d' $IC_{50}$  de 5,0  $\mu\text{g/mL}$  et 8,3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. Dans la même étude, les résultats de la comparaison de sa cytotoxicité sur les lignées cellulaires Hep-2 (lignée tumorale de cellules épithéliales humaines) et MA-104 ont montré une plage potentielle d'index thérapeutique de 10 à 100 (Gustafson et al., 1989). De plus, des études ont révélé que les molécules de 7-O-malonyl-macrolactine A et de 7-O-succinyl-macrolactine A présentaient une toxicité réduite sur les cellules épithéliales humaines HeLa et des fibroblastes de souris L929 par rapport à la macrolactine A. En particulier, le 7-O-malonyl-macrolactine A a partiellement inhibé la prolifération des cellules HeLa à une concentration de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  et totalement à 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (Romero-Tabarez et al., 2006).

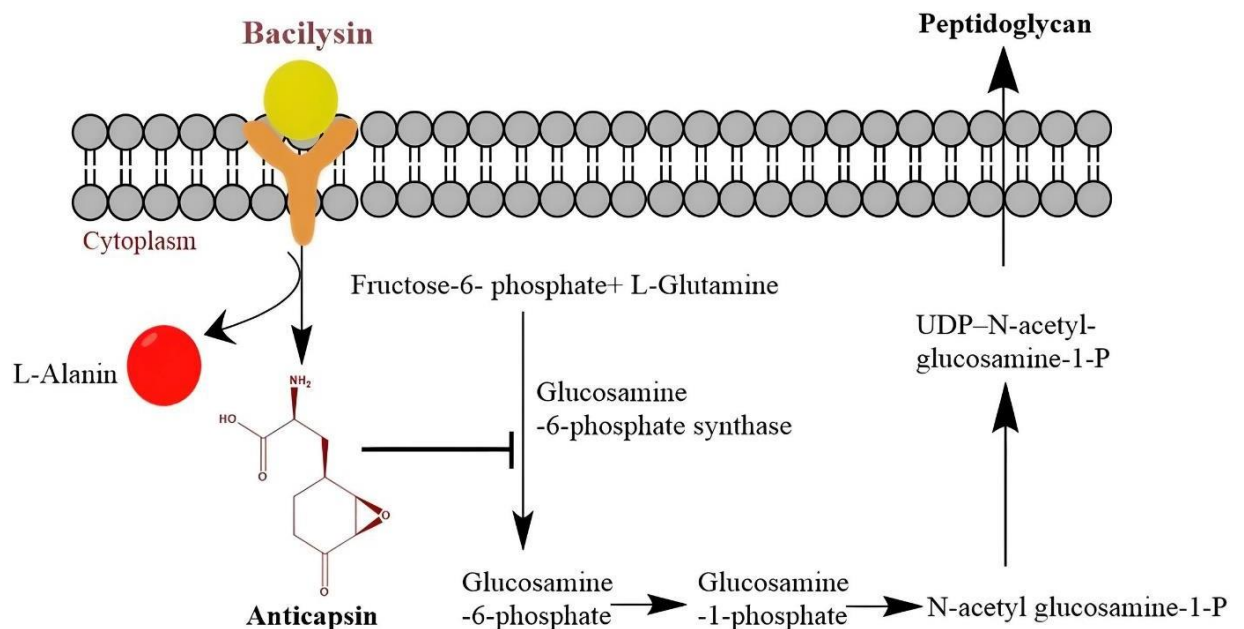
### II.3.1.3 Bacilysine

#### II.3.1.3.1 Structure et mode d'action

La bacilysine, ayant une masse molaire de 270,28 Da, est un dipeptide antibiotique synthétisé par le cluster *bacA* (anciennement *ywfBCDEF*) de certaines espèces de *Bacillus* (Parker & Walsh, 2013). La production de la bacilysine se fait de manière indépendante de la voie de la 4'-phosphopantéthéine transférase (*sfp*), contrairement aux lipopeptides et polykétides qui sont synthétisés *via* cette voie (Islam et al., 2022). Elle est composée d'une L-alanine liée à l'extrémité N-terminale de la L-anticapsine (epoxy-cyclohexanonyl-Ala) (Figure 26). En raison de la présence de la L-anticapsine à l'extrémité C-terminale, la bacilysine est connue pour son activité antimicrobienne contre un large éventail de microorganismes. À l'intérieur de la cellule, les peptidases cytoplasmiques hydrolysent la bacilysine en L-alanine et en anticapsine non protéinogène (époxy-cyclohexanonyl-Ala). La L-anticapsine inactive le domaine glutaminase de la glucosamine synthétase, qui catalyse la synthèse du glucosamine-6-phosphate à partir de la fructose-6-phosphate et de la glutamine (Figure 27). En conséquence, la biosynthèse de la paroi cellulaire est perturbée en raison de l'inhibition de la formation de glucosamine-6-phosphate. Cela entraîne également une lyse cellulaire (Wu et al., 2014).



**Figure 26:** Synthèse de bacilysine à partir de L-alanine et de L-anticapsine (Raval et al., 2012)



**Figure 27:** Mode d'action de la bacilysine synthétisée par *B. velezensis* (Islam et al., 2022)

### II.3.1.3.2 Implication dans le biocontrôle

La bacilysine, en raison de sa structure simple et de son efficacité antimicrobienne remarquable contre divers microorganismes, a captivé l'attention des chercheurs en tant que composé antimicrobien prometteur. Elle a fait l'objet de diverses études visant à évaluer son efficacité contre une variété de microorganismes et à explorer ses applications potentielles dans la lutte contre les phytopathogènes. Une étude menée par **Chen et al. (2009)** a montré qu'un mutant de *sfp*, incapable de synthétiser les LPs et les PKs, a pu inhiber la croissance d'*E. amylovora*. Cependant, un double mutant, incapable de produire les PKs et la bacilysine, était incapable d'inhiber la croissance de ce phytopathogène.

Ces résultats suggèrent que la bacilysine de *B. velezensis* FZB42 a un effet antagoniste vis-à-vis d'*E. amylovora*. De plus, il a été observé qu'un mutant de *B. velezensis* FZB42, qui est incapable de produire de la bacilysine, a totalement perdu son pouvoir antagoniste contre *P. sojae*, l'agent responsable de la pourriture des racines. Cela prouve clairement l'importance significative de la bacilysine dans la lutte contre cette maladie (Han et al., 2021). Dans une autre étude, la bacilysine produite par *B. velezensis* a montré un fort potentiel de biocontrôle contre les agents pathogènes responsables de la brûlure du riz et des stries foliaires, à savoir *X. oryzae* pv. *oryzae* et *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Wu et al., 2015).

### III. *B. velezensis* 32a, une souche de biocontrôle efficace contre la maladie de la galle du collet

Des travaux préalablement menés au sein du Laboratoire des Biopesticides du Centre de Biotechnologie de Sfax ont permis de sélectionner la souche 32a de *B. velezensis* pour son importante activité antibactérienne *in vitro* contre les souches phytopathogènes d'*A. tumefaciens*. Cette souche et ses molécules bioactives ont réduit significativement l'incidence de la maladie de la galle du collet, avec des taux variant de 80 à 100 % sur des disques de carottes ainsi que sur des plantes de tomate (Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017; Ben Abdallah et al., 2018a). De plus, les résultats des tests *in vivo* ont mis en évidence la capacité de la souche étudiée à induire une résistance chez les plantes de tomates contre la maladie de la galle du collet (Ben Abdallah et al., 2018b). L'étude de caractérisation *in vitro* des différents traits PGPR de la souche 32a, qui sont responsables de ses effets bénéfiques directs et indirects sur les plantes, a permis justifier ses activités biofertilisantes et de biocontrôle. Ces activités comprennent la solubilisation du phosphate, la production de l'acide indole acétique et de sidérophores pour fournir des éléments nutritifs à la plante, ainsi que la sécrétion de divers composés antimicrobiens tels que des enzymes lytiques, des composés volatils, des lipopeptides, des polykétides et de la bacilysine. De plus, cette étude révèle que la souche 32a colonise efficacement la rhizosphère des plantes de tomate et présente un effet positif sur la germination des graines et la croissance des plants de tomate, ce qui confirme son activité biofertilisante (Ben Abdallah et al., 2018b). Ces travaux ont permis également d'évaluer l'influence du type d'inoculum de la souche 32a (cellules végétatives ou spores) sur la production des métabolites antibactériens, le niveau de colonisation des plantes de tomate et l'efficacité du contrôle de la maladie de la galle du collet. Les résultats de cette étude ont révélé que l'inoculum sous forme de spores présente une activité antibactérienne plus élevée contre les souches d'*Agrobacterium* que les cellules végétatives.

De plus, lors des tests *in vivo*, les spores ont montré une meilleure colonisation épiphyte et endophyte des plantes de tomate et une protection plus prononcée (**Ben Abdallah et al., 2018c**). Une étude supplémentaire a été effectuée pour évaluer l'impact de l'agent pathogène sur la colonisation des racines et la production des lipopeptides par la souche 32a de *B. velezensis* lors de son interaction avec les plantes de tomate. Les résultats ont montré un effet positif de la présence d'*A. tumefaciens* C58 sur la colonisation racinaire de la souche de *Bacillus*. Cependant, une diminution de la production de surfactine a été observée chez les plants traités par *Agrobacterium*. Ces modifications dans la colonisation ont été attribuées à des changements dans la composition de l'exsudat des racines de tomate pendant l'interaction pathogène-plante-antagoniste (**Ben Abdallah et al., 2020**).

#### IV. Objectifs du travail

L'étude bibliographique présentée dans cette thèse a mis en évidence les défis spécifiques associés au contrôle de la galle du collet, ainsi que l'importance de développer des solutions alternatives de biocontrôle pour empêcher l'installation d'*Agrobacterium* et la formation de biofilms. La galle du collet est l'une des maladies ayant l'impact économique le plus significatif dans le monde, pouvant atteindre jusqu'à 60 %. Cette maladie présente une difficulté particulière: une fois que la plante est infectée par *Agrobacterium*, il devient extrêmement difficile de la traiter de manière curative, car la croissance de la tumeur continue à progresser indépendamment de l'agent causal. Diverses approches culturales, chimiques et biologiques ont été largement utilisées pour réduire la propagation de la maladie, mais ces stratégies peuvent présenter certaines limites en terme d'efficacité. Dans une étude précédente, la souche 32a de *B. velezensis* a été identifiée comme un agent de biocontrôle efficace contre les souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6 (**Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017**). Dans cette perspective, la valorisation des métabolites produits par cette souche a été proposée pour le développement d'un nouveau biobactéricide destiné à lutter contre la galle du collet. L'objectif de ce travail de thèse est donc de mieux comprendre l'implication spécifique des métabolites produits par la souche 32a dans l'action antagoniste contre *A. tumefaciens*. Pour cela, ces travaux ont été articulés autour de trois questions de recherche :

- 1- Quel est le panel de métabolites secondaires produits par la souche 32a, et les lipopeptides sont-ils efficaces contre *Agrobacterium* ?
- 2- Dans quelle mesure les polykétides et la bacilysine jouent un rôle dans l'antagonisme contre *Agrobacterium*, et y a-t-il une interaction entre ces composés ?

---

3- Les molécules pures anti-*Agrobacterium* agissent-elles en synergie et présentent-elles un effet cytotoxique ?

Afin de répondre à ces questions, une approche intégrée, combinant des analyses biochimiques, moléculaires et cytotoxicologiques, a été adoptée.

Tout d'abord, dans le premier chapitre, nous avons identifié les métabolites secondaires produits par la souche 32a à l'aide de la RP-HPLC-MS. Puis, nous avons évalué l'efficacité spécifique des lipopeptides purs dans l'activité antagoniste contre *Agrobacterium*.

Par la suite, dans le deuxième chapitre, nous avons généré des mutants de la souche 32a afin de tester l'implication des polykétides et de la bacilysine dans cette activité antagoniste. Pour mieux comprendre l'interaction entre les composés, les mutants de 32a ont été comparés à 17 mutants d'une souche similaire de *B. velezensis* GA1 fournis par l'unité de BioEcoAgro en Belgique.

Enfin dans le dernier chapitre, la purification des composés actifs contre *Agrobacterium* par HPLC préparative a été proposée, suivie d'une étude de leur synergie et d'une évaluation de leur cytotoxicité.



## *Matériel et Méthodes*



## I. Matériel

### I.1 Souches et conditions de culture

Dans le cadre de ce projet de thèse, deux souches de *Bacillus* ont été utilisées. La souche principale étudiée quant à la contribution de ces molécules dans l'activité antibactérienne est *B. velezensis* 32a. Cette bactérie a été isolée à partir d'un échantillon de sol rhizosphérique tunisien et est caractérisée comme une souche de biocontrôle efficace contre un large spectre d'agents phytopathogènes bactériens et fongiques (**Ben Abdallah et al., 2015**). De plus, une souche similaire, nommée *B. velezensis* GA1, connue pour son potentiel antimicrobien (**Andric et al., 2021**), a été utilisée pour une étude plus approfondie des composés antagonistes. Cette souche a été isolée à partir de fraises italiennes par le Laboratorio Vitrocoop Cesana (**Touré et al., 2004**), identifiée ultérieurement par **Arguelles-Arias et al. (2009)** et complètement séquencée par **Hoff et al. (2021)**. GA1 et ses mutants (**Tableau 9**) ont été fournis par l'équipe du Pr Philippe Jacques de l'UMRt BioEcoAgro de l'Université de Liège -Gembloux AgroBiotech (Belgique).

Deux souches phytopathogènes d'*A. tumefaciens*, C58 et B6 (**Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017**), causant la maladie de la galle du collet ont été utilisées afin d'explorer les composés actifs des souches de *Bacillus*. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Shanghai) a été utilisé comme hôte pour le clonage moléculaire. Les souches de *B. velezensis* 32a et GA1 ont été mises en culture dans du milieu Landy à 30 °C (**Guez et al., 2021**). Le milieu Luria–Bertani (LB) a été utilisé pour l'inoculation des souches d'*A. tumefaciens* et d'*E. coli* DH5 $\alpha$  à 30 et 37 °C, respectivement. Pour la conservation à long terme, les souches d'*A. tumefaciens*, de *Bacillus* et d'*E. coli* ont été stockées à -80 °C en utilisant du glycérol à 30 %. A partir de ces glycérol-stocks, les bactéries ont été systématiquement ensemencées sur LB gélosé à 1,5 % et incubées à 30 et 37 °C avant leur utilisation. Au besoin, l'ampicilline (60  $\mu\text{g/mL}$ ), la kanamycine (50  $\mu\text{g/mL}$ ) et le chloramphénicol (5  $\mu\text{g/mL}$ ) ont été ajoutés au milieu.

Les souches utilisées dans cette étude, ainsi que les plasmides utilisés pour la transformation de la souche 32a sont répertoriés dans le **tableau 9**.

**Tableau 9:** Souches utilisées et plasmides construits dans ce travail

| Souches et plasmides      | Caractéristiques   | Références                  |
|---------------------------|--|-----------------------------|
| <b>Souches</b>            |  |                             |
| <i>B. velezensis</i> 32a  | Souche sauvage   | (Ben Abdallah et al., 2015) |
| <i>B. velezensis</i> GA1  | Souche sauvage   | (Toure et al., 2004)        |
| <i>E. coli</i> DH5α       | <i>supE44, ΔlacU169(φ80lacZ_M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> (article responses of beneficial)/ « <i>supE44 DlacU169 (U80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> » | Invitrogen (Shanghai)       |
| <i>A. tumefaciens</i> C58 | Souche pathogène de type nopaline (sensible à l'agrocine 84)   | (Ben Abdallah et al., 2015) |
| <i>A. tumefaciens</i> B6  | Souche pathogène de type octopine (résistante à l'agrocine 84)   | (Ben Abdallah et al., 2015) |
| Bvd                       | <i>ΔdfnD::Km<sup>r</sup></i> : 32a non producteur de difficidine   | Ce travail                  |
| Bvm                       | <i>ΔmlnA::Km<sup>r</sup></i> : 32a non producteur de macrolactines   | Ce travail                  |
| Bvbe                      | <i>ΔbaeJ::Km<sup>r</sup></i> : 32a non producteur de bacillaène  | Ce travail                  |
| Bvbc                      | <i>ΔbacC::Km<sup>r</sup></i> : 32a non producteur de bacilysine  | Ce travail                  |
| G1                        | GA1 <i>ΔmlnA::cat</i> : GA1 délété du gène <i>mlnA</i> ; incapable de produire de macrolactines  | (Andric et al., 2021)       |
| G2                        | GA1 <i>ΔbaeS::cat</i> : GA1 délété du gène <i>baeS</i> ; incapable de produire de bacillaène   | (Andric et al., 2021)       |
| G3                        | GA1 <i>ΔbacA::cat</i> : GA1 délété du gène <i>bacA</i> ; incapable de produire de bacilysine et de chlorotétaine   | (Andric et al., 2021)       |
| G4                        | GA1 <i>ΔdhbC::cat</i> : GA1 délété du gène <i>dhbC</i> ; incapable de produire la bacillibactine   | (Andric et al., 2021)       |
| G5                        | GA1 <i>Δsfp::cat</i> : GA1 délété du gène <i>sfp</i> ; incapable de produire les lipopeptides et les polykétides   | (Andric et al., 2021)       |
| G6                        | GA1 <i>ΔdfnA::cat</i> : GA1 délété du gène <i>dfnA</i> ; incapable de produire de la difficidine et de l'oxydifficidine  | (Andric et al., 2021)       |
| G7                        | GA1 <i>ΔdfnM::cat</i> : GA1 délété du gène <i>dfnM</i> ; incapable de produire l'oxydifficidine  | (Andric et al., 2021)       |
| G8                        | GA1 <i>ΔbaeJ::cat</i> : GA1 délété du gène <i>baeJ</i> ; incapable de produire la bacillaène   | (Andric et al., 2021)       |
| G9                        | GA1 <i>ΔsrfAC::cat</i> : GA1 délété du gène <i>srfAC</i> ; incapable de produire la surfactine   | (Andric et al., 2021)       |
| G10                       | GA1 <i>ΔfenA::cat</i> : GA1 délété du gène <i>fenA</i> ; incapable de produire la fengycine  | (Andric et al., 2021)       |
| G11                       | GA1 <i>ΔituA::cat</i> : GA1 délété du gène <i>ituA</i> ; incapable de produire de l'iturine  | (Andric et al., 2021)       |
| G12                       | GA1 <i>ΔfenA::cat ΔituA::phleo ΔsrfAA::km</i> : GA1 délété des gènes <i>fenA, ituA et srfAA</i> ; incapable de produire l'iturine, la surfactine et la fengycine                                   | (Andric et al., 2021)       |

|                  |   |   |
|------------------|---|---|
| G13              | GA1 $\Delta baeJ::cat \Delta dfnA::phleo$ : GA1 délété des gènes <i>baeJ</i> et <i>dfnM</i> ; incapable de produire la bacillaène et la difficidine                       | (Andric et al., 2021)                     |
| G14              | GA1 $\Delta baeJ::cat \Delta mlnA::phleo$ : GA1 délété des gènes <i>baeJ</i> et <i>mlnA</i> ; incapable de produire la bacillaène et les macrolactines                    | Université de Liège -Gembloux AgroBiotech |
| G15              | GA1 $\Delta dfnA::cat \Delta mlnA::phleo$ : GA1 délété des gènes <i>dfnA</i> et <i>mlnA</i> ; incapable de produire la difficidine, l'oxydifficidine et les macrolactines | Université de Liège -Gembloux AgroBiotech |
| G16              | GA1 $\Delta bacA::cat \Delta mlnA::phleo$ : GA1 délété des gènes <i>bacA</i> et <i>mlnA</i> ; incapable de produire la bacilysine et les macrolactines                    | Université de Liège -Gembloux AgroBiotech |
| G17              | GA1 $\Delta glycT::cat$ : GA1 délété du gène <i>glycT</i> ; incapable de produire la forme glycosylée la bacillaène et les macrolactines                                  | Université de Liège -Gembloux AgroBiotech |
| <b>Plasmides</b> |   |   |
| pGEM-T Easy      | Vecteur de clonage; Amp <sup>r</sup>  | Promega Corp                              |
| pDG792           | Plasmide portant le gène de résistance à la kanamycine  | (Guéroul-Fleury et al., 1995)             |
| <i>psrfAC</i>    | pGEM-T Easy portant un fragment de 1,9 kb de <i>srfAC</i> ; Amp <sup>r</sup>  | Ce travail                                |
| <i>pfenD</i>     | pGEM-T Easy portant un fragment de 1,6 kb de <i>fenD</i> ; Amp <sup>r</sup>   | Ce travail                                |
| <i>pdfnD</i>     | pGEM-T Easy portant un fragment de 1,5 kb de <i>dfnD</i> ; Amp <sup>r</sup>   | Ce travail                                |
| <i>pmlnA</i>     | pGEM-T Easy portant un fragment de 1,5 kb de <i>mlnA</i> ; Amp <sup>r</sup>   | Ce travail                                |
| <i>pbaeJ</i>     | pGEM-T Easy portant un fragment de 1,7 kb de <i>baeJ</i> ; Amp <sup>r</sup>   | Ce travail                                |
| <i>pituD</i>     | pGEM-T Easy portant un fragment de 1,5 kb de <i>ituD</i> ; Amp <sup>r</sup>   | Ce travail                                |
| <i>pksrfAC</i>   | pGEM-T Easy portant <i>srfAC::Km<sup>r</sup></i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>   | Ce travail                                |
| <i>pkfenD</i>    | pGEM-T Easy portant <i>fenD::Km<sup>r</sup></i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | Ce travail                                |
| <i>pkdfnD</i>    | pGEM-T Easy portant <i>dfnD::Km<sup>r</sup></i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | Ce travail                                |
| <i>pkmlnA</i>    | pGEM-T Easy portant <i>mlnA::Km<sup>r</sup></i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | Ce travail                                |
| <i>pkbaeJ</i>    | pGEM-T Easy portant <i>baeJ::Km<sup>r</sup></i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | Ce travail                                |
| <i>pkituD</i>    | pGEM-T Easy portant <i>ituD::Km<sup>r</sup></i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | Ce travail                                |
| <i>pkbacC</i>    | pGEM-T Easy portant <i>bacC::Km<sup>r</sup></i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | Ce travail                                |

## I.2 Plasmides utilisés

Les cartes des différents plasmides conçus et utilisés dans cette étude, ainsi que leurs cartes de restriction, générées grâce au logiciel SnapGene 4.3.11, sont présentées dans les figures 28, 29, 30, 31 et 32.

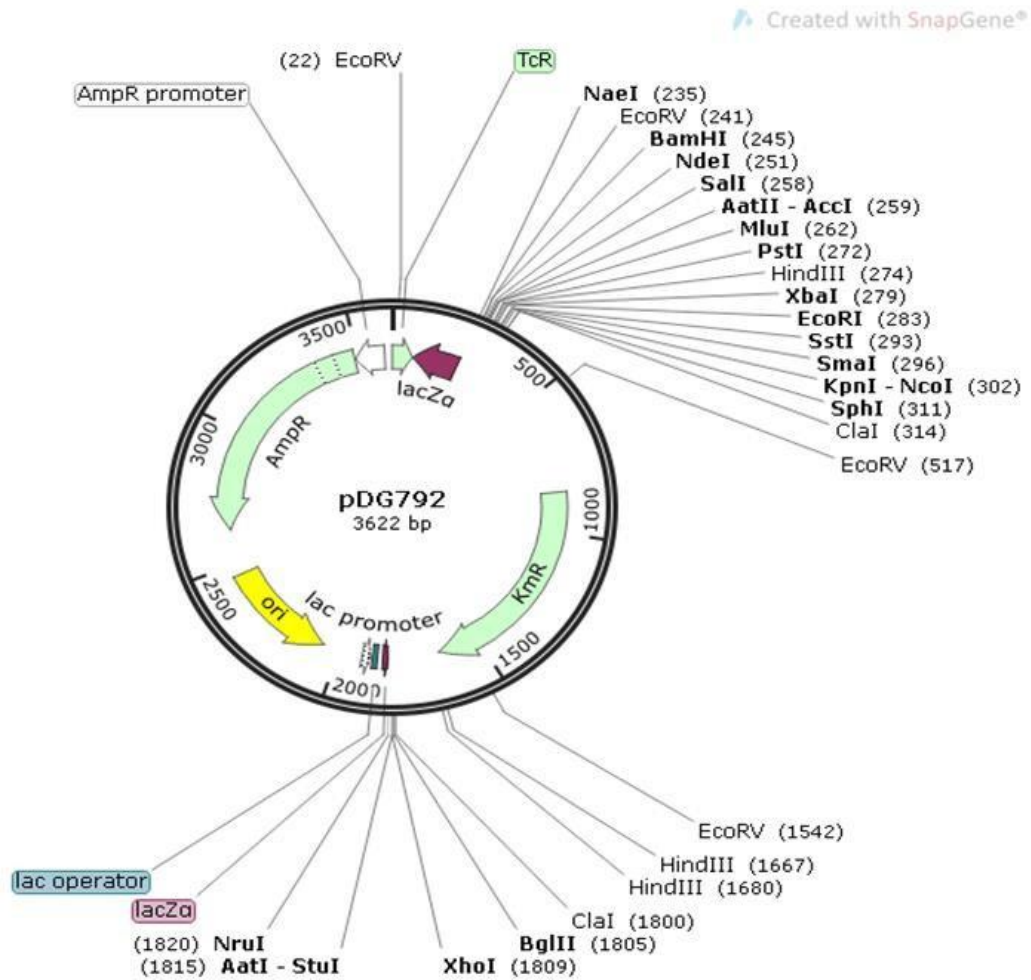


Figure 28: Carte du plasmide pDG792, Km<sup>r</sup>

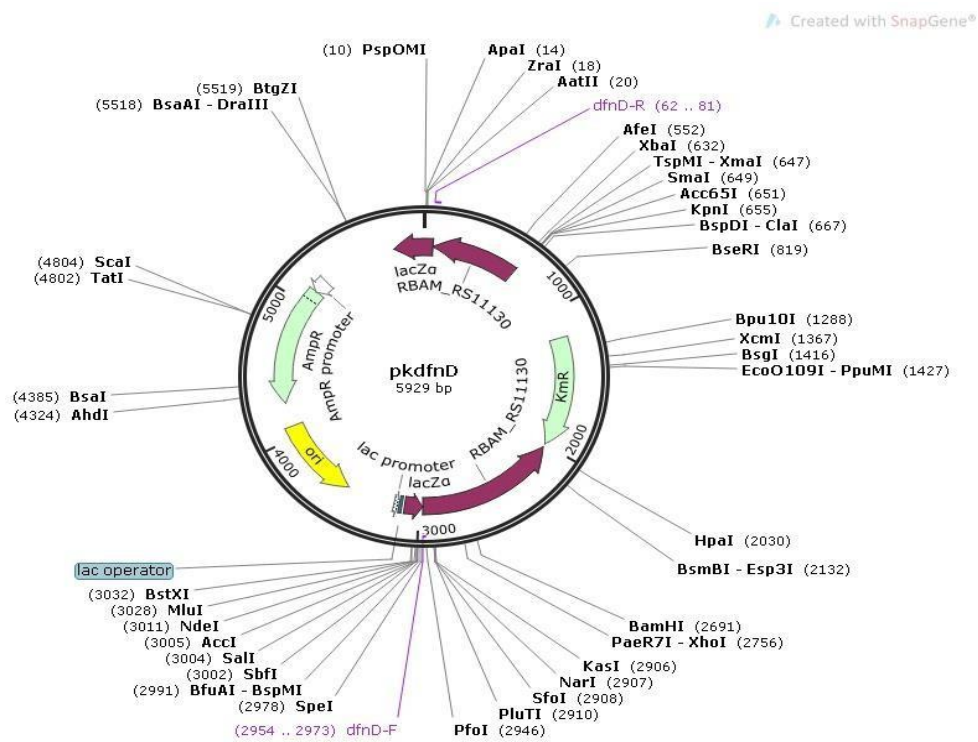


Figure 29: Carte du plasmide *pkdfnD*, *Km<sup>r</sup>*

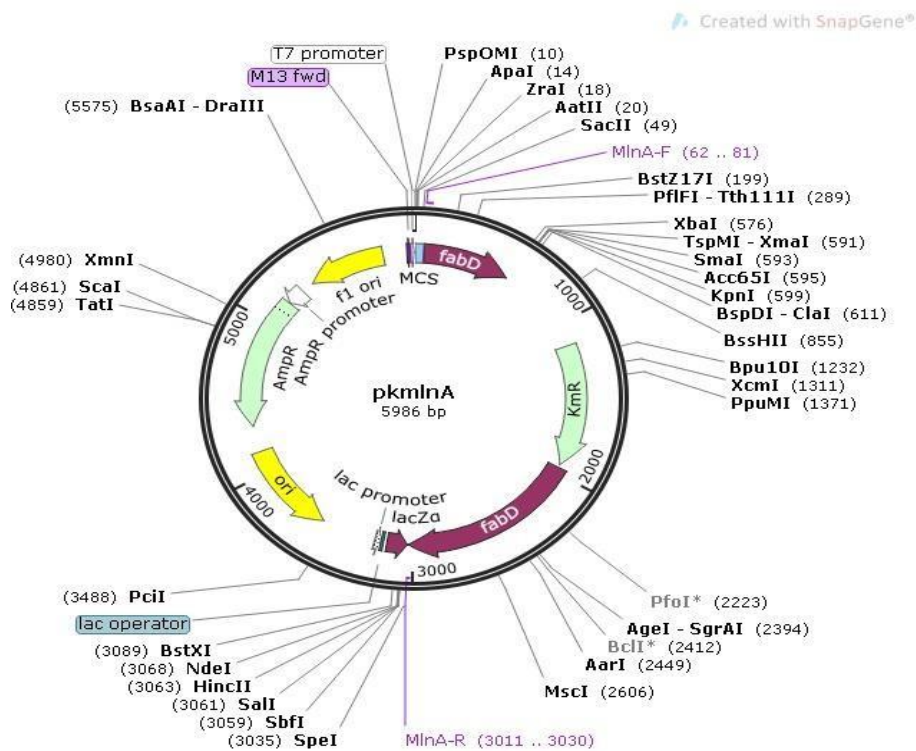


Figure 30: Carte du plasmide *pkmlnA*, *Km<sup>r</sup>*

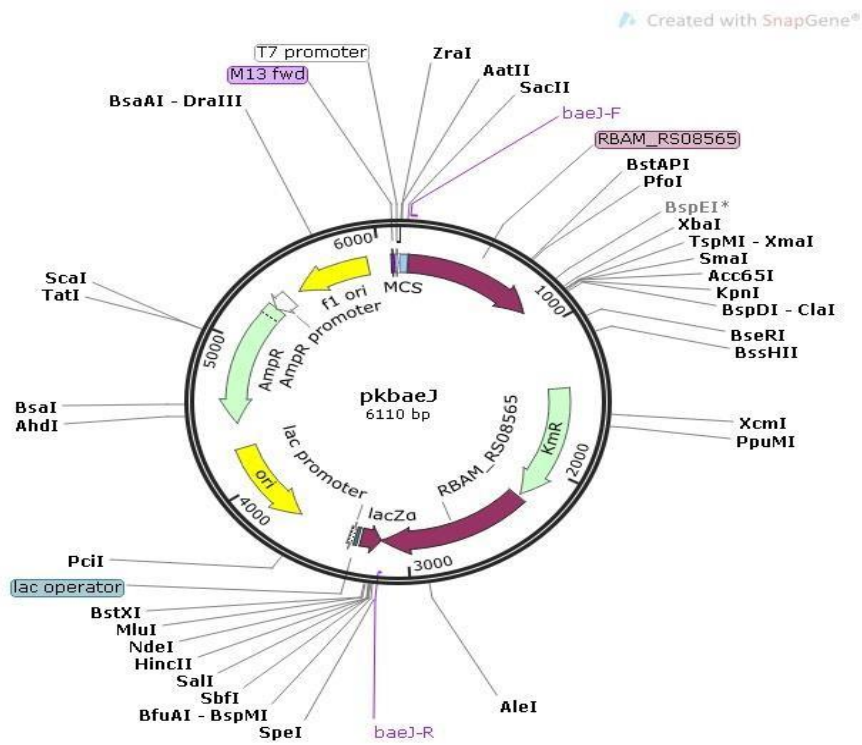


Figure 31: Carte du plasmide *pkbaeJ*, *Km<sup>r</sup>*

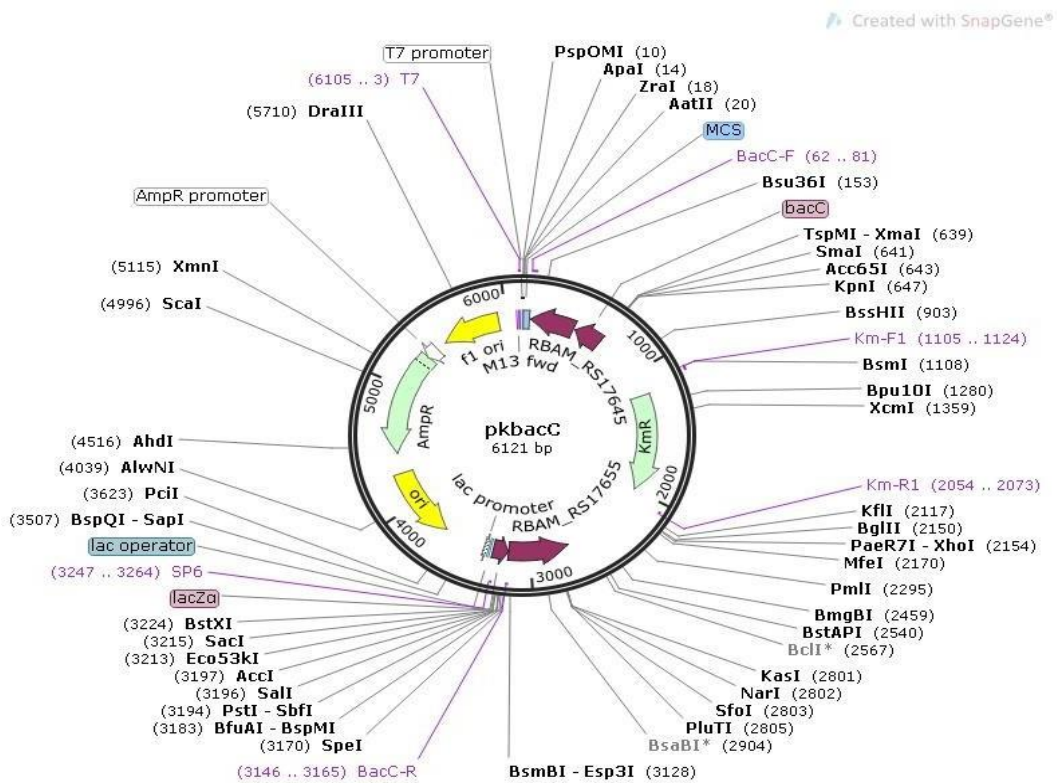


Figure 32: Carte du plasmide *pkbacC*, *Km<sup>r</sup>*

### I.3 Liste des amorces utilisées

L'ensemble des amorces PCR utilisées au cours de ce travail ainsi que les tailles des fragments amplifiés est listé dans le [tableau 10](#).

**Tableau 10:** Liste des amorces PCR utilisées dans ce travail

| Produit                                | Gène        | Amorce               | Séquence 5'-3'        | Tm (°C) | Taille (pb) |
|--|-------------|----------------------|-----------------------|---------|-------------|
| Difficidine                            | <i>dfnD</i> | <i>dfnD</i> -F       | GGACGAACGGAGATCCCTAT  | 55      | 1570        |
|  |             | <i>dfnD</i> -R       | TCTATCGACTCGGCCGTA    |         |             |
|  |             | Flank <i>dfnD</i> -F | CCC GCCAGATATGAGCATGT | 56      | 1938        |
|  |             | Flank <i>dfnD</i> -R | CGCCGATTCCAAACGTAAGG  |         |             |
| Macrolactine                           | <i>mlnA</i> | <i>mlnA</i> -F       | AGCGCAGTTTAAAGGAATGG  | 51      | 1576        |
|  |             | <i>mlnA</i> -R       | ATCCCGCAGCTTAACAAAAA  |         |             |
|  |             | Flank <i>mlnA</i> -F | GCTTACGTCTTTCCCGGACA  | 57      | 2038        |
|  |             | Flank <i>mlnA</i> -R | CAGCTTTTTGGGCGAGGTTC  |         |             |
| Bacilleane                             | <i>baeJ</i> | <i>baeJ</i> -F       | AGCGGGCTATACAGCATCAC  | 55      | 1702        |
|  |             | <i>baeJ</i> -R       | AGAGTGCGGCTGAACTGAAT  |         |             |
|  |             | Flank <i>baeJ</i> -F | GAAAGAAACCGGAATGGGCG  | 56      | 2120        |
|  |             | Flank <i>baeJ</i> -R | TGAATAGCCGCGCTCTTTGA  |         |             |
| Bacilysine                             | <i>bacC</i> | <i>bacC</i> -F       | CCATCGGAGCGATAAACAGT  | 62      | 1585        |
|  |             | <i>bacC</i> -R       | ATATCGCGCCTCCTAATGTG  |         |             |
|  |             | Flank <i>bacC</i> -F | GCTTCAAACGTGACCGCTTT  | 55      | 2267        |
|  |             | Flank <i>bacC</i> -R | TTTGTCCGACATCGCGCT    |         |             |
|  |             | T7                   | ATTATGCTGAGTGATATCCC  | 60      |             |
|  |             | SP6                  | AAGATATCACAGTGGATTTA  |         |             |
| Cassette de résistance à la kanamycine |             | Km F1                | TGCAAGGAACAGTGAATTGG  | 55      | 1500        |
|  |             | Km R1                | AGTACATCCGCAACTGTCCA  |         |             |

#### I.4 Milieux de culture, solutions, marqueurs de sélection antibiotiques et lipopeptides purs utilisés

Les milieux de culture, les solutions, les antibiotiques et les lipopeptides purs utilisés au cours de ce travail sont listés dans le [tableau 11](#).

**Tableau 11:** Milieux de culture, solutions, marqueurs de sélection antibiotiques et lipopeptides purs utilisés au cours de cette étude

| Milieu                            | Composition pour 1 L   |
|-----------------------------------|--|
| <b>Milieu LB</b>                  | Peptone 10 g, Extrait de levure 5 g, NaCl 5 g, pH: 7. Pour obtenir le milieu LB gélosé, 17 g d'Agar sont ajoutés au milieu liquide. La stérilisation du milieu se fait par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.  |
| <b>Mueller Hinton Broth (MHB)</b> | Mueller Hinton Broth 21 g  |
| <b>Milieu Landy</b>               | <p>La composition de ce milieu a été définie en 1948 par Landy (<a href="#">Guez et al., 2021</a>) : glucose 20 g, acide glutamique 5 g, extrait de levure 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g, KCl 0,5 g, CuSO<sub>4</sub> 1,6 mg, Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 1,2 mg, MnSO<sub>4</sub> 0,4 mg. Le pH est ajusté à 7,0 avec une solution de KOH 3M stérile. Il est tamponné par de l'acide 3-[N- morpholino]-propane sulfonique (MOPS) 21 g, préalablement stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,2 µm de porosité.</p> <p>➤ Préparation des solutions stocks du Landy</p> <p>Pour assurer une reproductibilité de la composition du milieu, des solutions concentrées stériles sont réalisées.</p> <p>La solution A contenant de l'extrait de levure 20X (20 g) et du MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) 20X (10g) est stérilisée par autoclavage à 121 °C durant 20 min.</p> <p>La solution B contenant les sels de potassium 20X (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 g, KCl 10 g) est stérilisée par autoclavage à 121 °C durant 20 min.</p> <p>La solution C contenant de glucose 20X (400 g) et stérilisée par</p> |

|   |  |
|---|--|
|   | <p>filtration à travers une membrane de porosité de 0,2 <math>\mu\text{m}</math>.</p> <p>La solution D contenant de MOPS 20X (420 g).</p> <p>La solution E contenant les oligoéléments 20X (<math>\text{CuSO}_4</math> 32 mg, <math>\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3</math> 24 mg, <math>\text{MnSO}_4</math> 8 mg), stérilisée par autoclavage à 121 °C durant 20 min.</p> <p>La solution F contenant de l'acide glutamique 20X (100 g), est ajustée à pH 8 en ajoutant de KOH (40 g) et stérilisée par filtration à travers une membrane de porosité de 0,2 <math>\mu\text{m}</math>.</p> <p>La préparation d'un litre de milieu de Landy est réalisée en ajoutant 50 mL de chaque solution concentrée dans l'ordre : A, B, C, D, E et F, puis en ajustant le pH à 7 avec du KOH (3 M) et en complétant avec de l'eau distillée stérile jusqu'à 1 L.</p> |
| <p><b>Milieu Eagle</b> modifié de Dulbecco (DMEM : Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)</p> | <p>Complété par 10 % de sérum fœtal bovin (Sigma), 100 U/mL de pénicilline, 0,1 mg/mL de streptomycine (PanBiotech GmbH, Hambourg, Allemagne) et 2 mM de L-glutamine (PanBiotech GmbH, Allemagne).</p>   |
| <b>Milieus utilisés pour la transformation</b>  |  |
| <b>ETM</b>  | <p>Sorbitol 91,08 g, Mannitol 91,085 g et 100 mL de glycérol, <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>, <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> et <math>\text{MgCl}_2</math> à des concentrations de 0,06 g, 0,06 g et 0,04 g, respectivement. Le pH a été ajusté à 7.</p>   |
| <b>LBSP</b>   | <p>Bouillon LB, Sorbitol 91,08 g, <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,06 g, <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> 0,06 g, pH 7</p>   |
| <b>TSMMP</b>  | <p>Tréhalose 171,1 g, Sorbitol 91,085 g, Mannitol 91,08 g, <math>\text{MgCl}_2</math> 0,04 g, <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,06 g, <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> 0,06 g, pH 7,2.</p>  |
| <b>LBMS</b>   | <p>Bouillon LB, Mannitol 91,085 g, Sorbitol 91,085 g.</p>  |
| <b>NCM</b>  | <p><math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> 17,4 g, NaCl 11,6 g, Glucose 5 g, Tryptone 5 g, Extrait de levure 1 g, Trisodium citrate 0,3 g, <math>\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})</math> 0,05 g, Sorbitol 91,1 g, pH 7,2.</p>  |

|   |   |
|---|---|
| <b>SMMP</b>                                     | Pour avoir du SMMP, deux volumes égaux de <b>SMM 2X</b> et de <b>PAB</b> sont mélangés.   |
| <b>SMM 2 X</b>                                  | Il est constitué de D(+) Saccharose 342,3 g, Acide maléique 116,1 g, MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O à 203,31 g. Son pH est ajusté à 6,5 avec du NaOH. Il est stérilisé à 105 °C pendant 10 min.   |
| <b>Bouillon de Penassay (PAB)</b>               | 5 g de digestion pancréatique de gélatine ou 5 g de peptone pancréatique de caséine, 1 g de glucose, 1,5 g d'extrait de levure, 1,5 g d'extrait de viande de boeuf, 3,5 g de NaCl, 3,68 g de phosphate dipotassique K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> et 1,32 g de phosphate monopotassique KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . Le pH est ajusté à 7,0. La solution est stérilisée par autoclavage à 105 °C pendant 20 min.   |
| <b>Milieu DM3</b>                               | 250 mL de succinate de sodium, 50 mL d'hydrolysate de caséine, 25 mL d'extrait de levure, 50 mL de solution de phosphate, 15 mL de glucose, 10 mL de MgCl <sub>2</sub> et 2,5 mL de BSA. Environ 110 mL d'agar (40 g) préchauffé à 60 °C sont ajoutés à la solution préalablement préparée. Les antibiotiques de sélection sont ajoutés si nécessaire. La solution obtenue est homogénéisée puis les boîtes sont coulées. |
| <b>Solution de succinate de sodium</b>          | Cette solution de succinate est de 162,05 g dont le pH est ramené à 7,3 avec du NaOH est stérilisée par autoclavage à 105 °C pendant 20 min.  |
| <b>Solution d'hydrolysate acide de caséine</b>  | 50 g de d'hydrolysate acide de caséine, stérilisée à 110 °C pendant 20min.  |
| <b>Solution d'extrait autolytique de levure</b> | 100 g d'extrait de levure, stérilisée par autoclavage à 110 °C pendant 20 min.  |
| <b>Tampon phosphate</b>                         | Elle est composée de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> à 35 g et de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> à 15 g. Elle est stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.  |
| <b>Solution de glucose</b>                      | 200 g de glucose, stérilisée par autoclavage à 110 °C pendant 20 min.   |

|   |  |
|---|--|
| <b>Solution de MgCl<sub>2</sub></b>                 | 95,2 g de MgCl <sub>2</sub> , stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.  |
| <b>Sérum Albumine Bovine (BSA)</b>                  | 20 g de BSA, stérilisée par passage sur un filtre de 0,2 µm de porosité.   |
| <b>Solution d'agar</b>                              | 40 g d'agar, stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.   |
| <b>Solution de Polyéthylène glycol (PEG) à 40 %</b> | 12,5 mL de SMM 2X sont dilués dans 12,5 mL d'eau distillée afin d'avoir du SMM 1X. 10 g de polyéthylène glycol sont mélangés à 25 mL de SMM 1X. La stérilisation est faite par autoclavage à 105 °C pendant 10 min.  |
| <b>Solution de lysozyme</b>                         | Elle est préparée à 2 g de SMMP et stérilisée par passage sur un filtre de 0,2 µm de porosité.   |
| <b>Eau peptonée</b>                                 | Peptone 10 g, NaCl 5 g, pH:7.  |
| <b>Milieu MMG</b>                                   | 19 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhydre, 6 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g de citrate de Na <sub>3</sub> anhydre, 0,2 g de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 2 g de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 µM de FeCl <sub>3</sub> (stérilisé par filtration à 0,22 µm), 2 µM de MnSO <sub>4</sub> , 8 g de glucose, 2 g d'acide glutamique, pH 7,0, stérilisé par autoclave. |
| <b>Les marqueurs de sélection antibiotiques</b>     |  |
| <b>Antibiotiques</b>                                | En fonction de la souche utilisée et de la résistance de celle-ci à certains antibiotiques, dans les milieux décrits ci-dessus peuvent être ajoutés des antibiotiques (Sigma-Aldrich). Les plus couramment utilisés sont l'ampicilline préparée à 20 mg/mL, la kanamycine préparée à 50 mg/mL et le chloramphénicol préparé à 5 mg/mL.   |
| <b>Solutions</b>                                    |  |
| <b>Tris acétate EDTA (TAE)</b>                      | Concentrée 50X : 242 g de Tris Base, 57,1 mL acide acétique glacial (10 X), 100 mL EDTA (0,5 M), 600 mL H <sub>2</sub> O, ajustée à pH 8 puis complétée avec de l'eau distillée stérile jusqu'à 1 L.   |
| <b>Tampon T<sub>10</sub>E<sub>1</sub></b>           | 10 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.  |
| <b>Lipopeptides purs commercialisés</b>             |  |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>Surfactine</b>    | L'ensemble des lipopeptides purifiés (iturine A, surfactine A et fengycine) utilisés comme standards pour la HPLC et les tests d'activités antibactériens a été acheté chez Sigma Aldrich, Saint Louis, USA (HPLC $\geq$ 95 %). La mycosubtiline (HPLC = 100 %) a été fournie par Lipofabrik (Lesquin, France). |
| <b>Fengycine</b>     |   |
| <b>Iturine A</b>     |   |
| <b>Mycosubtiline</b> |   |

## II. Méthodes

### II.1 Chapitre 1 : Caractérisation des métabolites produits par *B. velezensis* 32a et évaluation du pouvoir antagoniste des lipopeptides purs contre *A. tumefaciens*

#### II.1.1 Mise en évidence de l'activité antagoniste de *B. velezensis* 32a contre les souches d'*A. tumefaciens*

L'activité antagoniste de la souche 32a vis-à-vis des souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6 a été évaluée par la technique de diffusion à partir d'un puits. Pour ce faire, des cultures de 32a ont été effectuées dans le bouillon LB pendant 12 h à 30 °C, sous agitation de 200 rpm (**Ben Abdallah et al., 2018a**). Trois répétitions indépendantes ont été réalisées. Les précultures de 12 h ont été diluées 100 fois dans du milieu Landy et mises en culture dans les mêmes conditions pendant 24 h. Les cultures de 32a ont été diluées à la DO la plus faible, soit 2, si nécessaire. Le surnageant de chaque culture a été récupéré par centrifugation à 13000 rpm pendant 20 min, suivi par une filtration avec des filtres à seringue en acétate de cellulose (CA) d'une porosité de 0,22  $\mu$ m (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Allemagne). Le surnageant résultant a ensuite été testé contre les souches d'*A. tumefaciens* conformément à la procédure suivante. Des cultures d'une nuit de souches d'*A. tumefaciens* (C58 et B6) ont été normalisées à  $10^8$  UFC (Unité formant colonie)/mL dans du milieu LB gélosé (1,2 % d'agar) et rapidement réparties sur les boîtes (**Chen et al., 2021**). Ensuite, des puits de 5 mm de diamètre ont été creusés, et 100  $\mu$ L du surnageant bactérien à tester y ont été déposés. Les boîtes inoculées ont été maintenues pendant 2 à 4 h à 4 °C pour permettre la diffusion du surnageant bactérien, puis, elles ont été incubées à 30 °C pendant 48 h. L'activité antibactérienne a été examinée en mesurant la distance entre les bords du puits et la zone où la croissance d'*A. tumefaciens* a été inhibée.

## Identification des lipopeptides, des polykétides et de la bacilysine par RP-HPLC-MS

Afin d'identifier les métabolites antibactériens en suspension dans le surnageant, une analyse par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (RP-HPLC-MS) a été conduite.

### II.1.1.1 Culture de *B. velezensis* en fioles d'Erlenmeyer

La production de métabolites secondaires par la souche 32a a été réalisée dans un milieu Landy (Guez et al., 2021). Afin de maintenir le pH durant la culture, 0,1 M du MOPS a été ajouté à ce milieu, avec un pH initial de 7. À partir d'une culture solide de 32a, une colonie isolée a été prélevée et mise en culture dans du LB liquide pendant une nuit à 30 °C, sous une agitation de 200 rpm (Ben Abdallah et al., 2018a). Cette préculture a été utilisée pour inoculer une première culture de 50 mL dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, avec une densité optique (DO<sub>600</sub>) initiale de 0,0001. Cette culture a été arrêtée lors de sa phase exponentielle de croissance à une DO<sub>600</sub> maximale de 4. A ce stade, un erlenmeyer de 1 L avec un volume utile de 200 mL a été inoculé avec la culture précédente de la souche 32a de sorte que la DO<sub>600</sub> soit égale à 0,2. La culture a été maintenue en incubation à 30 °C pendant 72 h sous une agitation de 200 rpm. Après 72 h, la culture de 32a a été diluée à la DO la plus faible, soit 5, si nécessaire. Ensuite, la culture a été centrifugée pendant 30 à 40 min à 11000 rpm pour éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant obtenu a été stocké à 4 °C en vue de son utilisation ultérieure pour l'analyse RP-HPLC-MS. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées.

### II.1.1.2 Caractérisation biochimique des métabolites de 32a par RP-HPLC-MS

La RP-HPLC-MS a été utilisée pour identifier les composés produits dans le surnageant de *B. velezensis* 32a. Les composés antimicrobiens ont été séparés et caractérisés à l'aide d'un système Acquity de classe H (Waters, Massachusetts, USA) équipé d'une colonne C18 (250 × 3,0 mm, 5 µm de particules, Interchim, Montluçon, France) et associé à un détecteur à matrice de photodiodes (PDA) et un détecteur de masse ACQUITY QDa (Waters). Le surnageant a été dilué dans de l'éthanol à 50 % final (v/v) et 10 µL ont été injectés dans la colonne avec un débit de 0,6 mL/min. La détection UV a été réalisée à 214, 230 et 280 nm. Ces longueurs d'ondes permettent de détecter des lipopeptides, de la bacilysine et des polykétides, respectivement. L'élution a été effectuée selon un gradient d'eau/d'acide formique (0,1 %) (solution A) et

d'acétonitrile/d'acide formique (0,1 %) (solution B) comme suit: 0 à 5 min (95 % A et 5 % B), 5-40 min (5 % A et 95 % B), 40-45 min (0 % A et 100 % B), 45-50 min (95 %-5 %). L'ionisation du composé a été réalisée avec une source d'ionisation electrospray chauffée (HESI) et les mesures de masse ont été effectuées en mode positif et sur une plage de masse de m/z 200-1250.

La présence de lipopeptides, de polykétides et de bacilysine a été confirmée par leurs masses moléculaires avec une tolérance de  $\pm 0,65$  m/z. De plus, pour confirmer l'identification des lipopeptides, des solutions standards de surfactine A, d'iturine A et de fengycine (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) ont été préparées à partir des molécules pures diluées dans de l'éthanol 50 % final (v/v) à une concentration finale de 400 mg/L. Cependant, les polykétides (macrolactine, difficidine et bacillaène) ne sont pas disponibles en tant qu'échantillons standards commercialisés. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées.

### **II.1.2 Analyse par spectrométrie de masse à haute résolution des lipopeptides ituriniques de *B. velezensis* 32a**

Le lipopeptide iturinique (iturine A ou mycosubtiline) produit par 32a a été déterminé par RP-HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (RP-HPLC-MS/MS) pour déterminer les résidus d'acides aminés de la séquence iturinique. Brièvement, 10  $\mu$ L du surnageant 32a filtré (comme précédemment décrit ci-dessus) et des solutions standards à 1 g/L d'iturine A et de mycosubtiline ont été caractérisés en utilisant les mêmes conditions RP-HPLC comme précédemment décrit ci-dessus. Ensuite, les peptides chromatographiés ont été ionisés avec une source d'ionisation electrospray du Q-TOF Synapt G2-Si™ (Waters Corporation, Manchester, UK).

L'analyse des ions précurseurs a été effectuée en mode positif suivie d'une fragmentation en données dépendantes (DDA). La température de la source a été réglée à 150 °C et les tensions du capillaire et du cône ont été réglées à 3000 et 60 V, respectivement. Avec un temps de balayage de 0,2 s, les données MS ont été collectées pour des valeurs m/z comprises entre 200 et 1500 Da. Pour l'étude MS/MS, un maximum de 5 ions précurseurs avec un seuil d'intensité de 1000 a été choisi. Les données MS/MS ont été collectées pour des valeurs m/z comprises entre 10 et 3000 Da en utilisant le mode de dissociation induite par collision (CID). Une période de balayage de 0,1 s a été spécifiée et les plages de tension étaient de 10 V à 15 V pour un m/z faible (200 Da) et de 20 V à 100 V pour un m/z élevé (1500 Da).

Ensuite, des essais de sensibilité *in vitro* vis-à-vis des souches d'*A. tumefaciens* aux lipopeptides purs ont été envisagés.

### II.1.3 Activité antibactérienne des lipopeptides purs contre *A. tumefaciens*

#### II.1.3.1 Evaluation qualitative

L'activité antagoniste de trois familles de lipopeptides de *B. subtilis* : l'iturine A, la mycosubtiline, la surfactine A et la fengycine a été évaluée à partir des molécules pures. Afin d'étudier la capacité des lipopeptides purs à inhiber la croissance des souches d'*A. tumefaciens*, 1 mL de l'inoculum à  $10^8$  UFC/mL a été inoculé uniformément sur des boîtes LB gélosées en utilisant la méthode d'inondation (Bobu et al., 2016). Étant donné leur faible solubilité dans de l'eau, les lipopeptides purs ont été dissous dans 100 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10 g/L, puis dilués dans de l'eau stérile à 100 mg/L.

Afin de déterminer leurs interactions synergiques, des mélanges de (surfactine A + fengycine), (surfactine A + mycosubtiline + iturine A) et (surfactine A + fengycine + mycosubtiline + iturine A) ont été préparés dans un rapport de 1:1 (v/v), 1:1:1 (v/v/v) et 1:1:1:1 (v/v/v/v), respectivement. Comme témoin, l'eau distillée stérile à 1 % de DMSO a été utilisée. Par la suite, 100  $\mu$ L de lipopeptide pur ont été placés dans chaque puits préalablement creusé sur la gélose. Les boîtes ont été laissées à 4 °C pendant 2 à 4 h pour permettre la diffusion des lipopeptides. Par la suite, les boîtes ont été incubées pendant 48 h à 30 °C. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées.

#### II.1.3.2 Evaluation quantitative

Également, afin de mesurer quantitativement l'activité antagoniste *in vitro* des lipopeptides purs contre les souches d'*A. tumefaciens*, la méthode de microdilution en bouillon (comme recommandée par l'ISO 20776-1 :2019) a été effectuée dans des microplaques stériles à 96 puits. Pour ce faire, une solution mère de lipopeptides a été préparée à une concentration initiale de 1000 mg/L dans un milieu de bouillon Muller-Hinton (MHB) additionné de 2,5 % de DMSO. Chaque colonne contenait 100  $\mu$ L d'une dilution en double en série de lipopeptide ou du mélange de lipopeptides en milieu MHB. Ensuite,  $10^8$  UFC/mL de l'inoculum bactérien ont été introduits dans chaque puits. Les plaques ont été incubées à 30 °C pendant 48 h. La croissance bactérienne a été mesurée à 600 nm avec un spectrophotomètre à microplaques

(SpectraMax® iD3, Molecular Devices, San Jose, États-Unis). Trois répétitions indépendantes ont été réalisées.

## **II.2 Chapitre 2 : Etude de l'implication des polykétides et de la bacilysine des mutants de *B. velezensis* 32a et GA1 contre *A. tumefaciens***

### **II.2.1 Construction des mutants de *B. velezensis* 32a incapables de produire les polykétides et de la bacilysine**

#### **II.2.1.1 Extraction de l'ADN génomique de *B. velezensis* 32a**

L'isolement de l'ADN génomique à partir de la souche 32a a été effectué en utilisant le kit d'extraction Promega « Wizard® Genomic DNA Purification Kit » (Promega Madison, USA) selon les instructions du fabricant.

#### **II.2.1.2 Amplification par PCR**

La PCR est une technique d'amplification spécifique d'une séquence d'ADN grâce à l'emploi de deux oligonucléotides de synthèse qui s'hybrident avec des séquences qui leur sont complémentaires et qui bordent la séquence à amplifier. Ces oligonucléotides sont élaborés par bioinformatique à partir des séquences publiées du génome de *B. velezensis* FZB42 (PubMed gene NC-009725.2). Tous les oligonucléotides utilisés au cours de ce travail sont présentés dans le [tableau 10](#). Ces amorces ont été utilisées pour amplifier par PCR les fragments des gènes *dfnD*, *mlnA*, *baeJ* et *bacC* responsables respectivement de la synthèse de la difficidine, de la macrolactine, de la bacillaène et de la bacilysine. La PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 µL, contenant 34,75 µL de H<sub>2</sub>O, 5 µL de tampon Taq PCR (10X), 3 µL de dNTPs (200 µmol/L), 3 µL de chaque amorce (0,4 µL mol/L), 0,25 µL de Taq polymérase (1,25 U pour 50 µL de PCR, GoTaq, Promega, Madison, WI, USA) et 1 µL d'ADN extrait (à 50 ng/µL). Les mêmes conditions sont appliquées au témoin négatif dépourvu d'ADN.

L'amplification a été réalisée en utilisant un thermocycleur (Applied Biosystems) selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 min à 95 °C, suivie de 35 cycles comprenant une dénaturation de 30 sec à 95 °C, 1 min à la température d'hybridation (voir tableau 2), une élongation de 2 min à 72 °C, et enfin une étape d'élongation à 72 °C pendant 10 min.

### II.2.1.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse dans cette étude a été réalisée pour sélectionner un fragment d'ADN de taille voulue, de le récupérer et l'extraire par la suite. Les produits de la PCR ont été systématiquement analysés et visualisés par électrophorèse dans un tampon Tris acétate EDTA (TAE : 0,5X) à 1 % d'agarose. La migration a été effectuée à 110 V pendant une heure.

Les résultats ont été lus à l'aide de l'appareil GelDoc de Bio-Rad (*Biorad* Gel Doc XR+). Les marqueurs de taille M1 GeneRuler de 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) et  $\lambda$ PstI ont été utilisés.

### II.2.1.4 Digestion enzymatique et purification

Les enzymes de restrictions utilisées et la T4 DNA ligase proviennent de Fermentas (Fermentas, Burlington, Canada). Les produits PCR ont été séparés sur gel d'agarose avant d'être purifiés. Ensuite, ils ont été excisés du gel et purifiés en suivant le protocole du kit QIA quick gel extraction kit de QIAGEN (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

### II.2.1.5 Clonage des gènes dans pGEM-T Easy

#### II.2.1.5.1 Ligation

Les fragments d'ADN issus de l'amplification par PCR sont clonés, après purification, dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega) *via* leurs extrémités cohésives 3'-T (**Figure 33**). La quantité de l'ADN à ajouter au mélange de ligation se calcule selon la formule suivante :  $50 \text{ ng (vecteur)} \times (\text{taille de l'insert}/\text{taille du vecteur}) \times 3 = \text{ng d'insert pour un ratio de } 1/3 \text{ (vecteur/insert)}$ . Afin d'optimiser le clonage, les produits de PCR obtenus ont été préalablement adénylés en 5' par un traitement à la Taq polymérase pendant 30 min à 72 °C. Par la suite, les volumes utilisés pour la ligation étaient 5  $\mu$ L tampon (2X), 1  $\mu$ L du vecteur pGEM-T Easy, 3  $\mu$ L du produit PCR purifié et 1  $\mu$ L de ligase. La ligation du fragment d'DNA dans le site de clonage multiple du pGEM-T Easy se déroule pendant 16 h à 4 °C.



### II.2.1.5.2 Préparation des cellules chimiocompétentes d'*Escherichia coli*

Pour que la transformation se produise, les bactéries réceptrices doivent être compétentes c'est-à-dire capables d'accepter un ADN exogène. La bactérie à transformer a été mise en culture dans le milieu LB une nuit à 37 °C sous une agitation de 200 rpm. Le lendemain, 0,4 mL de la préculture ont été dilués dans 50 mL de milieu LB et remis en culture à 37 °C sous une agitation de 200 rpm. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,3 et 0,4, la culture a été arrêtée et transférée dans un tube Falcon de 50 mL. Les tubes sont-maintenus dans la glace pendant 10 min. Il est important de maintenir la chaîne du froid tout au long des opérations qui suivent. La culture refroidie a été ensuite centrifugée pendant 10 min à 4000 g à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et le culot lavé avec 10 mL de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) froid. Les cellules ont été délicatement suspendues et préservées dans la glace durant 10 min. La suspension obtenue de ce lavage a été centrifugée selon les caractéristiques énoncées ci-dessus, puis le surnageant a été jeté. Le culot cellulaire a été resuspendu délicatement dans 2 mL de CaCl<sub>2</sub> (50 mM)/Glycérol 15 %. Enfin, la préparation a été répartie en aliquots de 200 µL dans des tubes Eppendorfs froids. Puis, 80 µL d'une solution stérile de glycérol 60 % ont été ajoutés aux cellules compétentes et conservée à -80 °C. Dans ces conditions, les cellules peuvent être conservées pendant plusieurs semaines.

### II.2.1.5.3 Transformation par choc-thermique

Cette transformation consiste à insérer des plasmides réplicatifs dans des cellules d'*E. coli*. Environ 200 µL de bactéries chimiocompétentes, préalablement décongelés dans la glace pendant 10 min, ont été mises au contact avec 5 µL de produit de ligation dans un microtube de 1,5 mL. Le tout a été mélangé doucement et laissé 20 min dans de la glace. Le transfert du plasmide dans la bactérie est provoqué par un choc thermique en mettant le mélange 90 sec à 42 °C sans agiter puis, il a été immédiatement transféré dans la glace pendant 2 min. 800 µL du milieu LB ont été ajoutés au mélange et le tout a été incubé pendant 1 h à 37 °C sous agitation. Cent µL de cette transformation ont été étalés sur du milieu LB solide additionné de l'ampicilline (60 µg/mL) et du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D galactoside) (8 mg/L) et de l'IPTG (isopropyl-bêta-D-thiogalactopyranoside) (80 µg/mL). Cette étape permet de sélectionner les bactéries transformées par le vecteur pGEM-T Easy contenant le fragment d'intérêt, *via* la résistance à l'ampicilline présente dans le vecteur et le test « Blanc- bleu ». Les boîtes de Petri ont été incubées à 37 °C pendant une nuit. Les colonies de couleur blanche ayant

poussé ont été mises en culture dans du milieu LB liquide contenant de l'ampicilline pendant une nuit à 37 °C.

Lorsque la bactérie a été transformée par un plasmide non recombinant (ne portant pas le gène d'intérêt), la  $\beta$ -galactosidase est produite dans le milieu et hydrolyse le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), libérant l'indole substitué qui se dimérise spontanément pour donner une coloration bleue. Sur le milieu de croissance contenant du X-gal, les colonies d'*E. coli* qui ont une  $\beta$ -galactosidase active deviennent bleue à cause de cette réaction et la présence de l'IPTG induit l'expression du gène *lacZ*. Lorsqu'un insert est présent dans le plasmide au niveau du site multiple de clonage, le gène *lacZ* porté par le vecteur n'est plus fonctionnel. L'X-Gal ne peut plus être métabolisé et la colonie transformée reste blanche (Juers et al., 2012).

## II.2.1.6 Validation de l'intégration d'un plasmide dans une cellule bactérienne

### II.2.1.6.1 Extraction de plasmides à partir d'*E. coli*

À la fin du temps d'incubation, les colonies blanches présentes sur la boîte de Petri ont été remises en culture dans 1,5 mL LB + antibiotique (ampicilline), puis incubées à 37 °C pendant 16 heures sous une agitation de 200 rpm.

La technique du « boiling » a été utilisée pour l'extraction des plasmides. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une solution particulière dont la composition se présente comme suit: Saccharose, 8 %; Triton X-100, 0,5 %; EDTA, 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8. Puis, la solution a été stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min. Après centrifugation pendant 10 min à 10000 g, le culot est ensuite repris dans 350  $\mu$ L de solution de « boiling ». Puis, 25  $\mu$ L de la solution de lysozyme à 10 mg/mL ont été ajoutés. Le mélange a été placé dans de l'eau bouillante pendant 90 sec. Ensuite, le tube a été centrifugé pendant 20 min à 13000 g. Puis, 44  $\mu$ L d'acétate de sodium 2 M et 440  $\mu$ L d'isopropanol ont été ajoutés au surnageant. Le tout a été centrifugé pendant 20 min à 13000 g. Le culot a été lavé par 500  $\mu$ L d'éthanol à 70 %. Après séchage à l'air, le culot a été suspendu dans du tampon T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM ; pH 8). Puis, l'extrait d'ADN a été analysé sur gel d'agarose à 0,7 %.

## II.2.1.6.2 Détermination de la présence de l'insert dans le vecteur pGEM-T Easy

### II.2.1.6.2.1 Vérification par PCR

La détermination de l'insertion du fragment désiré au sein du pGEM-T Easy a été faite par réaction PCR en choisissant des amorces ciblant le vecteur. Les amorces spécifiques du pGEM-T Easy utilisées étaient T7 (ATTATGCTGAGTGATATCCC) et SP6 (AAGATATCACAGTGGATTTA). La température d'hybridation utilisée était de 60 °C et le temps d'élongation a été fixé à 2 min et 35 cycles ont été nécessaires.

### II.2.1.6.2.2 Vérification par digestion

En plus de la vérification par PCR, une digestion enzymatique a été réalisée pour vérifier les plasmides extraits des clones sélectionnés. L'enzyme a été sélectionnée en fonction de la carte de restriction du plasmide (**Tableau 12 et Figure 34**). Le plasmide pGEM-T Easy-insert a été digéré par l'enzyme de restriction dans un volume total de 10 µL. Dans un microtube de 1,5 mL, 1 µL de tampon (10 X) (fourni avec l'enzyme de restriction), 4 µL d'ADN plasmidique (50 ng) et 1 µL de l'enzyme de restriction ont été introduits et le mélange a été complété à 10 µL avec de l'eau ultra-pure stérile. L'ensemble a été homogénéisé puis centrifugé pendant quelques secondes. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 1 heure à 37 °C. Le plasmide digéré a été ensuite soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose. La taille du fragment linéarisé généré après digestion du plasmide est supposée être la somme du vecteur pGEM-T Easy et l'insert.

**Tableau 12:** Enzymes utilisées pour la vérification des clones positifs

| Plasmides                               | Enzymes         | Tailles attendues après digestion (pb) |
|---|-----------------|--|
| pGEM-T Easy- <i>dfnD</i> : <i>pdfnD</i> | <i>Hind</i> III | 3015+1570=4585 pb                      |
| pGEM-T Easy- <i>mlnA</i> : <i>pmlnA</i> | <i>Hind</i> III | 3015+1576=4591 pb                      |
| pGEM-T Easy- <i>baeJ</i> : <i>pbaeJ</i> | <i>Hind</i> III | 3015+1702=4717 pb                      |
| pGEM-T Easy- <i>bacC</i> : <i>pbacC</i> | <i>Sma</i> I    | 3015+1585=4600 pb                      |

3015 pb: pGEM-T Easy, 1570 pb: fragment *dfnD*, 1576 pb: fragment *mlnA*, 1702 pb: fragment *baeJ*, 1585pb: fragment *bacC*.

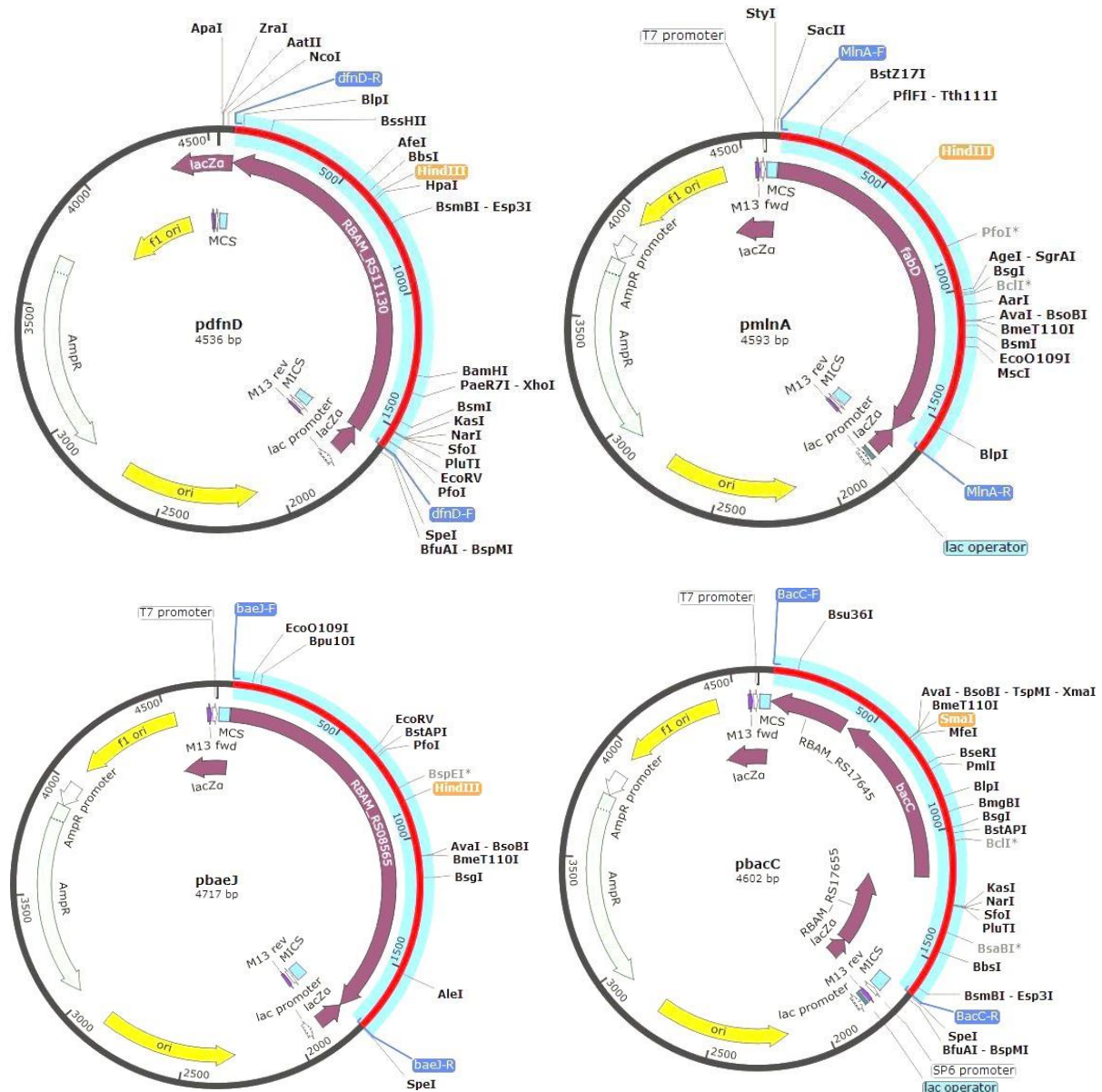


Figure 34: Cartes de restriction des plasmides *pdfnD*, *pmlnA*, *pbaeJ* et *pbacC*

### II.2.1.7 Clonage de la cassette de résistance à la kanamycine (km) dans les vecteurs générés

Chaque gène cloné dans pGEM-T Easy a été interrompu par le gène codant la cassette de résistance à la kanamycine (1500 pb) (Sapunaric et al., 2003). Celle-ci, issue de la digestion du vecteur pDG792 (Figure 28), a été purifiée puis ligaturée aux plasmides préalablement digérés par les mêmes enzymes de restriction que celles de la cassette et purifiés (Tableau 13). Pour éviter la recirculation du vecteur, celui-ci a été traité à la phosphatase alcaline selon la formule suivante: 6  $\mu$ L du plasmide, 1  $\mu$ L de phosphatase alcaline, 1  $\mu$ L de son tampon (10X)

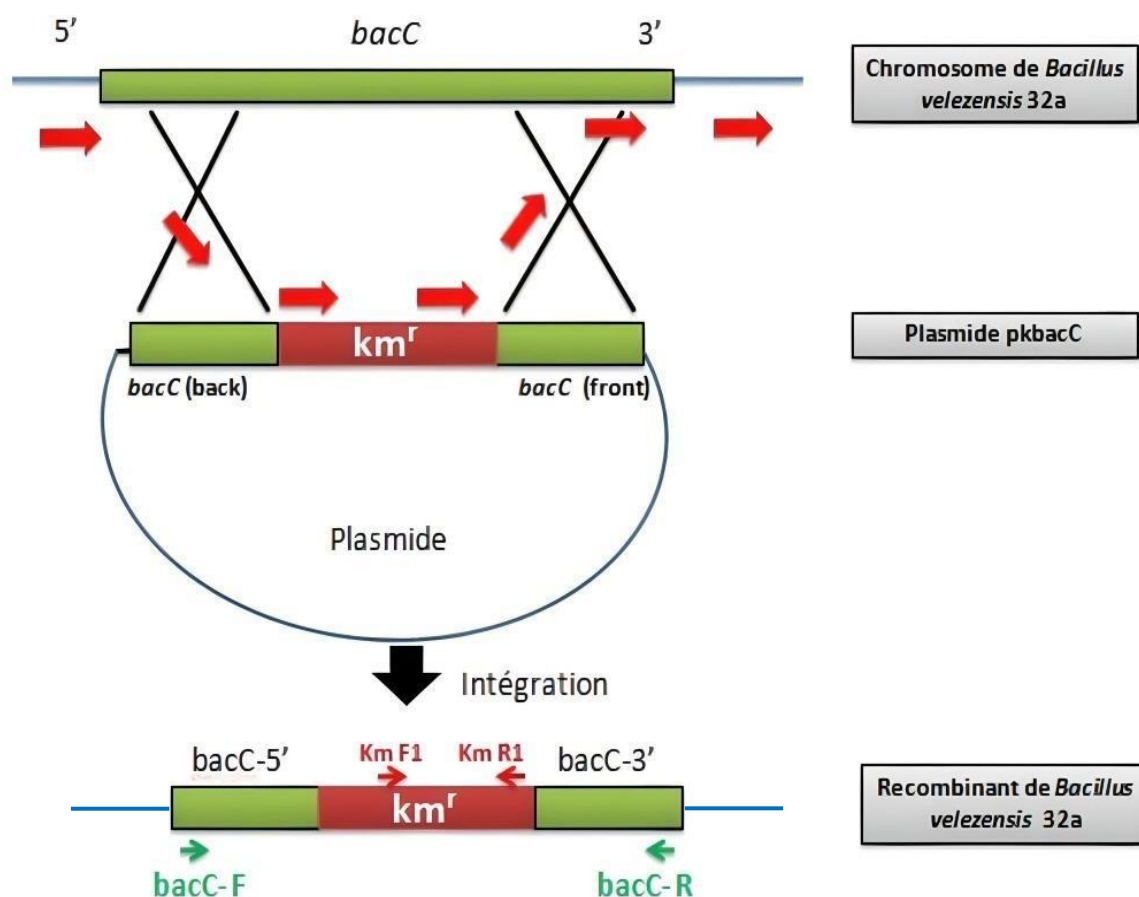
et le mélange a été complété à 10  $\mu$ L avec de l'eau ultra-pure stérile. Le tout a été incubé pendant 10 min à 37 °C. La phosphatase a été ensuite désactivée par incubation 5 min à 75 °C. De même, les mélanges de ligation ont servi pour la transformation des souches compétentes d'*E. coli*. Les transformants ont été sélectionnés sur LB+Km (50  $\mu$ g/mL) et incubés à 37 °C pendant 24 h. La vérification de l'insertion de la cassette a été validée par digestion en utilisant les enzymes répertoriées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 13:** Enzymes utilisées pour la digestion des vecteurs générés et le plasmide portant la cassette de résistance à la kanamycine (pDG792)

| Plasmides générés        | Plasmide portant la cassette | Enzymes de digestion       | Plasmides générés |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|
| pGEM-T Easy- <i>dfnD</i> | pDG792                       | <i>Hind</i> III            | pK <i>dfnD</i>    |
| pGEM-T Easy- <i>mlnA</i> |                              |                            | pK <i>mlnA</i>    |
| pGEM-T Easy- <i>baeJ</i> |                              |                            | pK <i>baeJ</i>    |
| pGEM-T Easy- <i>bacC</i> |                              | <i>Sma</i> I+ <i>Stu</i> I | pK <i>bacC</i>    |

### II.2.1.8 Essais de transformation de la souche *B. velezensis* 32a

L'étape finale est la transformation de la souche de *B. velezensis* 32a pour l'interruption du gène d'intérêt après recombinaison homologue. Comme indiquée sur la [figure 35](#), la double recombinaison homologue attendue permettra le remplacement des gènes de la souche sauvage par des fragments interrompus par la cassette à la kanamycine. Les mutants seront sélectionnés sur la base de leur résistance à la kanamycine.



**Figure 35:** Schéma de la double recombinaison homologue (double cross-over) entre le fragment d'ADN *bacC* de 32a et le fragment *bacC* (F)-*km<sup>r</sup>*-*bacC* (R) porté par *pkbacC*

Sachant que la souche de *B. velezensis* 32a s'est avérée extrêmement difficile à l'incorporation d'ADN exogène, trois protocoles différents d'électrotransformation, l'utilisation des protoplastes et le protocole de compétence naturelle induite par limitation en azote ont été investigués comme suit :

#### II.2.1.8.1 Electro-transformation selon Cao et al. (2011)

Une colonie de 32a a étéensemencée dans le milieu LB pendant une nuit à 37 °C à 200 rpm. Le lendemain, 2,6 mL ont été inoculés dans 40 mL de LBSP. Ensuite, la culture a été incubée à 37 °C sous une agitation de 200 rpm. Une fois que les cellules ont atteint une  $DO_{600}$  de 0,5, un agent d'affaiblissement cellulaire (0,75 % de glycine/0,05 % de Tween 80) a été ajouté et incubé pendant 1 h à 37 °C à 200 rpm. Les cellules dans le milieu de croissance ont été refroidies dans la glace pendant 10 min puis récoltées à 10000 g pendant 5 min à 4 °C. Les cellules récoltées ont été lavées trois fois avec du tampon TSMMP (Tableau 11) et enfin remises en suspension dans du TSMMP pour l'électroporation.

Les cellules électro-compétentes (60  $\mu$ L) ont été mélangées avec le plasmide et incubées dans de la glace pendant 3 min. Après électroporation par une seule impulsion de 2,1 kV/cm générée par le Bio-Rad Gene Pulser, avec une résistance et une capacité à 200  $\Omega$  et 25  $\mu$ F, respectivement, 1 mL de LBMS a été ajouté immédiatement et incubé à 37 °C, 200 rpm pendant 3 h. Des aliquots de la culture de récupération ont ensuite été étalés sur LB additionné de kanamycine (50  $\mu$ g/mL). La croissance des colonies sur le milieu de sélection a été suivie pendant 48 h à 30 °C.

#### II.2.1.8.2 Electro-transformation selon Zhang et al. (2011)

Afin d'obtenir des cellules compétentes à partir de *B. velezensis* 32a, un essai d'électro-transformation suivant le protocole de **Zhang et al. (2011)** a été conduit. Une colonie de 32a a été cultivée pendant une nuit dans le milieu LB, puis diluée 100 fois dans du milieu de culture frais de NCM. La culture a été incubée à 37 °C sous une agitation de 200 rpm. Une fois que les cellules ont atteint une  $DO_{600}$  de 0,5, l'affaiblissement de la paroi cellulaire a été effectué en ajoutant 3,89 % de glycine et 1,06 % de DL-thréonine. Après 1 heure d'agitation à 37 °C, les cellules ont été refroidies dans la glace pendant 20 min et soumises à une centrifugation à 4 °C, 8000 g pendant 5 min. Les cellules récoltées ont été lavées quatre fois avec le tampon ETM froid. Les cellules électro-compétentes ont été remises en suspension dans 1/100 de volume de la culture d'origine. Les cellules électro-compétentes (100  $\mu$ L) ont été mélangées avec de l'ADN plasmidique purifié. Le mélange a été chargé dans une cuvette d'électroporation froide (1 mm). Après 3 min d'incubation dans la glace, le mélange cellule-ADN a été électroporé par une seule impulsion de 2,1 kV/cm générée par un Bio-Rad Gene Pulser, avec une résistance et une capacité à 200  $\Omega$  et 25  $\mu$ F, respectivement. Les cellules ont été immédiatement diluées dans 1 mL du milieu de récupération (NCM avec du mannitol 0,38 M et sorbitol 0,5 M). Les cellules remises en suspension dans le milieu de récupération ont été chauffées à 46 °C pendant 6 min afin d'inactiver le système de restriction-modification (RM), puis incubées à 37 °C pendant 3h pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques. Des aliquots de la culture de récupération ont ensuite été étalés sur LB additionné de kanamycine (50  $\mu$ g/mL).

#### II.2.1.8.3 Transformation par utilisation des protoplastes

Une culture d'une nuit de la souche à transformer a été préparée dans 10 mL du milieu LB. Ensuite, cette pré-culture a été diluée au 1/20 dans le bouillon LB. La culture a été incubée pendant environ 2 h à 37 °C, avec une agitation à 200 rpm, jusqu'à ce que la  $DO_{600}$  atteigne une

valeur comprise entre 1,5 et 2. La culture a été ensuite centrifugée pendant 10 min à 4000 g dans des conditions stériles. Le surnageant a été retiré de manière stérile et le culot bactérien a été remis en suspension dans 2,5 mL de milieu SMMP en utilisant un vortex. Par la suite, le lysozyme a été ajouté à une concentration finale de 1,5 mg/mL. L'échantillon a été placé dans un tube à centrifuger stérile et incubé à 37 °C, sous une agitation de 200 rpm. La formation des protoplastes a été surveillée par observation microscopique. Lorsque moins de 1 % des cellules sont encore présentes sous forme de bâtonnets, l'échantillon a été centrifugé pendant 10 min à 4000 g. Le surnageant a été retiré, et le culot a été délicatement remis en suspension dans 2 mL du milieu SMMP. À cette étape de l'expérience, des volumes de 150 µL de protoplastes peuvent être congelés à -80 °C dans des tubes de 2 mL.

Environ 0,2 µg d'ADN plasmidique ont été délicatement combinés avec 150 µL de protoplastes. Par la suite, 450 µL de PEG (4000) à 40 % ont été ajoutés aux protoplastes et le mélange a été délicatement agité avant d'être incubé pendant 2 min à température ambiante. Ensuite, 1,5 mL de milieu SMMP ont été ajoutés et l'ensemble a été soigneusement mélangé. L'échantillon a été centrifugé pendant 10 min à 5000 g. Le surnageant a été retiré, puis le culot a été remis en suspension dans 150 µL de milieu SMMP. Les protoplastes ont été incubés à 37 °C pendant 90 min pour permettre l'expression des gènes de résistance. Ensuite, les protoplastes ont été étalés sur des boîtes de milieu DM3 contenant l'antibiotique de sélection, et la croissance des colonies sur le milieu de sélection a été suivie pendant au moins une semaine à 30 °C.

#### **II.2.1.8.4 Transformation suivant un protocole d'*Enterococcus faecalis* optimisée au laboratoire BioEcoAgro**

Un essai de transformation par un protocole spécifique à *E. faecalis* a été investigué. La souche de *B. velezensis* 32a a été mise en culture dans le milieu LB pendant une nuit à 37 °C, sous une agitation de 200 rpm. Le lendemain, 4 mL de la préculture ont été dilués dans 200 mL du milieu LB, puis remis en culture dans un erlenmeyer à baffles à 37 °C sous 200 rpm. Lorsque la DO<sub>600</sub> nm atteint une valeur de 0,5, la culture a été centrifugée pendant 10 min à 4000 rpm et à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été délicatement suspendues dans 50 mL d'eau ultra-pure froide (4 °C). La suspension obtenue a été centrifugée pendant 10 min à 4000 rpm et à 4 °C. Le culot cellulaire a été délicatement resuspendu dans 25 mL d'une solution froide (4 °C) d'eau ultra-pure + Glycérol 10 % (1/2+1/2). Suite à cela, différentes étapes de centrifugation ont été entreprises :

Centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm à 4 °C. Culot+25 mL d'eau ultra-pure + glycérol 10 % (1/2+1/2) froid.

Centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm à 4 °C. Culot+25 mL d'eau ultra-pure + glycérol 10 % (1/2+1/2) froid.

Centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm à 4 °C. Culot+25 mL d'eau ultra-pure + glycérol à 10 % (1/2+1/2) froid.

Centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm à 4 °C. Culot+12,5 mL de glycérol à 10 % froid.

Centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm à 4 °C. Culot+ 500 µL de glycérol à 10 % froid.

Ensuite des aliquots de 50 µL par tube pré-refroidi ont été mis à -80 °C.

La transformation a été réalisée pour les différents gènes (*dfnD*, *mlnA*, *baeJ* et *bacC*) à différentes concentrations d'ADN (10, 16 et 100 ng) en intégrant les plasmides traités différemment :

Linéarisés par des enzymes de restrictions adéquats,

Amplifiés par PCR,

Amplifiés avec le Kit TempliPhi (illustra™ TempliPhi™, Cytiva : les matrices d'ADN sont préparées par amplification en cercle roulant en utilisant l'ADN polymérase du bactériophage Phi29).

Circulaires

La vérification de la recombinaison a été effectuée par l'analyse PCR en désignant des amorces spécifiques à une région de la cassette de résistance à la kanamycine et des amorces flanquantes de part et d'autre du gène ([Tableau 10](#)).

#### II.2.1.8.5 Transformation de *B. velezensis* 32a par compétence naturelle induite par la limitation en azote

Les fragments résultants de *pkdfnD*, *pkmlnA*, *pkbaeJ* et *pkbacC*, ont été amplifiés à l'aide de la méthode TempliPhi™ et de la PCR, puis intégrés dans le génome de *B. velezensis* 32a par la double recombinaison homologe. Cette intégration a été effectuée en exploitant la compétence naturelle induite par la limitation en azote ([Andric et al., 2021](#)), générant ainsi les mutants knock-out Bvd ( $\Delta dfnD::Km^r$ ), Bvm ( $\Delta mlnA::Km^r$ ), Bvbe ( $\Delta baeJ::Km^r$ ) et Bvbc ( $\Delta bacC::Km^r$ ). Brièvement, la souche 32a de *B. velezensis* a été cultivée dans le milieu liquide LB à 37 °C et 160 rpm jusqu'à ce que la valeur de la DO<sub>600</sub> atteigne 1. Par la suite, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau peptonée (froide), puis avec le milieu liquide minimal de sels modifié de Spizizen (MMG). Les cellules 32a ont été ajustées à une DO<sub>600</sub> de 0,01 en

utilisant le milieu liquide MMG, puis mélangées avec 100 ng de l'ADN traité. Après une transformation de 24h à 37 °C, les cellules ont été étalées sur LB gélosé contenant de la kanamycine (50 µg/mL). Les transformants positifs ont été vérifiés par PCR en utilisant les amorces flanquantes de part et d'autre du gène.

### **II.2.2 Essais antibactériens des mutants de *B. velezensis* 32a et de GA1 contre les souches d'*A. tumefaciens***

L'effet de la production des polykétides et de la bacilysine chez les mutants 32a et GA1 ainsi que chez les souches sauvages a été évalué en mesurant le diamètre de l'activité antibactérienne. Pour ce faire, les surnageants de *B. velezensis* 32a ou GA1 et leurs mutants ont été préparés comme décrit précédemment dans la section (II-1-1). Les cultures de GA1 ont été diluées à la DO la plus faible, si nécessaire. Ensuite, les surnageants résultants ont été testés contre les souches d'*A. tumefaciens* pour évaluer leur activité antibactérienne, en utilisant la méthode de diffusion en puits et la méthode de détermination de la CMI. L'activité antibactérienne de la souche sauvage GA1 a été considérée comme présentant une inhibition de croissance de 100 %.

Les concentrations minimales inhibitrices des surnageants de GA1 et de ses mutants ont été déterminées en utilisant la méthode de microdilution en bouillon. Sur une plaque de 96 puits, des dilutions en série des surnageants ont été effectuées en utilisant du MHB et du milieu Landy liquide (v/v), débutant avec une dilution au 1/2 jusqu'à des dilutions en série au 1/16. Ensuite, l'inoculum bactérien d'*A. tumefaciens* a été ajouté à raison de 10<sup>8</sup> CFU/mL dans chaque puits, et les microplaques ont été incubées pendant 48 h à 30 °C. Les puits inoculés avec 100 µL de culture bactérienne (10<sup>8</sup> UFC /mL) ont servi comme témoin négatif, tandis que l'antibiotique kanamycine (150 µg/mL) a été utilisé comme témoin positif pour l'inhibition d'*A. tumefaciens*. Après incubation, les puits ont été examinés pour détecter la croissance de l'agent pathogène par la méthode colorimétrique. Cette dernière a été effectuée en ajoutant un volume stérile (25 µL) du réactif MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényl-tétrazolium) à une concentration de 0,5 mg/mL dans chaque puits, suivi d'une incubation de 30 min à 30 °C. Dans les cellules vivantes, l'activité déshydrogénase réduit le sel jaune de tétrazolium dans le MTT en cristaux violets de formazan. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la dilution la plus faible du surnageant requise pour inhiber visuellement la croissance bactérienne après incubation. Les expériences ont été répétées trois fois.

## II.3 Chapitre 3 : Purification des métabolites anti-*Agrobacterium* de *B. velezensis* et étude de leurs cytotoxicités sur des lignées cellulaires de type Vero

### II.3.1 Ultrafiltration membranaire pour une meilleure purification des composés anti-*A. tumefaciens* de *B. velezensis* 32a

Dans ce travail, la purification des composés actifs de 32a contre les souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6 a été réalisée en suivant des étapes d'ultrafiltration, de diafiltration et de fractionnement par HPLC préparative.

#### II.3.1.1 Préparation de l'échantillon

Comme décrit dans la section II-1-2-1, la souche 32a a été cultivée cette fois-ci dans deux litres du milieu de Landy à 30 °C avec agitation à 200 rpm pendant 72 h, le surnageant est ensuite récupéré par centrifugation à 12000 rpm pendant 30 min à 4 °C. Par la suite, le surnageant renfermant les molécules produites a été congelé pendant 24 h à -20 °C. Ensuite, le surnageant a été lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur Heto Power Dry PL 9000 (Jouan Nordic, Allerod, Danemark) et collecté sous forme de poudre. Cette méthode a été mise en œuvre dans le but d'optimiser la conservation du produit et de concentrer les molécules présentes dans le surnageant. La lyophilisation consiste à éliminer l'eau du surnageant par congélation suivi d'une sublimation sous vide de la glace. Cette méthode préserve bien les propriétés et la structure du produit thermosensible. Le produit de lyophilisation a été remis en suspension dans de l'eau déminéralisée (155 g/L), puis centrifugé pour éliminer les particules solides.

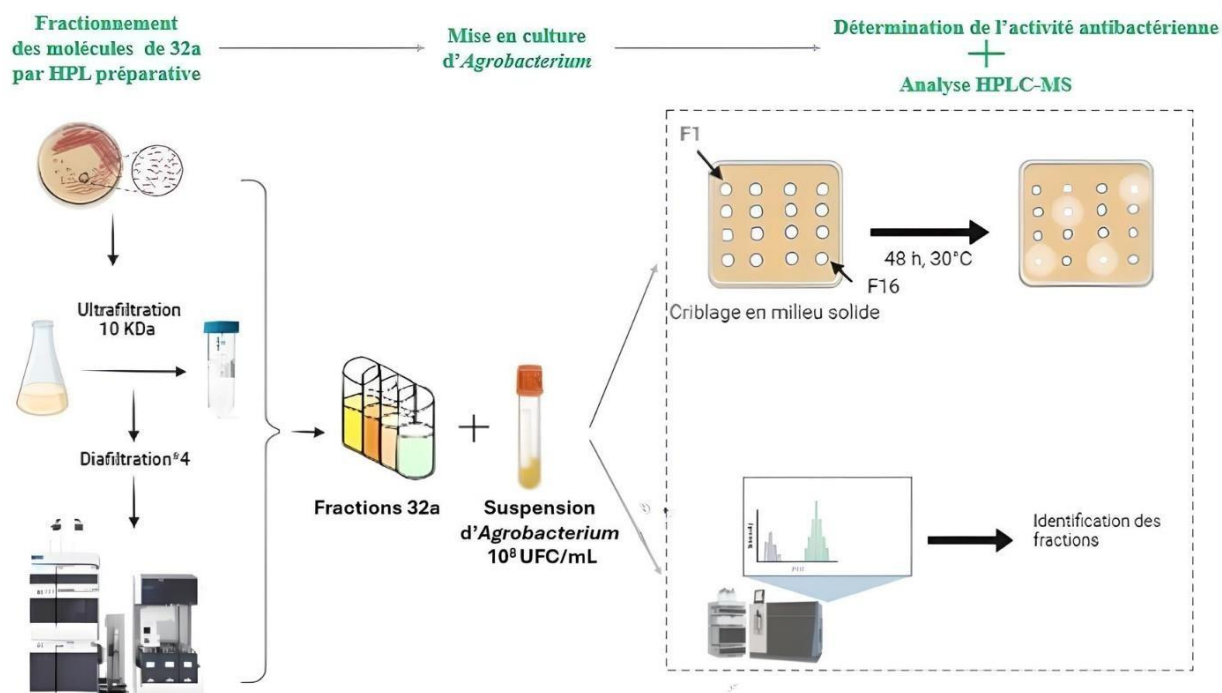
#### II.3.1.2 Purification des composés actifs de *B. velezensis* 32a

L'étape d'ultrafiltration consiste à filtrer le surnageant obtenu à l'aide de Vivaspin (20 mL) ayant un seuil de coupure de 10 kDa (Sartorius, Goettingen, Allemagne). Cette étape permet de piéger les lipopeptides dans la partie rétentat. Durant cette étape, le volume du rétentat a été ajusté à 1 mL pour les étapes de diafiltration ultérieures. Pour l'étape de diafiltration, un volume du surnageant côté rétentat a été complété avec 10 mL d'eau déminéralisée afin de faciliter le passage des petites molécules à travers la membrane. Cette étape a été réalisée quatre fois, en veillant à conserver un volume de 1 mL du volume total du surnageant côté rétentat à chaque étape. Puis, le filtrat obtenu a été fractionné par HPLC préparative (Agilent 1290 Infinity, Santa Clara, US) avec un débit de 2 mL/min et d'un gradient établi avec une phase mobile composée du solvant A (eau+0,1 % AF) et du solvant B

(Acétonitrile + 0,1 % AF). Le programme d'élution est comme suit : 0 à 10 min (98 % A et 2 % B), 10-15 min (95 % A et 5 % B), 15-35 min (70 % A et 30 % B), 35-55 min (40 % A et 60 % B), 55-80 min (0 % A et 100 % B), 80-95 min (98 % A et 2 % B). Tous les réactifs utilisés pour la purification, tels que l'eau, l'acétonitrile (ACN) et l'acide formique (AF), étaient de qualité HPLC et ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Le filtrat a été injecté sur une colonne C18 (150 × 100 mm, 5 µm, Interchim, Montluçon, France) *via* une boucle d'injection de 10 mL. Le fractionnement a été réalisé selon la formation des pics. Les fractions éluées ont été collectées et séchées au moyen d'un concentrateur sous vide (mivac, France) dont le programme a été réglé pour l'évaporation de solvant à 40 °C.

### II.3.2 Caractérisations biologique et biochimique des fractions

Les premières informations nécessaires pour caractériser les molécules purifiées ont été de déterminer leurs masses et l'activité biologique envers les espèces d'*A. tumefaciens*. Selon les solvants d'élution, les fractions obtenues ont été reprises soit dans de l'eau, soit dans du milieu MH (Mueller-Hinton) contenant 2,5 % de DMSO. Cela a permis de réaliser l'activité antibactérienne *via* un test d'inhibition de la croissance bactérienne en utilisant la méthode des puits, comme décrit précédemment (II-1-1). Ensuite, une analyse RP-HPLC-MS a été effectuée en utilisant une colonne C18 et un gradient comme décrit dans la section (II-1-2-2) pour déterminer les masses des composés purifiés dans les fractions actives (**Figure 36**).



**Figure 36:** Workflow pour l'évaluation antibactérienne des fractions et leurs analyses par RP-HPLC-MS

### II.3.3 Evaluation de la cytotoxicité des fractions actives

#### II.3.3.1 Culture des cellules

Dans le contexte de la production de biopesticides, les tests de cytotoxicité sont essentiels pour s'assurer que les produits finaux ne sont ni toxiques pour les cellules des plantes non-cibles mais aussi pour l'utilisateur, ce qui est crucial pour garantir la sécurité des biopesticides. La cytotoxicité des fractions actives a été évaluée sur les cellules de rein de singe vert africain Vero. L'utilisation de la lignée cellulaire Vero est recommandée par l'EFSA pour tester la toxicité des surnageants de *Bacillus*.

Les cellules Vero ont été cultivées en monocouche dans le milieu DMEM à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub> (Incubateur à CO<sub>2</sub>; Thermo Scientific, Marietta, OH, USA) (Moldovan et al., 2022). Les cellules ont été détachées avec une solution de Trypsine-EDTA (PanBiotech GmbH, Germany) pendant 5-10 min. La réaction enzymatique a été arrêtée par dilution avec du milieu de culture cellulaire.

### II.3.3.2 Essais de viabilité cellulaire par CCK-8

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à des densités de  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Après 6 jours de culture, les fractions actives ont été diluées dans du DMEM (à des concentrations croissantes allant de 3,9 à 500 µg/mL) et mises en contact avec les cellules pendant 24 h à 37 °C (incubateur à CO<sub>2</sub>) à raison de 100 µL par puits. Ensuite, le CCK-8 (Cell Counting Kit-8) a été ajouté à une concentration finale de 5 % pendant 90 min à 37 °C à l'obscurité. La concentration du CCK-8 réduit a été mesurée à une DO<sub>650</sub> à l'aide du spectrophotomètre (SpectraMax®iD3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) par rapport à des « blancs ou contre-essais » contenant tous les réactifs pour chaque condition, à l'exception des cellules. Le CCK-8 a été réduit au niveau intracellulaire pour donner un produit de couleur orange (formazan). La quantité de formazan générée est directement proportionnelle au nombre de cellules viables. Les résultats sont présentés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin. La viabilité cellulaire a été calculée par rapport au pourcentage de cellules vivantes dans le témoin en utilisant la formule suivante : % de viabilité cellulaire = Moyenne de la densité optique des cellules traitées/Moyenne de la densité optique des cellules témoins\*100. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type (SD) de trois expériences.

## II.4 Analyse statistique

Les données ont été évaluées au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA). Les différences significatives ont été relevées par le test de Tukey pour déterminer les différences significatives ( $p < 0,05$ ). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 9.0.1.

## *Résultats et Discussion*



# *Chapitre 1*

*Caractérisation des métabolites secondaires  
de *B. velezensis* 32a et évaluation du pouvoir  
antagoniste des lipopeptides purs contre  
*A. tumefaciens**



## Introduction

Les bactéries du genre *Bacillus* ont la capacité de former des endospores résistantes aux conditions environnementales défavorables, favorisant ainsi leur distribution ubiquitaire dans diverses niches écologiques. Parmi ces bactéries, *B. velezensis* émerge comme un modèle associé aux plantes, démontrant un fort potentiel en tant qu'agent de lutte biologique pour réduire les maladies provoquées par les phytopathogènes. Cette espèce est particulièrement adaptée à une utilisation en agriculture en raison de sa richesse en clusters de gènes biosynthétiques responsables de la synthèse de métabolites secondaires bioactifs, représentant jusqu'à 10 % de son génome (Fazle Rabbee & Baek, 2020). En effet, plusieurs travaux ont été menés afin d'identifier et de caractériser le potentiel des souches de *B. velezensis* dans le contrôle des maladies végétales (Rabbee et al., 2019). Dans une étude précédente, la souche 32a de *B. velezensis* a été isolée et identifiée comme étant une souche de biocontrôle efficace contre les souches phytopathogènes d'*A. tumefaciens* C58 et B6 (Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017). Les métabolites présents dans le surnageant de la souche 32a ont présenté une forte activité bactéricide contre les souches d'*A. tumefaciens* et ont inhibé la formation de tumeurs suggérant que l'application de ces métabolites peut représenter un outil de lutte biologique contre la maladie de la galle du collet. Par la suite, l'objectif de ce travail de thèse consiste à comprendre l'implication spécifique des métabolites synthétisés par la souche 32a dans le contrôle de la maladie de la galle du collet. Pour ce faire, différentes stratégies mêlant des approches de biochimie analytique et de biologie moléculaire ont été entreprises, débutant dans ce premier chapitre par le décryptage de son contenu en métabolites secondaires à l'aide d'une analyse par RP-HPLC-MS couplée à la spectrométrie de masse. Ensuite, l'objectif a été d'évaluer spécifiquement l'implication des lipopeptides purs dans l'antagonisme vis-à-vis des souches d'*A. tumefaciens*.

### I. Effet du surnageant de *B. velezensis* 32a sur l'inhibition des souches d'*A. tumefaciens*

En se basant sur la méthode de diffusion en puits, le surnageant de la souche 32a a montré une forte activité inhibitrice contre les souches phytopathogènes d'*A. tumefaciens* C58 et B6 (Figure 37), où la zone d'inhibition était de 30 et 28 mm, respectivement. L'activité antibactérienne la plus marquée a été observée contre *A. tumefaciens* C58.

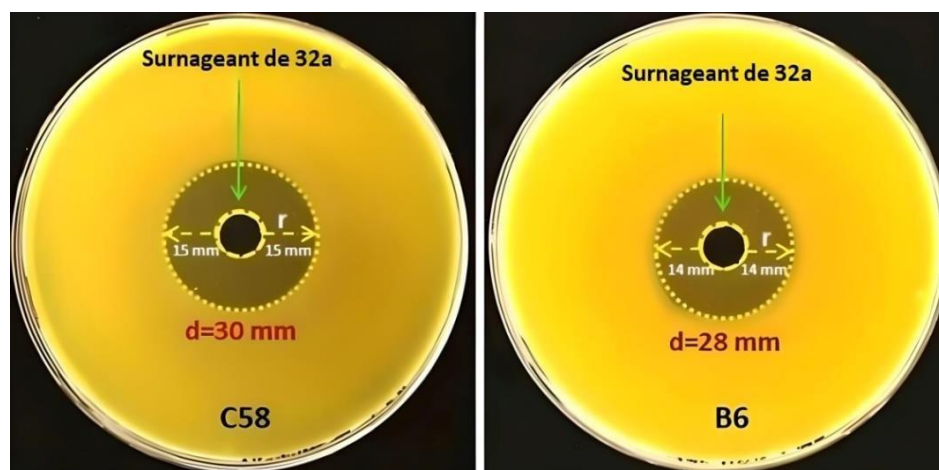


Figure 37: Activité antibactérienne du surnageant de 32a contre les souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6 ; r : rayon, d : diamètre.

## II. Identification des lipopeptides, des polykétides et de la bacilysine par analyse RP-HPLC-MS

Dans le but de décrypter son contenu en métabolites secondaires, une analyse biochimique par RP-HPLC-MS avec une plage de masse ( $m/z$ ) allant de 200 à 1250 a été effectuée à partir du surnageant de 32a d'une culture de 72 h en milieu Landy. En utilisant les données en masse des métabolites connus de *B. subtilis* et selon l'analyse des standards de lipopeptides purifiés, différents composés ont été identifiés. En effet, les trois familles bien connues de lipopeptides cycliques (surfactines, fengycines et iturines), les trois types différents de polykétides (macrolactines, oxydifficidine et bacillaènes), la bacilysine et son dérivé chloré la chlorotétaine ont été observés. Les principaux résultats sont résumés dans le [tableau 14](#).

D'après les analyses de masses, la souche synthétise différentes isoformes de surfactine, d'iturine et de fengycine ([Annexe 1](#)). Les signaux ioniques à  $m/z$  1016,89, 1030,37, 1044,60 et 1058,24, présentant une différence d'intervalle de 14 Da, peuvent être associés aux ions  $[M+Na]^+$  des surfactines. Ces dernières sont caractérisées par la présence de chaînes d'acides gras  $\beta$ -hydroxylé en C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub> et C<sub>15</sub>, respectivement. Il est également possible que ces masses correspondent aux isoformes C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> et C<sub>16</sub> de la surfactine A, caractérisées par la présence d'une valine en position 7 ([Vater et al., 2002](#)), étant donné que la spectrométrie de masse seule ne permet pas d'identifier la séquence d'acides aminés du fragment peptidique. L'ion protoné  $[M+H]^+$  de la surfactine, ainsi que les adduits potassiques correspondants  $[M+K]^+$ , ont été observés.

Le deuxième groupe de signaux de masse détectés pourrait être assigné aux lipopeptides cycliques de la bacillomycine D, présentant des signaux faibles pour C<sub>16</sub> à m/z [M+H]<sup>+</sup> 1059,94, m/z [M+Na]<sup>+</sup> 1081,33 et m/z [M+K]<sup>+</sup> 1097,05.

En outre, les profils m/z sous forme protonée [M+H]<sup>+</sup> à m/z 1043,88, 1057,78, 1071,79 et 1085,72 étaient en concordance avec les masses connues des homologues de l'iturine A ou de la mycosubtiline, présentant des chaînes acyles de C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>17</sub>, respectivement.

De même, l'analyse RP-HPLC-MS a contribué à l'identification des signaux ioniques à m/z 718,66, 725,60, 746,67 et 739,70 en tant que formes protonées doublement chargées [M+2H]<sup>2+</sup> de la fengycine A C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> et C<sub>18</sub>, ou de la fengycine B C<sub>16</sub> et de la fengycine B C<sub>15</sub> avec des adduits à l'hydrogène, respectivement (**Dussert et al., 2022**).

De plus, les signaux ioniques à m/z [M+H]<sup>+</sup> 883,34, m/z [M+Na]<sup>+</sup> 905,22 et m/z [M+K]<sup>+</sup> 921,15 suggèrent que *B. velezensis* 32a pourrait être capable de produire la bacillibactine.

Une investigation approfondie a mis en évidence la présence de signaux dans la plage m/z de 425,30 à 703,28, illustrant ainsi la capacité de la souche 32a à produire des polykétides antimicrobiens. Des signaux intenses à m/z [M+Na]<sup>+</sup> 425,30 et m/z [M+K]<sup>+</sup> 441,27 indiquaient une masse moléculaire de 402,53 Da, en accord avec celle de la macrolactine A. De plus, des signaux ioniques à m/z 687,28, 511,20 et 525,22 ont été attribués à la forme sodique de la macrolactine D, 7-O-malonyl macrolactine A et 7-O-succinyl macrolactine A, respectivement. Des signaux correspondants aux antibiotiques polyènes de bacillaènes à m/z 583,5 et 581,36 ont été identifiés comme étant la bacillaène B et la bacillaène A, respectivement (**Chen et al., 2006**). De plus, l'oxydifficidine, correspondant à la forme oxydée de la difficidine (m/z 560,70), a été repérée avec son ion sodique (m/z 583,25) et potassique (m/z 599,23).

En plus des lipopeptides et des polykétides, l'analyse RP-HPLC-MS du surnageant de 32a a révélé des signaux marqués à m/z 271,11 ([M+H]<sup>+</sup>) et 309,03 ([M+K]<sup>+</sup>), suggérant la présence d'un dipeptide antibiotique; la bacilysine. Également, un ensemble isotopique présentant deux signaux isotopiques distincts à m/z 289,29 et 291,33, correspondants aux principaux isotopes du chlore, ont suggéré la détection de la chlorotétaine, un dérivé chloré de la bacilysine qui a été élué simultanément avec la bacilysine à 4,07 min.

**Tableau 14:** Composés antimicrobiens de *B. velezensis* 32a détectés par RP-HPLC-MS et leurs masses respectives

| Composé        | Composé théorique (m/z)   | Rapport masse/ charge observé (m/z) | Différence entre le rapport masse/charge théorique et observé (m/z) | Assignment   | Temps de rétention (min) | Référence                |
|----------------|---------------------------|-------------------------------------|---|--|--------------------------|--------------------------|
| Surfactine     | 994,64; 1016,62; 1032,73  | 994,36; 1016,89; 1032,68            | 0,28; 0,27; 0,05  | C <sub>12</sub> -Surfactine [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>  | 38,49                    | (Shahid et al., 2021)    |
|                | 1008,66; 1030,64; 1046,75 | 1008,51; 1030,37; 1046,47           | 0,15; 0,27; 0,28  | C <sub>13</sub> -Surfactine [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>  | 39,56                    | (Shahid et al., 2021)    |
|                | 1022,67; 1044,65; 1060,76 | 1022,45; 1044,60; 1060,16           | 0,22; 0,05; 0,47  | C <sub>14</sub> -Surfactine [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>  | 41,17                    | (Shahid et al., 2021)    |
|                | 1036,69; 1058,67          | 1036,44; 1058,24                    | 0,25; 0,43  | C <sub>15</sub> -Surfactine [[M]+H, +Na] <sup>+</sup>  | 42,13                    | (Shahid et al., 2021)    |
| Iturine        | 1043,55; 1065,53; 1081,50 | 1043,88; 1065,76; 1081,65           | 0,33; 0,23; 0,15  | C <sub>14</sub> - Iturine A/ mycosubtiline [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 22,70                    | (Ongena & Jacques, 2008) |
|                | 1057,56; 1079,54; 1095,52 | 1057,78; 1079,78; 1095,65           | 0,22; 0,24; 0,13  | C <sub>15</sub> - Iturine A/ mycosubtiline [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 23,66                    | (Ongena & Jacques, 2008) |
|                | 1071,58; 1093,56; 1109,53 | 1071,79; 1093,64; 1109,69           | 0,21; 0,08; 0,16  | C <sub>16</sub> - Iturine A/ mycosubtiline [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 24,84                    | (Ongena & Jacques, 2008) |
|                | 1085,59; 1107,58; 1123,55 | 1085,72; 1107,68; 1123,66           | 0,13; 0,1; 0,11   | C <sub>17</sub> - Iturine A/ mycosubtiline [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 25,94                    | (Ongena & Jacques, 2008) |
| Fengycine      | 718,38; 740,37; 756,47    | 718,66; 740,43; 756,97              | 0,28; 0,06; 0,5   | C <sub>15</sub> -Fengycine A [[M]+H, +Na, +K] <sup>2+</sup>  | 23,35                    | (Koumoutsi et al., 2004) |
|                | 725,39; 747,37; 763,35    | 725,60; 747,57; 763,39              | 0,21; 0,2; 0,04   | C <sub>16</sub> -Fengycine A [[M]+H, +Na, +K] <sup>2+</sup>  | 23,95                    | (Koumoutsi et al., 2004) |
|                | 739,41; 761,39; 777,36    | 739,70; 761,11; 777,07              | 0,29; 0,28; 0,29  | C <sub>15</sub> -Fengycine B [[M]+H, +Na, +K] <sup>2+</sup>  | 25,43                    | (Koumoutsi et al., 2004) |
|                | 746,42; 768,40; 784,37    | 746,67; 768,74                      | 0,25; 0,34  | C <sub>18</sub> -Fengycine A [[M]+H, +Na] <sup>2+</sup><br>ou<br>C <sub>16</sub> -Fengycine B [[M]+H, +Na] <sup>2+</sup> | 26,55                    | (Koumoutsi et al., 2004) |
| Bacillibactine | 883,26; 905,24; 921,35    | 883,34; 905,22; 921,15              | 0,08; 0,02; 0,2   | Bacillibactine [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 19,94                    | (Shahid et al., 2021)    |

|               |                        |                        |                  |  |       |                          |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------|--|-------|--------------------------|
| Macrolactines | 425,48; 441,59         | 425,30; 441,27         | 0,18; 0,32       | Macrolactine A $[[M]+Na, +K]^+$              | 38,04 | (Schneider et al., 2007) |
|               | 687,68; 703,79         | 687,28; 703,28         | 0,4; 0,51        | Macrolactine D $[[M]+Na, +K]^+$              | 23,09 | (Arbsuwan et al., 2018)  |
|               | 511,58; 527,69         | 511,20; 527,17         | 0,38; 0,52       | 7-O-malonyl-macrolactine A $[[M]+Na, +K]^+$  | 27,07 | (Schneider et al., 2007) |
|               | 525,58; 541,69         | 525,22; 541,17         | 0,36; 0,52       | 7-O-succinyl-macrolactine A $[[M]+Na, +K]^+$ | 27,17 | (Schneider et al., 2007) |
| Bacillaènes   | 581,35; 603,33; 619,44 | 581,36; 603,38; 619,33 | 0,01; 0,05; 0,11 | Bacillaène A $[[M]+H, +Na, +K]^+$            | 28,15 | (Chen et al., 2006)      |
|               | 583,5; 605,48; 621,59  | 583,41; 605,39; 621,34 | 0,09; 0,09; 0,25 | Bacillaène B $[[M]+H, +Na, +K]^+$            | 28,48 | (Chen et al., 2006)      |
| Difficidine   | 583,68; 599,79         | 583,25; 599,23         | 0,43; 0,56       | Oxydifficidine $[[M]+Na, +K]^+$              | 33,87 | (Chen et al., 2006)      |
| Bacilysine    | 271,28; 309,37         | 271,11; 309,03         | 0,17; 0,34       | Bacilysine $[[M]+H, +K]^+$                   | 4,07  | (Phister et al., 2004)   |
|               | 289,73; 327,82         | 289,26; 327,25         | 0,47; 0,57       | Chlorotétaine $[[M]+H, +K]^+$                | 4,07  | (Phister et al., 2004)   |

### III. Identification de la synthèse de l'iturine A par *B. velezensis* 32a via spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Pour déterminer la séquence peptidique primaire du lipopeptide iturinique produit par *B. velezensis* 32a, une analyse par RP-HPLC-MS/MS a été effectuée sur le surnageant préparé et filtré, comme décrit dans la section II-1-1, ainsi que sur la solution standard d'iturine A et de mycosubtiline. Ensuite, les spectres de masse de fragmentation ont été comparés.

Comme illustré dans la **figure 38A**, quatre formes prédominantes ( $C_{14}$ ,  $C_{15}$ ,  $C_{16}$  et  $C_{17}$ ) ont été identifiées. En particulier, le spectre de 32a chevauche avec celui de l'iturine A, en partageant trois formes identiques ( $C_{14}$ ,  $C_{15}$  et  $C_{16}$ ). Pour confirmer cette hypothèse, la forme commune  $C_{16}$  ( $m/z$  1071,60) des trois échantillons a été soumise à une fragmentation basée sur le CID. La **figure 38B** et **C** présente une série d'ions b et y, indiquant l'ouverture initiale des cycles peptidiques dans l'iturine A et la mycosubtiline, à la fois entre la chaîne d'acides gras (FA: fatty acid) et l'asparagine (**Figure 38B**), ainsi qu'entre la liaison proline et glutamine (**Figure 38C**). À première vue, les spectres MS/MS des trois échantillons présentent des ions similaires, étant donné que la mycosubtiline est structurellement identique à l'iturine A. Sur la **figure 38B**, le spectre MS/MS de l'iturine A a montré les ions fragments y ( $-H_2O$ ) à  $m/z$  dans l'ordre 254,30 ( $y_1$ ), **341,30** ( $y_2$ ), 455,32 ( $y_3$ ), 552,43 ( $y_4$ ), 680,43 ( $y_5$ ), 794,41 ( $y_6$ ) et 957,54 ( $y_7$ ) de l'extrémité C-terminale. Selon ces fragments CID typiques, la séquence pourrait être déduite comme Ser-Asn-Pro-Gln-Asn-Tyr-Asn. Cependant, le spectre MS/MS de la mycosubtiline  $C_{16}$  montre un schéma de fragmentation à partir de l'extrémité C-terminale comme suit : 254,30 ( $y_1$ ), **368,30** ( $y_2$ ), 455,32 ( $y_3$ ), 552,43 ( $y_4$ ), 680,43 ( $y_5$ ), 794,41 ( $y_6$ ) et 957,54 ( $y_7$ ), correspondant à la séquence peptidique Asn-Ser-Pro-Gln-Asn-Tyr-Asn. En comparant les deux spectres de fragmentation, seul l'ion  $y_2$  permet la différenciation de l'iturine A et de la mycosubtiline.

Dans le cas d'un clivage proline-glutamine dans la chaîne peptidique de l'iturine A (**Figure 38C**), les ions protonés des séries y et b ( $-H_2O$ ) à  $m/z$  974,53 ( $y_7$ ), **860,52** ( $y_6$ ), 773,54 ( $y_5$ ), 552,42 ( $b_4$ ), 666,10 ( $b_5$ ), 829,54 ( $b_6$ ) et 943,50 ( $b_7$ ) ont été visualisés, suggérant que l'ion précurseur ( $C_{16}$ ) possède une séquence de Pro-Asn-Ser-FA-Asn-Tyr-Asn-Gln. De même, le spectre MS/MS de la mycosubtiline montre les mêmes ions y et b à l'exception des ions  $y_6$  ( $m/z$  887,00) : 974,53 ( $y_7$ ), **887,0** ( $y_6$ ), 773,54 ( $y_5$ ), 552,42 ( $b_4$ ), 666,10 ( $b_5$ ), 829,54 ( $b_6$ ) et 943,50 ( $b_7$ ).

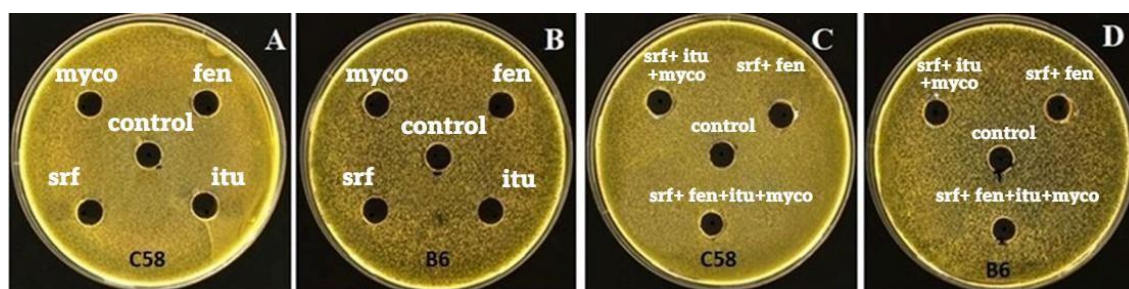
Ces résultats indiquent que l'analyse ESI-MS/MS du lipopeptide iturinique dans la 32a révèle une séquence peptidique étroitement similaire à celle de l'iturine A et de la mycosubtiline, avec une seule différence observée dans les ions y2 (**Figure 38B**) et y6 (**Figure 38C**). De plus, les ions y2 et y6, avec des masses correspondantes de 341,30 et 860,52 ont été spécifiquement appariés dans le spectre ESI-MS/MS de 32a et de l'iturine A. Par conséquent, en comparant les analyses MS/MS des standards d'iturine A et de mycosubtiline avec celles de *B. velezensis* 32a, les résultats obtenus montrent clairement que le lipopeptide iturinique produit par cette souche présente un alignement plus fort avec l'iturine A.



ions précurseurs  $[M+H]^+$  à  $m/z$  1071,58 zoomés entre  $m/z$  10-1120 et 10-1030. (B) et (C): Structure schématique de l'iturine A et de la mycosubtiline avec les fragments ioniques de type b et de type y visualisés dans le spectre MS/MS correspondant à différentes positions de clivage au cours de la fragmentation. Les spectres MS/MS zoomés entre  $m/z$  840-900 mettent en évidence les ions b6 et y6.

#### IV. Activité antibactérienne des lipopeptides purs contre *A. tumefaciens*

Afin de tester l'effet inhibiteur des lipopeptides purs sur les souches d'*A. tumefaciens*, des molécules pures de surfactine A (S), iturine A (I), mycosubtiline (M) et fengycine (F) et des mélanges de celles-ci ont été étudiés. La concentration de 2,5 % de DMSO a été choisie en évaluant la tolérance des souches d'*A. tumefaciens* en milieu liquide au DMSO à différentes concentrations de 1 à 10 %. En effet, la concentration à 2,5 % de DMSO a été sélectionnée comme la plus faible concentration inhibitrice capable de supprimer la croissance d'*A. tumefaciens*. En effet, en se basant sur la méthode de diffusion à partir d'un puits, l'évaluation qualitative du pouvoir antagoniste des lipopeptides purs a montré que ces composés seuls ou en synergie à 100 mg/L n'ont pas d'effet sur les souches d'*A. tumefaciens* (Figure 39).

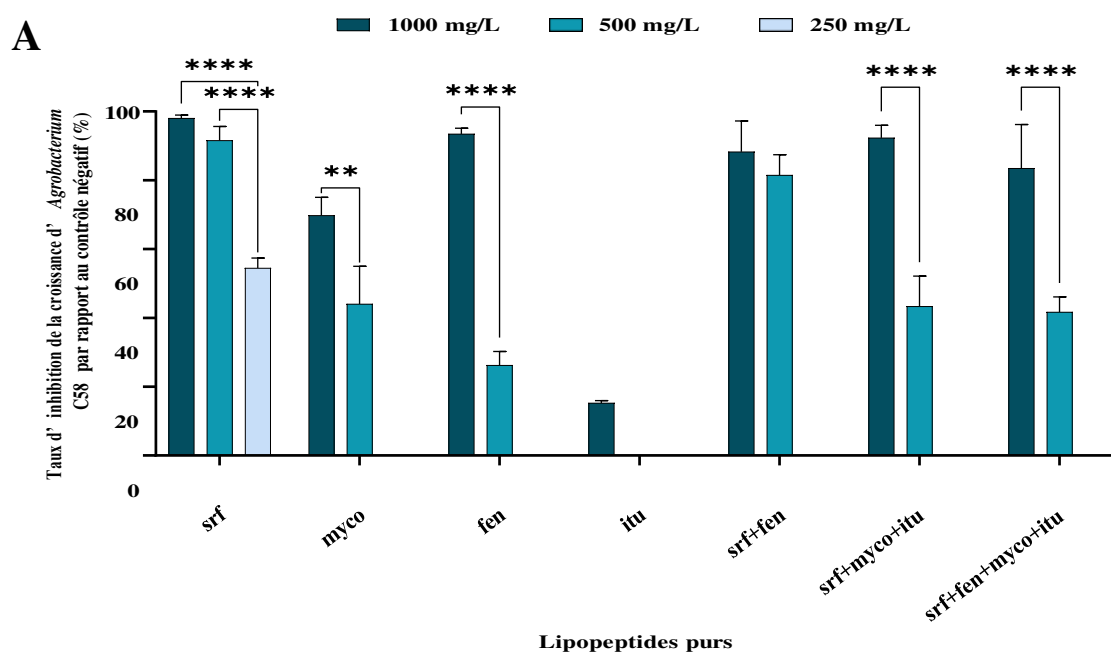


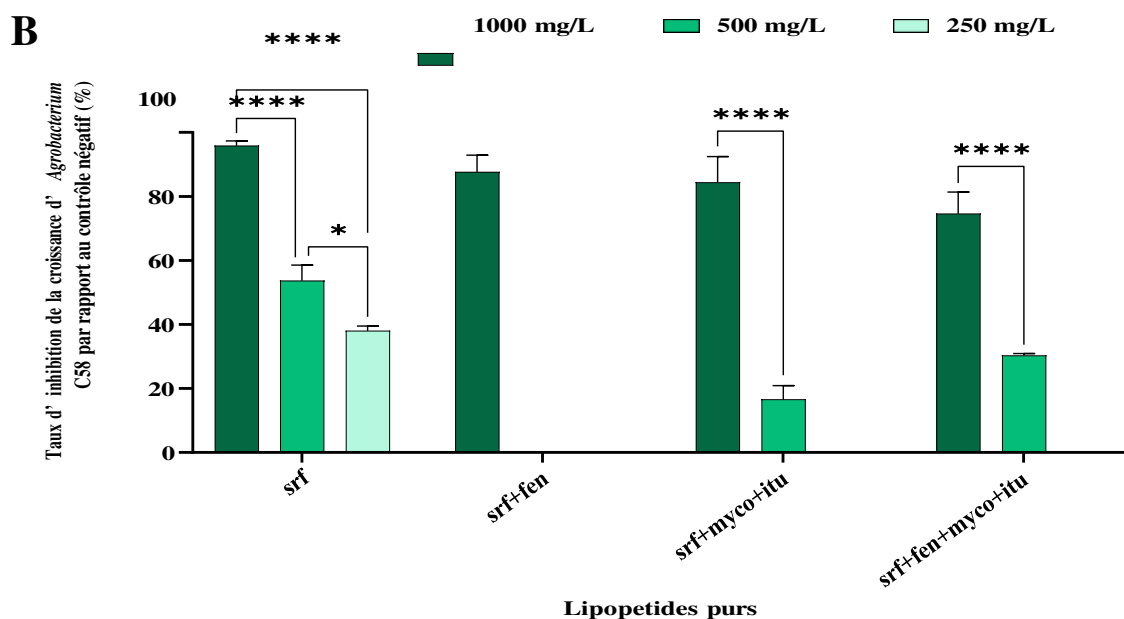
**Figure 39:** Evaluation de l'activité antagoniste des lipopeptides purs (A et B) et de la synergie (C et D) à 100 mg/L contre *A. tumefaciens* C58 et B6

Par ailleurs, l'évaluation quantitative a montré que les lipopeptides n'étaient efficaces qu'à la concentration relativement élevée de 1000 mg/L (Figure 40). La fengycine (fen) seule n'a pas pu inhiber la croissance de la souche B6 au dessous de 500 mg/L. Lorsque la surfactine (srf) a été combinée à la fengycine, un fort taux d'inhibition de la croissance a été observé à des concentrations de 500 et 1000 mg/L, entraînant inhibition de la croissance de 81 % et 97 %, respectivement. Étant donné que la fengycine seule n'a montré aucun effet antibactérien en dessous de 1000 mg/L, il est suggéré que la surfactine était la principale responsable de l'activité du mélange srf/fen. Par rapport à C58, *A. tumefaciens* B6 a montré une plus grande résistance aux lipopeptides, illustrée par l'absence de l'inhibition de la croissance lors des traitements par

la mycosubtiline (myco), la fengycine et l'iturine (itu). De plus, les taux d'inhibition de la croissance induits par la surfactine, la combinaison srf/fen, srf/myco/itu, et srf/fen/ myco/itu étaient tous inférieurs à ceux observés avec C58 (Figure 40).

Dans l'ensemble, ces résultats ont révélé une faible activité antagoniste des lipopeptides purs contre les souches pathogènes d'*A. tumefaciens*. L'activité antibactérienne la plus élevée pourrait être attribuée à la surfactine purifiée et à sa combinaison avec myco/itu, améliorant de manière synergique leurs propres activités.





**Figure 40:** Analyse du taux d'inhibition de la croissance d'*A. tumefaciens* C58 (A) et B6 (B) sous différentes concentrations de lipopeptides commercialisés et leurs synergies. L'analyse statistique des données a été réalisée avec trois répétitions. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type.

Une ANOVA bidirectionnelle avec le test post hoc de Tukey a été utilisée pour déterminer la signification avec  $*p < 0,05$ ,  $**** p < 0,0001$ . L'absence d'astérisques indique que les valeurs de  $p$  supérieures à 0,05 ont été considérées comme non significatives. srf: surfactine, myco: mycosubtiline, fen: fengycine, itu: iturine

## V. Discussion

Dans le cadre du premier chapitre, l'objectif était d'explorer le potentiel des métabolites de la souche 32a de *B. velezensis* à l'aide d'une approche de biochimie analytique en utilisant la RP-HPLC-MS. Par la suite, une évaluation de l'activité antibactérienne des lipopeptides purs et de leurs synergies a été réalisée, dans le but d'examiner de manière spécifique l'implication de ces composés dans le processus de l'antagonisme contre *A. tumefaciens*.

En combinant les techniques de chromatographie (HPLC) et de spectrométrie de masse à haute résolution (HR-MS), l'analyse du surnageant de la souche 32a a mis en évidence la présence de neuf composés distincts. Ces composés ont été identifiés comme étant les surfactines, les fengycines, l'iturine A, ainsi que la bacillibactine, tous étant des lipopeptides. De plus, trois types différents de polykétides ont été identifiés, à savoir les macrolactines, les bacillaènes et l'oxydifficidine. La bacilysine et son dérivé chloré, la chlorotétaine, ont également été observées dans l'échantillon.

La souche 32a de *B. velezensis* produit diverses isoformes de lipopeptides cycliques, incluant la surfactine (C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub> et C<sub>15</sub>), la fengycine (A: C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>18</sub> ou B: C<sub>16</sub> et B : C<sub>15</sub>), ainsi que des composés de la famille des iturines : iturine A/mycosubtiline et/ou la bacillomycine D (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>17</sub>) (**Tableau 14**). Toutefois, en utilisant la RP-HPLC-MS, la masse molaire seule ne nous a pas permis d'identifier avec précision le composé iturinique produit par la 32a, étant donné que la mycosubtiline est structurellement identique à l'iturine. En effet, les acides aminés de la mycosubtiline aux positions 6 et 7 sont D-Ser et L-Asn tandis que dans l'iturine A, ces acides aminés sont inversés (D-Asn→L-Ser) (**Béchet et al., 2013**). Par conséquent, une spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a été réalisée, et les résultats obtenus ont confirmé que le lipopeptide iturinique présent dans le surnageant de 32a était de l'iturine A. Ceci démontre également que les signaux faibles de LC-MS préalablement assignés à de la bacillomycine D correspondent à l'iturine A sous sa forme potassique. Ces résultats sont en concordance avec une étude précédente indiquant que, lors de la culture de la souche 32a dans un milieu optimisé (MO), elle présentait la production de différentes variantes de surfactines (C<sub>12</sub> à C<sub>16</sub>), d'iturines (C<sub>14</sub> à C<sub>16</sub>) et de fengycines (Fengycines A: C<sub>14</sub> à C<sub>17</sub> et fengycines B: C<sub>15</sub> à C<sub>17</sub>) (**Ben Abdallah et al., 2015**).

En plus des lipopeptides, trois polykétides, à savoir la difficidine, les macrolactines et les bacillaènes, ont été détectés dans le surnageant de la souche 32a. L'analyse par RP-HPLC-MS a révélé que la souche 32a était capable de produire quatre formes de macrolactine (macrolactine A, macrolactine D, 7-O-malonyl-macrolactine A, 7-O-succinyl-macrolactine A), deux formes de bacillaène (A et B), ainsi que la bacilylsine et son dérivé chloré. Des études antérieures ont également signalé la présence de divers types de polykétides chez *B. velezensis*, présentant une activité antimicrobienne contre *R. solanacearum* et *F. oxysporum* (**Cao et al., 2018**). Cette diversité de polykétides dans la souche 32a est cohérente avec ces résultats. Il est intéressant d'indiquer que seules deux souches, à savoir *B. subtilis* BGSC 1E2 (**Rapp et al., 1988**) et la souche CS93 de *Bacillus* sp., se sont avérées capables de produire à la fois de la bacilylsine et de la chlorotétaine (**Phister et al., 2004**). Par conséquent, à notre connaissance, la souche 32a pourrait être répertoriée parmi les souches de *Bacillus* les plus rares qui coproduisent à la fois la bacilylsine et la chlorotétaine.

Afin de déterminer quels métabolites spécifiques produits par la souche 32a jouent un rôle dans l'activité antagoniste, des tests ont été effectués en utilisant trois familles de lipopeptides purs de *B. subtilis* ainsi que différents mélanges de ces composés contre des

souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6. Nos résultats ont montré que les lipopeptides n'étaient efficaces qu'à la concentration relativement élevée de 1000 mg/L, ce qui ne qualifie pas cette activité comme antibactérienne, mais plutôt comme un effet surfactant/détergent sur les membranes bactériennes. Ces résultats ont mis en évidence la faible activité antagoniste des lipopeptides purs contre les souches pathogènes d'*A. tumefaciens*. Les lipopeptides produits par *Bacillus* spp. sont principalement reconnus pour leur activité antifongique contre les phytopathogènes, notamment les iturines et les fengycines (Desmyttere et al., 2019; Platel et al., 2021; Leconte et al., 2022). Il convient néanmoins de noter que la surfactine est très active mais principalement contre *Legionella* (Vassaux et al., 2021). Dans notre situation, la faible activité antibactérienne pourrait être attribuée à la surfactine pure et à sa combinaison avec la fengycine et l'iturine A. De plus, il a été signalé que la surfactine présente une action synergique significative lorsqu'elle est combinée avec l'iturine A (Maget-Dana et al., 1992) et la fengycine contre les *P. infestans* (Wang et al., 2020) ainsi que *V. inaequalis* (Desmyttere et al., 2019; Leconte et al., 2022).

## VI. Conclusion

Le premier volet de cette étude s'est focalisé sur la caractérisation biochimique des métabolites produits par la souche 32a de *B. velezensis*, démontrant un large éventail d'activités, en vue d'une éventuelle application en tant qu'agent de biocontrôle. L'analyse du surnageant de la souche 32a par RP-HPLC-MS a mis en évidence la présence de neuf composés distincts. Ces composés ont été identifiés comme étant les surfactines (C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub> et C<sub>15</sub>), les fengycines (A: C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>18</sub> ou B: C<sub>16</sub> et B : C<sub>15</sub>), l'iturine A (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>17</sub>), ainsi que la bacillibactine, tous faisant partie du groupe des lipopeptides. De plus, trois types différents de polykétides ont été identifiés, à savoir les macrolactines (macrolactine A, macrolactine D, 7-O-malonyl-macrolactine A, 7-O-succinyl-macrolactine A), les bacillaènes (A et B) et l'oxydifficidine. La bacilysine et son dérivé chloré, la chlorotétaine, ont également été observées dans l'échantillon. L'analyse qualitative et quantitative de l'activité spécifique des lipopeptides purs et de divers mélanges de ces composés contre les souches d'*A. tumefaciens* a révélé leur faible impact dans le processus antibactérien. La faible activité antibactérienne pourrait être associée à la surfactine pure et à sa combinaison avec la fengycine et l'iturine A.



# *Chapitre 2*

*Etude de l'implication des polykétides et de la bacilysine dans l'antagonisme contre*

*A. tumefaciens via l'utilisation de mutants de B. velezensis 32a et GA1*



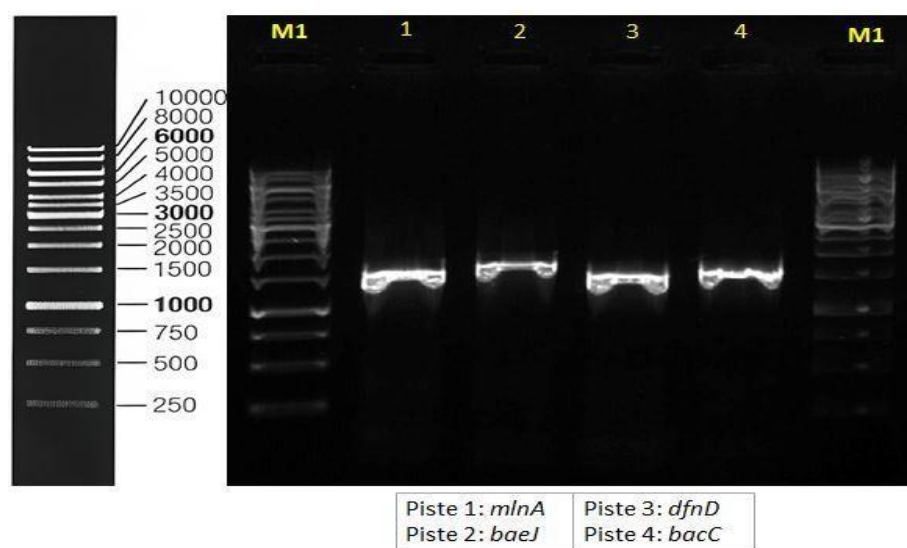
## Introduction

Les souches de *B. velezensis*, auparavant identifiées en tant que *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (Dunlap et al., 2016), suscitent un intérêt croissant dans le secteur agricole en raison de leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle et de biofertilisants (Luo et al., 2022; Rabbee et al., 2023). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces stratégies, la manipulation génétique s'avère être un outil essentiel pour optimiser leurs performances dans des applications industrielles et agricoles spécifiques. Par exemple, la modification de leurs caractéristiques métaboliques pourrait permettre une production accrue de composés d'intérêt, renforçant ainsi leur efficacité en tant qu'agents de lutte biologique ou biopesticides. Des études ont montré que la compréhension de l'implication des molécules dans le phénomène de la lutte biologique est démontrée grâce à l'utilisation des molécules purifiées (Wu et al., 2015b; Leconte et al., 2022) ou à l'utilisation de mutants (Gu et al., 2017).

En se basant sur le premier chapitre, l'évaluation de l'activité antibactérienne des lipopeptides purs contre deux souches d'*A. tumefaciens* montre que ces molécules n'étaient efficaces qu'à des concentrations relativement élevées. Les résultats obtenus indiquent un pouvoir inhibiteur limité de ces molécules sur les souches d'*A. tumefaciens*. Ces observations suggèrent davantage l'implication d'autres composés antibactériens coproduits avec les lipopeptides, tels que les polykétides, la bacilysine ou d'autres molécules. Pour cela, afin d'étudier le processus par lequel *B. velezensis* 32a inhibe la croissance d'*A. tumefaciens*, des souches mutantes de trois polykétides (macrolactines (Bvm), bacillaène (Bvbe), difficidine (Bvd) et de la bacilysine (Bvbc)) ont été construites en interrompant les gènes ciblés par l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine. Ensuite, pour approfondir l'analyse de l'interaction entre ces composés, les mutants de 32a ont été comparés avec 17 mutants issus d'une souche similaire de *B. velezensis* GA1, fournie par l'unité de BioEcoAgro en Belgique.

## I. Amplification par PCR des gènes codant pour la biosynthèse des polykétides et de bacilysine

Des analyses moléculaires par PCR ont été effectuées pour la recherche des gènes PKS impliqués dans la biosynthèse des polykétides et de la bacilysine chez la souche de *B. velezensis* 32a. Quatre couples d'amorces ont été utilisés. Les paires d'amorces de *mlnA* (F-R), *baeJ* (F-R) et *dfnD* (F-R), génèrent des tailles de 1576, 1702 et 1570 pb qui correspondent à des gènes codant les synthétases de macrolactine, de bacillaène et de la difficidine, respectivement. En ce qui concerne la bacilysine, *bacC* (F-R) génère un fragment d'environ 1585 pb, impliqué dans la synthèse de ce dipeptide antibactérien. La **figure 41** présente l'ensemble des fragments PCR obtenus à partir de l'ADN génomique de la souche 32a en utilisant les quatre couples d'amorces cités ci-dessus. Des amplicons de tailles attendues ont été obtenus avec tous les couples d'amorces testés.

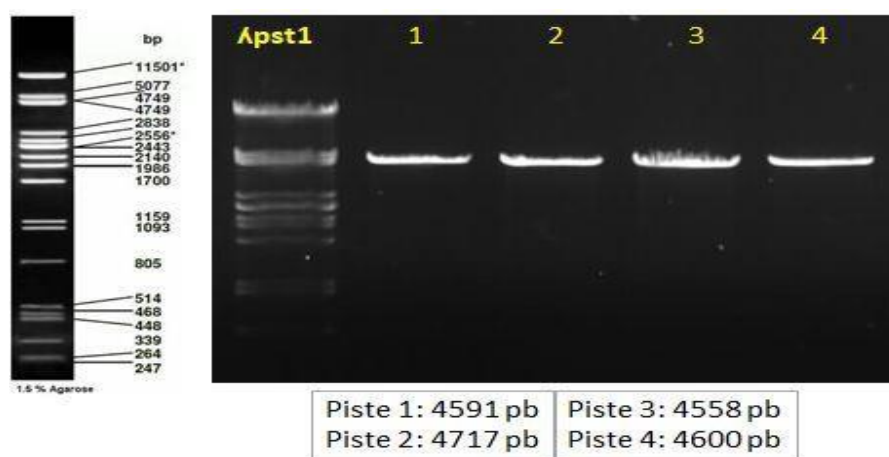


**Figure 41:** Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments amplifiés par PCR des gènes de biosynthèse de polykétides (Piste1: *mlnA* ; Piste 2: *baeJ* ; Piste 3: *dfnD*) et de bacilysine (Piste 4: *bacC*) de la souche 32a. M1: Marqueur de taille GeneRuler, 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

## II. Clonage des gènes dans pGEM-T Easy

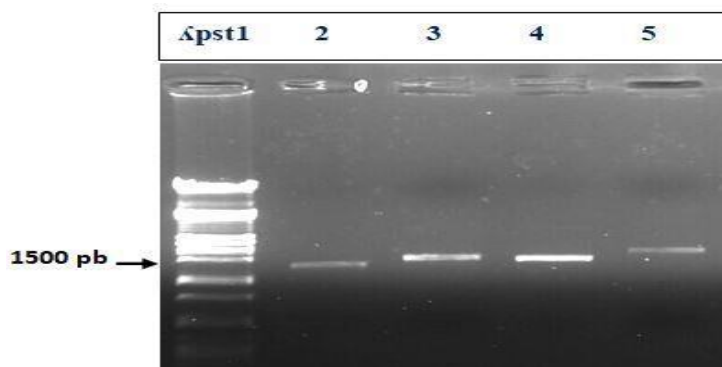
Après électrophorèse, les fragments d'ADN amplifiés ont été excisés du gel et purifiés, puis les bandes d'intérêt ont été clonées au sein du vecteur pGEM-T Easy. Après introduction des plasmides recombinants dans *E. coli*, un certain nombre de clones de couleur blanche ont

été sélectionnées. Les plasmides ont été extraits, purifiés et analysés par amplification du gène d'intérêt et par digestion. La vérification du clonage des gènes de *mlnA*, *baeJ* et *dfnD* dans le vecteur pGEM-T Easy a été effectuée via une digestion avec *EcoRI*. La restriction par cette enzyme permet d'obtenir les fragments attendus de 4591, 4717 et 4558 pb correspondant à la longueur de *pmlnA*, *pbaeJ* et *pdfnD*, respectivement. Le plasmide *pbacC* (4600 pb) résultant de l'intégration du fragment *bacC* dans pGEM-T Easy a été vérifié par digestion enzymatique avec *SmaI* (Figure 42).



**Figure 42:** Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments digérés de *pmlnA*, *pbaeJ*, *pdfnD* et *pbacC* correspondant aux pistes 1, 2, 3 et 4 respectivement.  $\lambda$ PstI : Marqueur de taille

En plus, une PCR par les amorces T7 et SP6 spécifiques du pGEM-T Easy a été réalisée afin de valider l'intégration des gènes en question. En effet, des amplicons de 1576, 1702, 1570 et 1585 pb correspondant aux gènes de *mlnA*, *baeJ*, *dfnD* et *bacC* ont été observés, respectivement, (Figure 43) ce qui valide l'intégration de ces gènes.



**Figure 43:** Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments amplifiés par PCR avec les amorces T7 et SP6.  $\lambda$ PstI: Marqueur de taille, Piste 2: PCR depuis *pmlnA*, Piste 3: PCR depuis *pdfnD*, Piste 4: PCR depuis *pbacC*, Piste 5: PCR depuis *pbaeJ*.

### III. Validation du clonage de la cassette de résistance à la kanamycine (km) dans les vecteurs générés

Concernant la vérification du clonage de la cassette par digestion, la restriction des clones recombinants par *Hind*III a permis d'obtenir les fragments attendus de 4591, 4717, 4558 pb et 1500 pb correspondant aux vecteurs pGEM-T Easy-*mlnA*, pGEM-T Easy-*baeJ*, pGEM-T Easy-*dfnD* et la cassette à la kanamycine (km), respectivement. D'autre part, la validation de l'intégration de la cassette dans le vecteur pGEM-T Easy-*bacC* a été effectuée via une digestion avec *Sma*I. Deux fragments attendus de 4600 et 1500 pb ont été observés suite à la restriction de *pkbacC* (Figure 44).

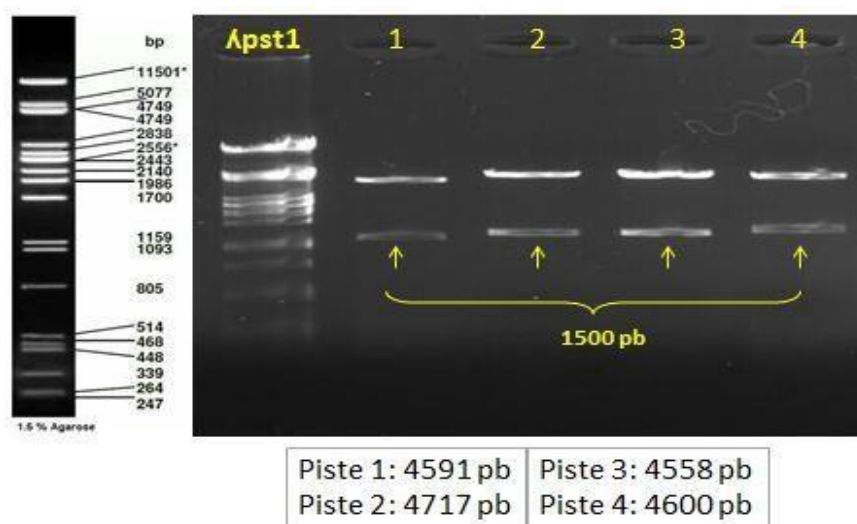
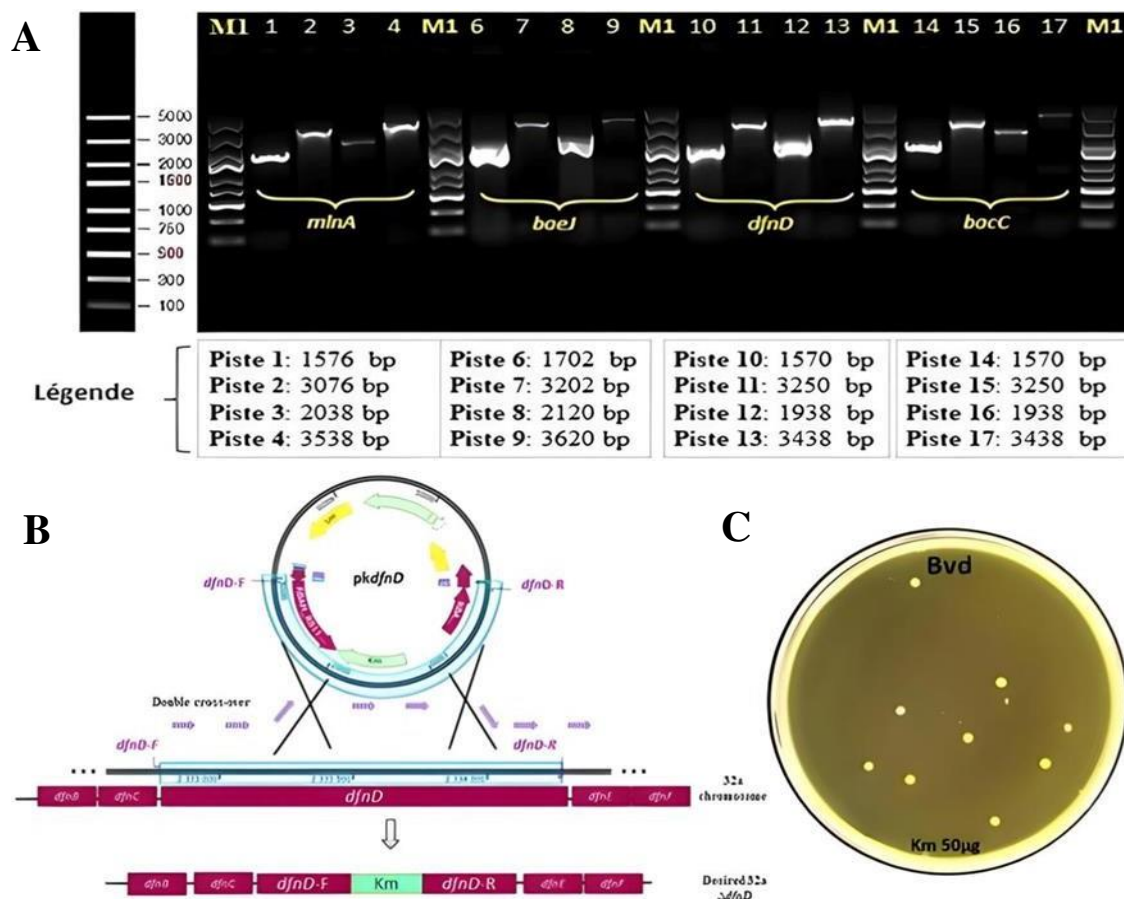


Figure 44: Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments digérés de *pkmlnA*, *pkbaeJ*, *pkdfnD* et *pkbacC* correspondant aux pistes 1, 2, 3 et 4, respectivement.  $\lambda$ PstI: Marqueur de taille.

### IV. Transformation de la souche de *B. velezensis* 32a

Au cours de ce travail, différentes méthodes de transformation ont été utilisées (protocole de Cao et al (2011) ; protocole de Zhang et al (2011) ; utilisation des protoplastes ; protocole d'*E. faecalis*). Cependant, la transformation de la souche 32a a été très compliquée et difficile à prouver. De ce fait, un autre protocole basé sur la compétence naturelle induite par limitation en azote a été investiguée (Andric et al., 2021). Les résultats d'amplification PCR ont montré la présence d'amplicons de tailles attendues (Figure 45). En effet, la différence de taille entre la souche sauvage et les transformants correspond à la taille de la cassette de kanamycine (1500

pb). Ces résultats indiquent que les gènes cibles ont été interrompus par l'incorporation de la cassette Km dans le génome grâce à une double recombinaison homologue.



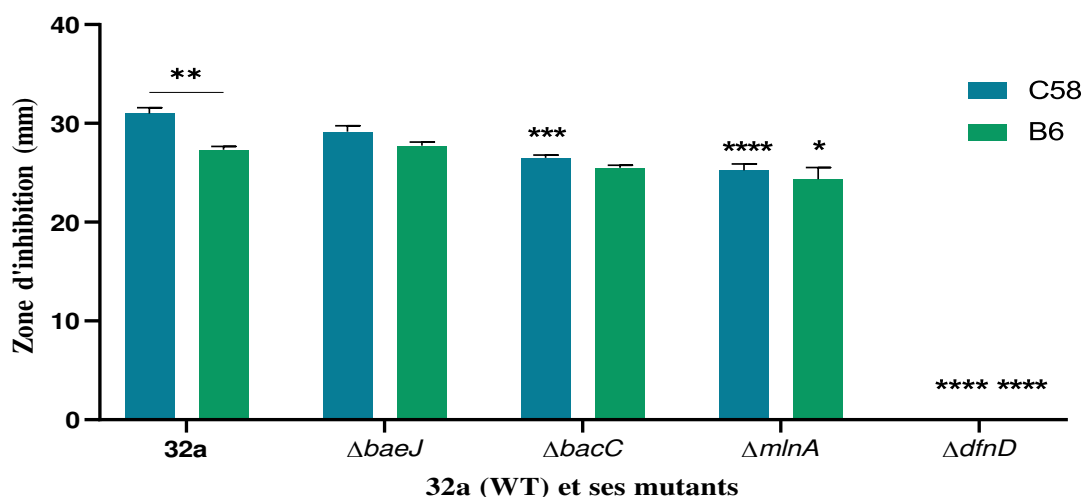
**Figure 45:** Construction de mutants de délétion de *mlnA*, *baeJ*, *dfnD* et *bacC* chez *B. velezensis* 32a. A: Électrophorèse sur gel d'agarose des mutants Bvm, Bvbe, Bvd et Bvbc. M1: Marqueur d'ADN GeneRuler DNA Express (Thermo Fisher Scientific) ; Pistes 1, 6, 10, 14: amplicons de *mlnA*, *baeJ*, *dfnD* et *bacC* de 32a (WT) ; Pistes 2, 7, 11, 15 : amplicons des gènes correspondants + cassette Km (1500 pb) des mutants Bvm, Bvbe, Bvd et Bvbc ; Pistes 3, 8, 12, 16: régions flanquantes des amplicons de *mlnA*, *baeJ*, *dfnD* et *bacC* de 32a WT ; Pistes 4, 9, 13, 17: régions flanquantes des amplicons correspondants + cassette Km des mutants 32a. B: Schéma de principe détaillant la procédure de la double recombinaison homologue conduisant à l'obtention du mutant Bvd (cas de délétion de *dfnD*). C: Clones de 32a ( $\Delta dfnD$ ) sur boîte de LB gélosé à 50 µg/mL de Km cultivés pendant 24 h à 37 °C.

## V. Caractérisation des mutants déficients dans la biosynthèse des métabolites de *B. velezensis* 32a vis-à-vis du pathogène *A. tumefaciens*

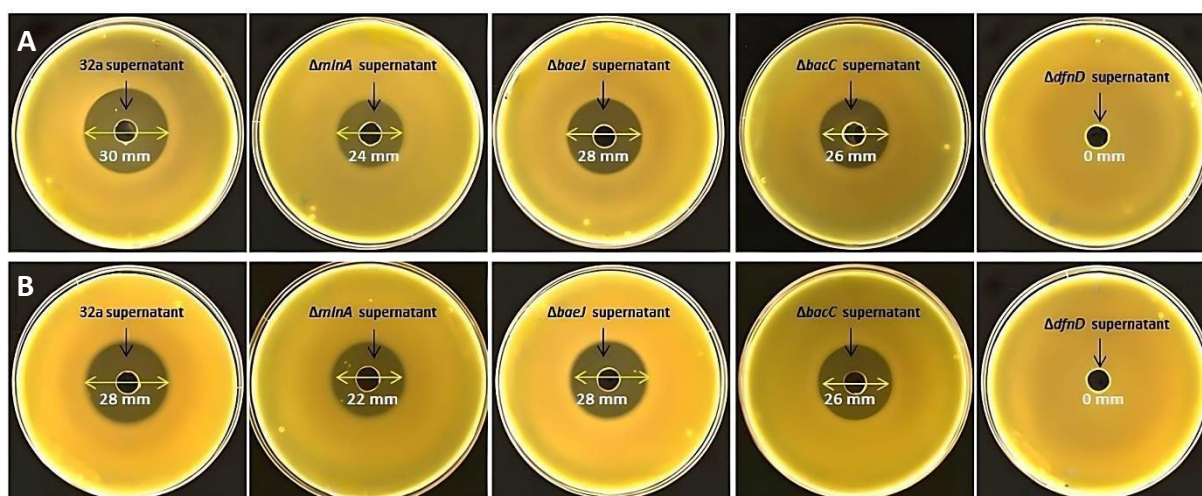
En ce qui concerne la caractérisation de l'activité antibactérienne des mutants de 32a et leur comparaison avec la souche sauvage (Figure 46), les résultats ont montré que le mutant Bvd ( $\Delta dfnD$ ), déficient en difficidine mais capable de produire les lipopeptides, les bacillaènes,

les macrolactines et la bacilysine, a totalement perdu son activité antagoniste contre *A. tumefaciens* C58 et B6 (Figure 47). Ce résultat indique la contribution importante de la difficidine dans le processus d'antagonisme. Cependant, l'effet inhibiteur exercé par Bvbe ( $\Delta baeJ$ ) sur les souches d'*A. tumefaciens* était comparable à celui de 32a, tandis que Bvbc ( $\Delta bacC$ ) a montré une diminution significative uniquement de la croissance d'*A. tumefaciens* C58. Cela suggère que la bacilysine et les bacillaènes pourraient ne pas jouer un rôle dans le contrôle d'*A. tumefaciens* *in vitro*. Cependant, Bvm ( $\Delta mlnA$ ) a significativement réduit l'activité des souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6.

Ces résultats indiquent que la difficidine est le composé le plus impliqué dans l'antagonisme contre *A. tumefaciens* C58 et B6, tandis que les macrolactines peuvent également jouer un rôle essentiel.



**Figure 46:** Comparaison de l'effet antibactérien des surnageants de *B. velezensis* 32a (WT) et de ses mutants contre *A. tumefaciens* C58 et B6. L'analyse statistique des données a été réalisée avec trois répétitions. Les astérisques indiquent des différences significatives entre le WT et chaque mutant \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , selon le test de ANOVA à deux facteurs avec le test de Tukey.



**Figure 47:** Activité antibactérienne de *B. velezensis* 32a (WT) et de ses différents mutants contre *A. tumefaciens* C58 (A) et B6 (B).

## VI. Étude approfondie de l'interaction des métabolites à l'aide des mutants de *B. velezensis* GA1 vis-à-vis d'*A. tumefaciens*

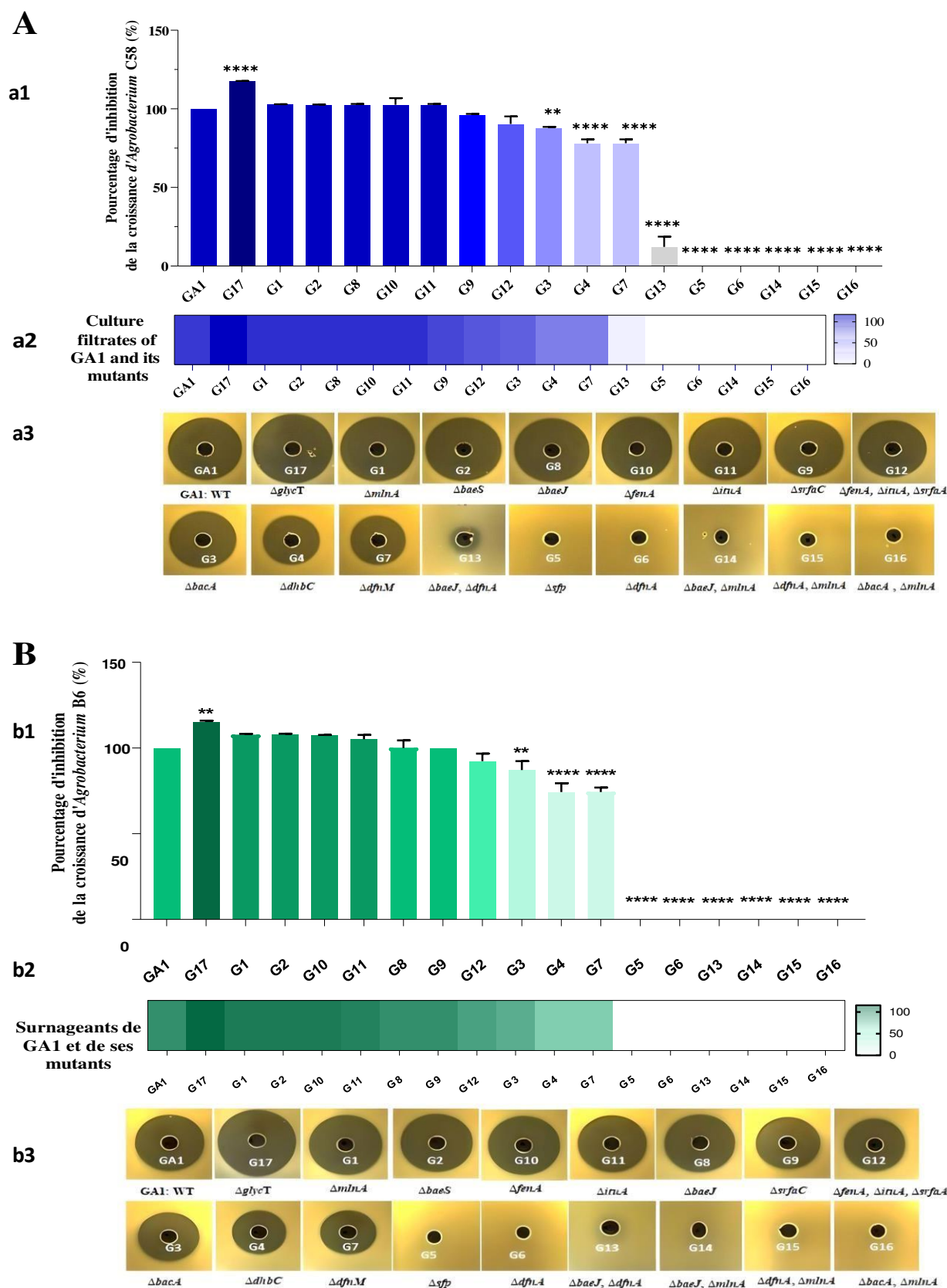
Pour étudier plus en détail l'interaction de la difficidine avec les autres composés qui peuvent être impliqués dans l'antagonisme antibactérien, un ensemble de mutants dérivés d'une souche comparable, la souche *B. velezensis* GA1, a été testé (Tableau 9). L'étude de l'activité antagoniste des mutants GA1 envers le pathogène bactérien a mis en évidence dix mutants présentant une différence significative par rapport à la souche sauvage (Figure 48). Parmi ces mutants, la souche G5 était totalement incapable d'inhiber la croissance d'*A. tumefaciens* en raison d'une interruption du gène *sfp* codant pour la 4'-phosphopantetheinyl transferase nécessaire à la biosynthèse des polykétides et des lipopeptides (Chen et al., 2006). Étant donné que la bacilysine est produite via une voie non ribosomique indépendante de *Sfp* (Islam et al., 2022), la mutation  $\Delta sfp$  rejette l'hypothèse de la contribution de la bacilysine, mais suggère davantage l'implication des lipopeptides et des polykétides dans l'inhibition d'*A. tumefaciens*. Comme obtenue avec le mutant de la souche 32a, la perte totale d'activité de G6 ( $\Delta dfnA$ ), une souche mutante dépourvue de synthèse de la difficidine, confirme le rôle crucial de ce métabolite dans la suppression d'*A. tumefaciens*. Cependant, le mutant G14 ( $\Delta baeJ$ ,  $\Delta llnA$ ), déficient dans la production des macrolactines et des bacillaènes, était incapable de supprimer la croissance d'*A. tumefaciens* malgré la production de la difficidine. Cette constatation indique que la production combinée de la difficidine, la bacilysine et les lipopeptides ne permet pas

d'inhiber la croissance du phytopathogène, ce qui révèle probablement un effet synergique de la difficidine avec les macrolactines ou les bacillaènes. Par conséquent, une souche mutante doublement déficiente en macrolactines et en bacilysine a été utilisée. Les résultats obtenus ont montré que la souche G16 ( $\Delta bacA$ ,  $\Delta mlnA$ ) et ses composés (difficidine, bacillaènes et lipopeptides) n'inhibaient pas les souches d'*A. tumefaciens* (Figure 48). Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'un effet synergique entre la difficidine et les macrolactines plutôt qu'entre la difficidine et les bacillaènes dans l'inhibition d'*A. tumefaciens*.

Un mutant incapable de produire la forme glycosylée de la bacillaènes et des macrolactines a particulièrement présenté le taux d'inhibition le plus élevé (117,46 % et 115,38 % pour C58 et B6, respectivement) et a significativement amélioré l'activité antibactérienne par rapport à la souche GA1.

De plus, notre analyse statistique montre que le mutant déficient en bacillibactine G4 ( $\Delta dhbC$ ) a considérablement réduit l'activité antibactérienne contre les souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6, avec des taux d'inhibition de 78,14 % et 74,35 %, respectivement. Ces résultats indiquent que la bacillibactine pourrait potentiellement aider à inhiber le pathogène cible.

D'autre part, lorsqu'ils ont été testés contre les souches d'*A. tumefaciens*, les mutants des bacillaènes (G2:  $\Delta baeS$  et G8:  $\Delta baeJ$ ), des macrolactines (G1:  $\Delta mlnA$ ) et des lipopeptides (G12:  $\Delta fenA$ ,  $\Delta ituA$ ,  $\Delta srfaA$ , G9:  $\Delta srfaC$ , G11:  $\Delta ituA$  et G10:  $\Delta fenA$ ) n'ont montré aucune différence significative par rapport à la souche sauvage et ont exercé une activité antibactérienne similaire à celle de la souche GA1.

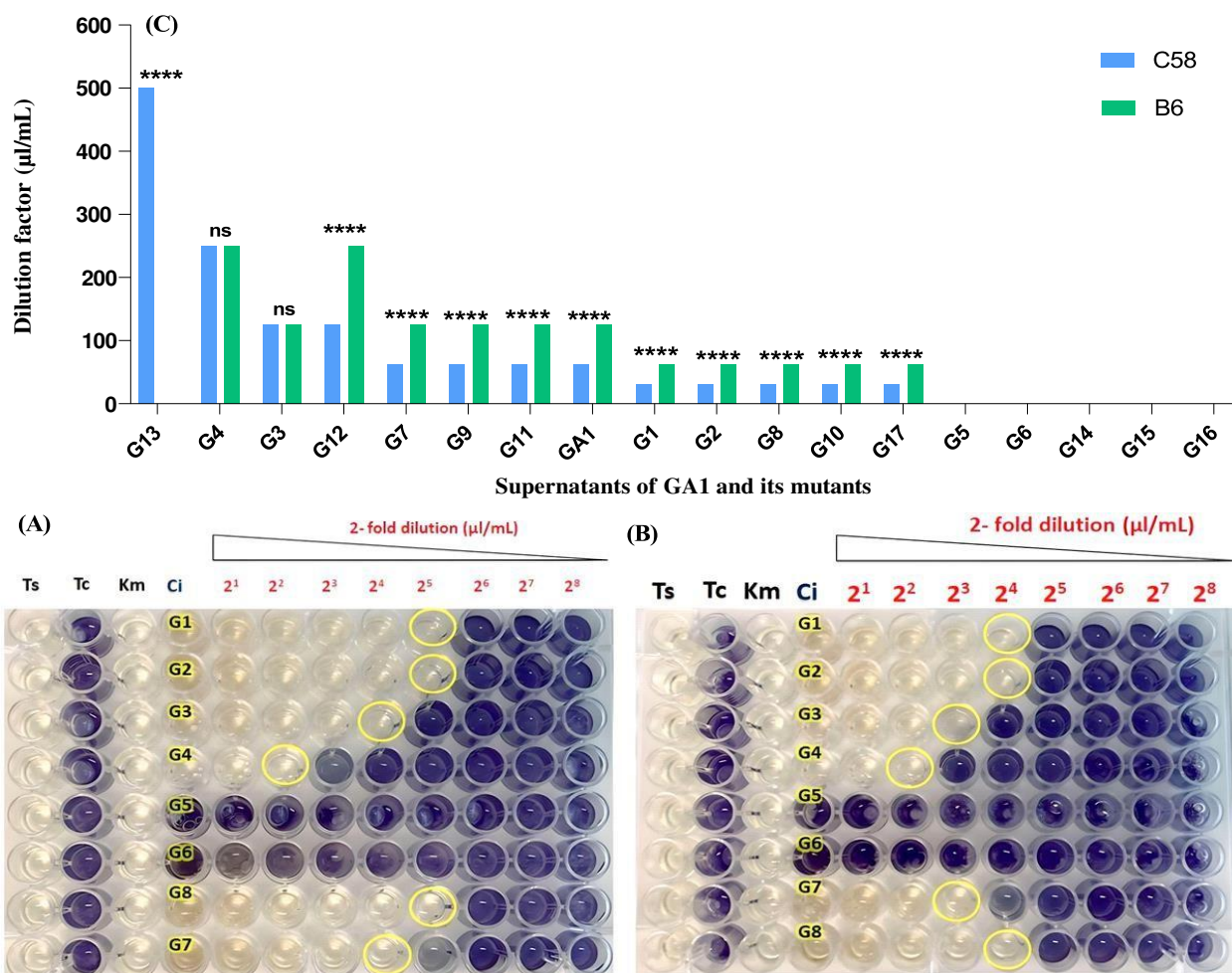


**Figure 48:** Inhibition de la croissance des phytopathogènes d'*A. tumefaciens* C58 et B6 en réponse à GA1 et ses mutants (a1 et b1), leurs cartes thermiques (a2 et b2) et leurs tests de diffusion de disque

correspondants (a3 et b3), respectivement. Les données dans les graphiques montrent la moyenne et l'écart-type de trois répétitions. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test ANOVA à un facteur avec le test de Dunnett pour les comparaisons multiples. Les astérisques indiquent que l'activité antagoniste des mutants de GA1 contre le pathogène bactérien était significativement différente de celle de la souche sauvage (GA1) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , ns (non significatif sur le plan statistique)).

## VII. Analyses de la concentration minimale inhibitrice de GA1 et de ses mutants

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des surnageants de GA1 et de ses différents mutants ont été évaluées contre les souches bactériennes cibles. Selon les résultats obtenus, *A. tumefaciens* C58 s'est révélée significativement plus sensible à la majorité des mutants de GA1 par rapport à la souche B6. A titre d'exemple, il n'y avait aucune croissance visible d'*A. tumefaciens* C58 et B6 dans les puits contenant le surnageant de GA1 à des facteurs de dilution de  $2^4$  (62,5  $\mu\text{L/mL}$ ) et  $2^3$  (125  $\mu\text{L/mL}$ ), respectivement (Figure 49). Cependant, la croissance des souches d'*A. tumefaciens* a été observée dans les puits contenant le surnageant de cinq mutants (G5:  $\Delta\text{sfp}$ , G6:  $\Delta\text{dfnA}$ , G14:  $\Delta\text{baeJ}$ ,  $\Delta\text{mlnA}$ , G15:  $\Delta\text{dfnA}$ ,  $\Delta\text{mlnA}$  et G16:  $\Delta\text{bacA}$ ,  $\Delta\text{mlnA}$ ) à un facteur de dilution de  $2^1$  à  $2^8$ . Le facteur de dilution nécessaire pour inhiber la croissance d'*A. tumefaciens* C58 des souches suivantes : G1 ( $\Delta\text{mlnA}$ :  $2^5$ ), G2 ( $\Delta\text{baeS}$ :  $2^5$ ), G8 ( $\Delta\text{baeJ}$ :  $2^5$ ), G10 ( $\Delta\text{fenA}$ :  $2^5$ ) et G10 ( $\text{glycT}$ :  $2^5$ ) était inférieur par rapport à la souche sauvage (GA1 :  $2^4$ ). Ce résultat était également cohérent lors des tests contre la souche B6. Cela indique que l'interruption unique de ces gènes n'a pas de contribution significative dans l'inhibition d'*A. tumefaciens*. De plus, la détermination des CMI confirme les tests de diffusion, pour lesquels cinq mutants (G5, G6, G14, G15 et G16) se sont révélés incapables d'inhiber la croissance d'*A. tumefaciens* (CMI > 500  $\mu\text{L/mL}$ ).



**Figure 49:** Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de *B. velezensis* GA1 et de ses mutants contre les souches d'*A. tumefaciens* (C) par le test de microdilution en utilisant le MTT comme indicateur. La couleur violette indique la croissance bactérienne en raison de la formation de formazan, tandis que la couleur jaune pâle indique l'absence de croissance bactérienne. Les cercles jaunes indiquent la valeur de la CMI pour chaque souche contre *A. tumefaciens* C58 (A) et B6 (B). L'analyse statistique des données a été réalisée avec trois répétitions. Les astérisques indiquent des différences significatives entre *A. tumefaciens* C58 et B6 \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , tel que déterminé par ANOVA bidirectionnelle avec test de Tukey. L'absence d'astérisques indique que les valeurs de  $p$  supérieures à 0,05 étaient considérées comme non significatives.

## VIII. Discussion

En s'appuyant sur les conclusions du premier chapitre, il apparaît que les lipopeptides ne sont probablement pas à l'origine de l'activité anti-*A. tumefaciens*, car leur efficacité n'a été constatée qu'à des concentrations relativement élevées. Cela suggère que les polykétides et la bacilysine ou autres molécules devraient être plus profondément explorés afin d'évaluer leur

possible contribution dans l'antagonisme envers *A. tumefaciens*. Afin de déchiffrer leur implication dans l'activité antibactérienne, des mutants de la souche d'intérêt 32a déficients dans la biosynthèse de la difficidine, des macrolactines, des bacillaènes et de la bacilysine ont été générés. Ces mutants ont été obtenus par recombinaison homologue en interrompant à chaque fois la production de l'une de ces molécules par l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine. Les mutants obtenus ont été comparés par rapport à la souche sauvage (32a) pour leurs activités *in vitro* vis-à-vis des souches C58 et B6 d'*A. tumefaciens*. Par la suite, pour approfondir l'étude de l'interaction entre les composés, une comparaison a été effectuée entre nos mutants de 32a et 17 mutants issus d'une souche similaire de *B. velezensis* GA1, fournie par l'unité de BioEcoAgro en Belgique.

Commençant par la construction des mutants de 32a, la souche s'est avérée difficile à transformer. Certaines souches de *B. velezensis* sont connues pour leur faible efficacité en manipulation génétique, ce qui restreint leurs possibilités d'application en biotechnologie (**Chen et al., 2022**). La compréhension des mécanismes sous-jacents à cette difficulté revêt une importance cruciale pour révéler leur potentiel. En effet, la difficulté de transformation de la souche 32a de *B. velezensis* peut avoir plusieurs origines expliquant le problème rencontré lors de la construction des mutants. Conformément à son embranchement (Firmicutes : peau dure), la souche 32a de *B. velezensis* est une bactérie à Gram positif (G+), caractérisée par une épaisse couche de peptidoglycane (**Fan et al., 2018**). Cette structure est constituée de chaînes alternées de N-acétylglucosamine (NAG) et de l'acide N-acétylmuramique (NAM) liés *via* des ponts osidiques  $\beta$ -1,4. Elle joue le rôle d'une barrière physique chez les bactéries à Gram positif, limitant ainsi les transformations génétiques (**Guez et al., 2009; Pyne et al., 2013; Sirajuddin & Sundram, 2020**). Au cours de cette étude, afin de surmonter cette première difficulté, nous avons procédé à un traitement préalable des cellules de la souche 32a, en utilisant des agents d'affaiblissement de la paroi cellulaire tels que la glycine, la DL-thréonine, le lysozyme et en employant l'électroporation (**Zhang et al., 2011; Sirajuddin & Sundram, 2020; Zhu et al., 2020**). Ces agents catalysent la rupture des liaisons glycosidiques entre les unités NAG et NAM, facilitant ainsi la fragmentation de cette structure. Cela permet à l'ADN exogène de pénétrer plus facilement dans la paroi cellulaire (**Zhang et al., 2011**). L'électroporation permet de former des pores au niveau de la membrane cellulaire ce qui facilite le passage d'ADN à travers la membrane cellulaire. De même, des études menées par **Jang & Britz (2000)** et **Liu et al. (2018)** révèlent que la délétion des gènes impliqués dans la synthèse du peptidoglycane a

amélioré l'efficacité de l'électro-transformation chez *Corynebacterium glutamicum* (G+). En outre, la capacité de *B. velezensis* 32a à produire des endospores résistantes complique également le processus de transformation génétique. Les spores sont généralement considérées comme étant dans un état dormant, et la réussite de la transformation génétique est souvent plus élevée lorsque les cellules se trouvent dans un état végétatif actif plutôt qu'en état de spore (Zhang et al., 2011). Cette difficulté découle de l'enveloppe morphologiquement complexe qui entoure les endospores, principalement constituée d'une couche très épaisse de peptidoglycane spécialisée appelée cortex, d'acide dipicolinique et de protéines constitutives de l'enveloppe (Cho & Chung, 2020). En raison de cette enveloppe complexe, les endospores acquièrent une résistance considérable face à divers facteurs tels que la chaleur, les rayons ultraviolets (UV) et d'autres conditions extrêmes, ce qui rend les endospores moins accessibles à l'ADN plasmidique étranger (Kim et al., 2006). En effet, pour faciliter l'électrotransformation de la souche 32a étudiée, les cellules ont été cultivées dans des milieux de croissance riches en sel (NCM, LBSP, MMG) afin de promouvoir la formation de cellules végétatives relativement lâches et de fournir aux cellules les ions et le pH nécessaires (Zhang et al., 2011). D'autres constituants de l'enveloppe cellulaire, tels que les lipoprotéines, l'acide téichoïque et les exopolysaccharides (EPS), ont été identifiés comme jouant un rôle crucial dans le transfert horizontal de gènes (Dahmane, 2017). Plus précisément, les exopolysaccharides sont des polysaccharides sécrétés par les cellules bactériennes, formant ainsi une matrice visqueuse autour d'elles (Schmid et al., 2015). Ces polymères se sont révélés essentiels dans la protection des bactéries contre l'entrée d'ADN exogène, en créant notamment une matrice extracellulaire protectrice. Par exemple, des études ont montré que la délétion des gènes de EPS chez *Halomonas bluephagenesis* améliore la perméabilité membranaire et favorise l'électrotransformation, ce qui était impossible dans la souche sauvage (Xu et al., 2022). Dans notre situation, les colonies de la souche 32a sur LB gélosé présentent un aspect visqueux, indiquant la production des EPS. Il est possible que la difficulté de transformation de la souche étudiée soit due à la sécrétion d'exopolysaccharides (Guezennec, 2017). De plus, la présence du système de restriction-modification (RM) chez *B. velezensis* pourrait également être responsable de cette difficulté (He et al., 2013; Chen et al., 2022). Ce système constitue un composant du mécanisme de défense génétique chez les bactéries, agissant comme une barrière à la transformation. Composé de quatre types (I, II, III et IV), il identifie l'état de méthylation de l'ADN exogène (Riley & Guss, 2021). Généralement, les séquences méthylées sont reconnues comme soi (auto), alors que les séquences d'ADN

dépourvues de méthylation sont perçues comme non soi (non auto) et sont clivées par l'endonucléase de restriction. Dans ce système RM, les enzymes de restriction agissent en coupant spécifiquement l'ADN étranger non méthylé, tandis que les enzymes de modification reconnaissent des séquences spécifiques dans l'ADN et y ajoutent un groupe méthyle (CH<sub>3</sub>), généralement sur une cytosine ou une adénine. Cette méthylation protège l'ADN bactérien contre l'auto-restriction. Bien que les systèmes RM de types I, II et III englobent à la fois des enzymes de restriction et des méthyltransférases, le type IV se compose uniquement d'une nucléase. Cette dernière possède la particularité de dégrader tout ADN exogène méthylé, présentant des motifs de reconnaissance différents de ceux visés par les méthyltransférases des types I, II et III (Riley & Guss, 2021). Des études ont montré que *B. velezensis* possède à la fois une enzyme de restriction de type II, (*Bam*HI), et le système de type IV, compliquant ainsi l'incorporation d'ADN (Zhang et al., 2015; Gao et al., 2019; Xin et al., 2022). Pour contourner le système RM, différentes approches ont été utilisées. Par exemple, le recours à un choc thermique est une pratique courante pour atténuer l'activité du système RM de l'hôte, ce qui permet d'améliorer l'efficacité de la transformation (Zhang et al., 2011; Sun et al., 2014). Une autre alternative efficace pour contourner le système RM consiste à méthyler les plasmides exogènes soit *in vitro* en utilisant des méthyltransférases commerciales telles que *Bam*HI méthyltransférases (Zhang et al., 2011; Suzuki, 2012), soit *in vivo* en utilisant des souches hôtes intermédiaires de méthylation telles que *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* JM109, Mach1-T1 ou *B. subtilis* WB600 (dam<sup>+</sup> dcm<sup>+</sup>) (Allamane et al., 2000; Kolek et al., 2016; Tian et al., 2021; Wang et al., 2022). Cependant, des études ont révélé que, parfois, les plasmides extraits de ces hôtes sont clivés par le système de type IV, tandis que seuls les vecteurs préparés à partir d'*E. coli* JM110 ou GM2163 (dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup>) étaient capables d'être transformés dans des souches de *B. velezensis* (Feng et al., 2015; Gao et al., 2019). Ceci est dû au fait que ces souches d'*E. coli* sont incapables de méthyler les ADN nouvellement synthétisé, ce qui empêche la dégradation de l'ADN et améliore ainsi l'efficacité de la transformation dans les souches cibles.

Dans notre étude, les cellules préalablement électroporées ont été exposées à un traitement thermique à 46 °C dans le but de désactiver le système RM potentiellement présent dans la souche 32a. Cependant, aucun clone positif n'a été obtenu. En revanche, seul le protocole de transformation par compétence naturelle induite par limitation d'azote nous a permis d'effectuer des modifications génétiques de la souche d'intérêt. En fait, pour réussir la transformation et l'incorporation de l'ADN, les cellules receveuses doivent être dans un état

physiologique spécifique appelé état de compétence. La compétence génétique chez les bactéries fait référence à leur capacité à recevoir de l'ADN exogène, un processus naturel qui implique une cascade de régulation complexe de nombreux facteurs cellulaires (quorum-sensing: QS) et environnementaux (stress nutritif) aboutissant à l'activation des gènes de compétences (**Hamoen et al., 2003**). Contrairement à la transformation artificielle en laboratoire, qui recourt à des traitements tels que l'électroporation ou le traitement au RBCl<sub>2</sub> ou au CaCl<sub>2</sub> pour introduire de l'ADN étranger, la compétence naturelle ne nécessite pas d'intervention artificielle. Cependant, son déclenchement est étroitement lié à l'état physiologique de la bactérie et peut être influencé par des conditions spécifiques propres à chaque espèce bactérienne (**Johnsborg et al., 2007**). A titre d'exemple, le génome de *B. velezensis* FZB42 contient la plupart des gènes impliqués dans la compétence avec une forte similitude avec ceux de *B. subtilis* 168, mais les gènes *ComQ*, *ComX* et *ComP* présentent une similarité moindre avec leurs homologues de *B. subtilis* 168 (**Chen et al., 2007**). En plus, il a été montré que la transition d'un excès à une limitation en azote chez *B. subtilis* active un régulateur de transcription *TnrA*, qui contrôle l'expression de divers gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote. L'induction de ce régulateur stimule l'expression d'autres gènes impliqués dans l'assimilation et l'utilisation de source alternatives d'azote tels que la glutamine, le glutamate et l'ammonium. Par ailleurs, lors d'un manque d'azote, plus de 100 gènes dont *comG*, *comF*, *comE*, *recA* et *comK*, impliqués dans le développement de la compétence sont induits de manière significative chez *B. subtilis* (**Jarmer et al., 2002**). Cette transition nutritive a été prouvée être responsable de la transformation de *B. velezensis* 32a, induisant l'expression des gènes de régulation de la compétence chez cette souche.

Une fois les mutants obtenus, une analyse comparative a été réalisée entre ces derniers et la souche sauvage afin d'évaluer leur activité vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium*. Le mutant  $\Delta dfnD$  de 32a, déficient en difficidine, était totalement incapable de contrôler la croissance d'*A. tumefaciens* C58 et B6. Parmi les trois autres mutants, seul  $\Delta mlnA$  a montré une légère diminution de l'activité. Les investigations approfondies en utilisant les différents mutants de la souche GA1 confirment la forte contribution de la difficidine et mettent en évidence un effet synergique avec les macrolactines. Ces résultats sont cohérents avec de nombreuses études qui ont rapporté l'activité antagoniste de la difficidine, ainsi que de sa forme oxydée, l'oxydifficine, contre un large éventail de souches bactériennes aérobies et anaérobies (**Zimmerman et al., 1987**). A titre d'exemple, la croissance d'*E. amylovora*, un pathogène redoutable responsable

du feu bactérien des pommiers, des poiriers et d'autres plantes de la famille des Rosacées, a été fortement supprimée par la difficidine et son isoforme l'oxydifficidine (Chen et al., 2009; Dagher et al., 2021). De plus, il a été rapporté que la difficidine était cruciale pour l'activité antagoniste de *B. amyloliquefaciens* AP193 contre *P. syringae*, *Rhizobium radiobacter* et *X. campestris* (Hossain et al., 2015). En association avec la bacilysine, la difficidine de *B. velezensis* FZB42 a démontré une activité antibactérienne contre *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola* et *E. amylovora*, responsables respectivement des maladies du flétrissement bactérien, des stries foliaires et du feu bactérien (Chen et al., 2009; Wu et al., 2015). Les macrolactines ont été principalement signalées comme un agent antibactérien (Yuan et al., 2016). Par exemple, il a été démontré que la souche *A. tumefaciens* C58 est directement inhibée par la macrolactine A et la 7-O-succinyl-macrolactine A purifiées en réduisant la division cellulaire de C58 et en régulant l'expression des gènes de virulence chromosomique de ce pathogène (Chen et al., 2021). De même, il a été montré que les macrolactines étaient des agents antimicrobiens efficaces contre *P. capsici*, *F. oxysporum* et *R. solanacearum* (Sopheareth et al., 2013; Salazar et al., 2020; Sui et al., 2022b).

Néanmoins, nos résultats contredisent une étude précédente qui a démontré l'effet synergique entre l'oxydifficidine et la dihydrobacillaène contre *A. tumefaciens* en testant divers mutants et plus particulièrement le mutant  $\Delta baeJ\text{-}\Delta dfnA$  (Andric et al., 2021). En revanche, notre étude révèle que le mutant ( $\Delta bacA$ ,  $\Delta mlnA$ ), malgré sa production à la fois de la difficidine et des bacillaènes, était incapable d'inhiber la croissance d'*A. tumefaciens*. Par conséquent, l'activité contre *A. tumefaciens* ne peut pas être attribuée à la synergie entre la difficidine et les bacillaènes, mais nos résultats mettent clairement en évidence, et pour la première fois, l'effet synergique entre la difficidine et les macrolactines. Des études précédentes ont établi que l'activité antimicrobienne de certaines molécules pourrait être liée à un effet synergique lorsqu'elles sont combinées avec d'autres composés (Mihalache et al., 2018; Wang et al., 2020). En particulier, certaines combinaisons de molécules offrent des mécanismes d'action diversifiés, garantissant ainsi que plusieurs cibles au sein du pathogène sont attaquées simultanément. Cette approche rend plus complexe, pour le pathogène, le développement d'une résistance. En effet, la mutation nécessaire pour résister à un mode d'action spécifique ne confère pas nécessairement une résistance à un autre. Par conséquent, cela réduit la pression de sélection sur les phytopathogènes, minimisant ainsi les risques d'émergence de résistances. En outre, certaines combinaisons de molécules permet l'usage de dosages plus modérés de chaque

composant, réduisant de ce fait, leur impact environnemental (Regmi et al., 2017; Malki et al., 2023).

De plus, selon nos résultats, le mutant déficient en bacillibactine de *B. velezensis* GA1 a significativement réduit l'activité antibactérienne. Ceci montre que la bacillibactine peut potentiellement aider à inhiber *A. tumefaciens*. De même, selon Dimopoulou et al. (2020), le manque de fer a stimulé la production de bacillibactine, ce qui a entraîné une augmentation significative de l'activité bactéricide de *B. amyloliquefaciens* MBI600 contre *P. syringae* pv. *tomato* aussi bien en conditions *in vitro* qu'*in vivo*.

En outre, nos résultats mettent en évidence un lien entre le mutant G17, incapable de produire la forme glycosylée des bacillaènes et des macrolactines, et le taux d'inhibition de croissance particulièrement élevé. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études démontrant que la glycosylation des macrolactines et des bacillaènes réduit leur efficacité antibactérienne et facilite la détoxification des métabolites toxiques (Qin et al., 2014).

Enfin, nos résultats révèlent des réponses différentes des souches d'*A. tumefaciens* aux lipopeptides et à la plupart des mutants de GA1, suggérant ainsi une variation de la sensibilité de ce phytopathogène aux polykétides. Ces conclusions sont cohérentes avec plusieurs études démontrant la forte sensibilité de la souche nopaline C58 à l'agrocine produite par les souches non pathogènes d'*A. radiobacter* (K84 et K1026). En revanche, la souche octopine B6 n'a montré aucune inhibition, ce qui indique sa résistance à ces traitements (Rhouma et al., 2004, 2008).

## IX. Conclusion

Le deuxième volet de cette étude s'est focalisé sur la compréhension de l'implication spécifique des métabolites produits par la souche 32a dans l'activité inhibitrice d'*A. tumefaciens*. Pour cela des souches mutantes de trois polykétides (macrolactines (Bvm), bacillaène (Bvbe), difficidine (Bvd) et de la bacilysine (Bvbc)) ont été générées. Sachant que la souche de *B. velezensis* 32a s'est avérée extrêmement recalcitrante à l'incorporation d'ADN exogène, trois protocoles différents d'électrotransformation (Electro-transformation selon Cao et al. (2011) ; électro-transformation selon Zhang et al. (2011) ; transformation suivant le protocole d'*E. faecalis* optimisé au laboratoire BioEcoAgro) et l'utilisation des protoplastes ont été investigués. Après plusieurs tentatives infructueuses d'essais de transformation, seul le

protocole de transformation par compétence naturelle induite par une limitation d'azote nous a permis d'effectuer des modifications génétiques de la souche 32a. Les mutants obtenus ont été comparés à la souche sauvage 32a pour leurs activités antagonistes *in vitro* contre les souches C58 et B6 d'*A. tumefaciens*. Le mutant  $\Delta dfnD$  de 32a, déficient en difficidine, était totalement incapable de contrôler la croissance d'*A. tumefaciens* C58 et B6. Parmi les trois autres mutants, seul  $\Delta mlnA$  a montré une légère diminution de l'activité. Ces résultats indiquent que la difficidine est le composé le plus impliqué dans l'antagonisme contre C58 et B6, tandis que les macrolactines peuvent également jouer un rôle essentiel. Par la suite, pour approfondir l'étude de l'interaction entre les composés, une comparaison a été effectuée entre les mutants de 32a et 17 mutants issus d'une souche similaire de *B. velezensis* GA1. Comme observé avec le mutant de la souche 32a, un mutant de GA1 dépourvu de la synthèse de la difficidine provoque la perte totale de l'activité, confirmant ainsi le rôle crucial de ce métabolite dans la suppression d'*A. tumefaciens*. Cependant, un mutant déficient dans la production des macrolactines et des bacillaènes était incapable de supprimer la croissance d'*A. tumefaciens* malgré la production de la difficidine. Cette constatation indique probablement un effet synergique de la difficidine avec les macrolactines ou les bacillaènes. Par conséquent, une souche mutante doublement déficiente en macrolactines et en bacilysine a été utilisée. Les résultats obtenus ont montré que ce mutant ( $\Delta bacA$ ,  $\Delta mlnA$ ) et ses composés (difficidine, bacillaènes et lipopeptides) n'inhibaient pas les souches d'*A. tumefaciens*. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'un effet synergique entre la difficidine et les macrolactines plutôt qu'entre la difficidine et les bacillaènes dans l'inhibition d'*A. tumefaciens*. De même, les résultats montrent que le mutant déficient en bacillibactine a considérablement réduit l'activité antibactérienne contre les souches d'*A. tumefaciens*, suggérant que la bacillibactine pourrait potentiellement aider à inhiber ce pathogène.

# *Chapitre 3*

*Purification des métabolites anti-*A.*  
tumefaciens de *B. velezensis* 32a et étude de  
leur synergie et de leur cytotoxicité*



## Introduction

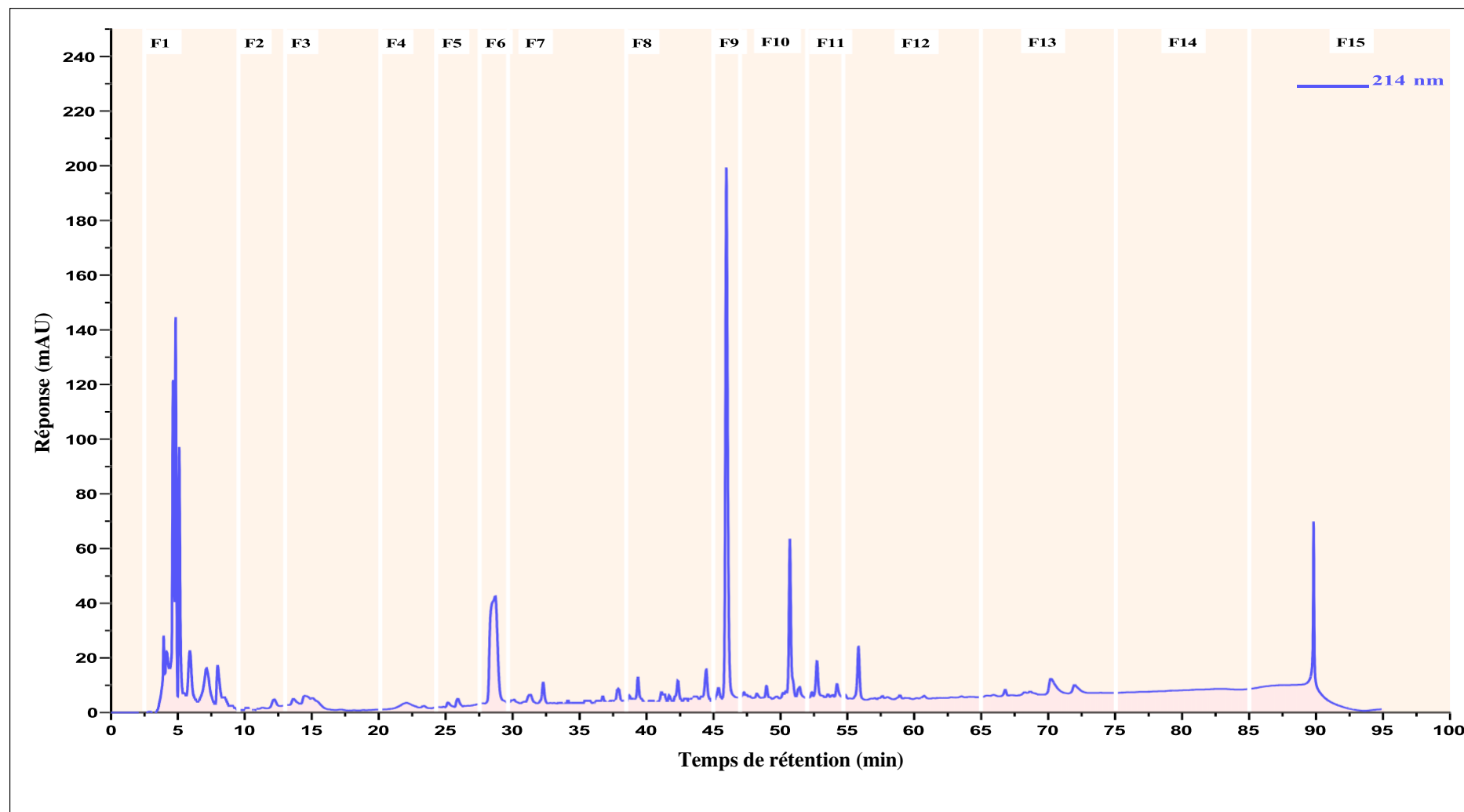
Les métabolites secondaires d'origine bactérienne ont démontré leur capacité à jouer un rôle bénéfique dans la lutte contre les maladies. Leur importance réside dans leur potentiel à agir comme agents antibactériens, antifongiques, antiviraux et même anticancéreux. Toutefois, il est crucial de reconnaître qu'en plus de leurs effets bénéfiques, certains métabolites secondaires bactériens peuvent également présenter des effets cytotoxiques sur les cellules humaines. Cela signifie qu'ils ont la capacité de nuire aux cellules saines de l'organisme humain, ce qui pourrait potentiellement entraîner des dommages préjudiciables à l'humain. En effet, il est essentiel de mener des recherches approfondies sur leur cytotoxicité et leur risque pour la santé humaine.

L'adoption de substances actives telles que les biopesticides dans les stratégies de protection des cultures s'avère bénéfique à plusieurs égards. En effet, leur utilisation contribue à réduire de manière significative les niveaux de résidus de pesticides présents dans les produits alimentaires ainsi que les risques d'exposition des agriculteurs à ces substances. Par conséquent, cela engendre des niveaux de risque plus faibles pour le consommateur. Néanmoins, malgré les propriétés positives des biopesticides décrites ci-dessus, les réglementations internationales et européennes exigent une évaluation approfondie avant toute autorisation d'application, car toutes les substances d'origine naturelle ne sont pas nécessairement sans danger pour l'homme et pour l'environnement. *B. velezensis* est connue pour sa capacité à produire une gamme variée de métabolites bioactifs, parmi lesquels figurent des composés antimicrobiens et des acides organiques volatils (Khalid et al., 2021). Ces métabolites ont été étudiés pour leurs effets bénéfiques sur les plantes, notamment en renforçant leur résistance aux maladies et en favorisant leur croissance (Sicua et al., 2015; Grady et al., 2019). En 2017, la plupart de ces souches ont été listées par l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) dans la liste QPS (Qualified Presumption of Safety) (EFSA, 2020) et sont généralement considérées comme sans danger (GRAS) par la Food and Drug Administration des États-Unis (FDA) (Chen et al., 2021). Selon le règlement de la Commission européenne (EFSA, 2014), le développement de composés bioactifs dérivés de *Bacillus* nécessite une évaluation de leur potentiel toxique, garantissant ainsi une utilisation adéquate chez l'homme et l'animal, que ce soit en tant qu'additif alimentaire direct ou en tant que source indirecte de tels additifs. Parmi les méthodes d'évaluations, l'EFSA a proposé tout d'abord, le test d'hémolyse sur gélose au sang de mouton. Ce test doit être suivi de tests de cytotoxicité, de préférence sur les cellules Vero (Cell Line

Service: Eppelheim, Deutschland). C'est ainsi que dans cette étude, nous avons proposé d'évaluer la cytotoxicité des molécules anti-*A. tumefaciens* sur les cellules Vero. Les molécules présentant un effet inhibiteur sur *A. tumefaciens* ont été purifiées en suivant des étapes d'ultrafiltration, de diafiltration et de fractionnement par HPLC préparative. Après le fractionnement, l'activité spécifique des fractions individuelles et combinées a été vérifiée vis-à-vis d'*A. tumefaciens* C58 en milieu solide par la méthode de diffusion en puits. Enfin, les fractions présentant une activité antibactérienne ont été évaluées pour leur activité cytotoxique contre les cellules Vero. Par conséquent, cette étude pourrait fournir une information cruciale pour déterminer si ces composés sont « safe ». Ceci pourrait influencer considérablement la décision de leur application dans l'agriculture.

## **I. Purification des composés anti-*Agrobacterium* par HPLC préparative et étude de la synergie d'action des métabolites**

Afin d'identifier les molécules présentant une activité antibactérienne, le surnageant de culture de la souche 32a lyophilisé a subi des étapes d'ultrafiltration, de diafiltration sur membrane de 10 kDa puis le filtrat a été fractionné par HPLC préparative en 15 fractions selon la formation des pics nommées F1 à F15 et présenté dans le chromatogramme ci-après (**Figure 50**).



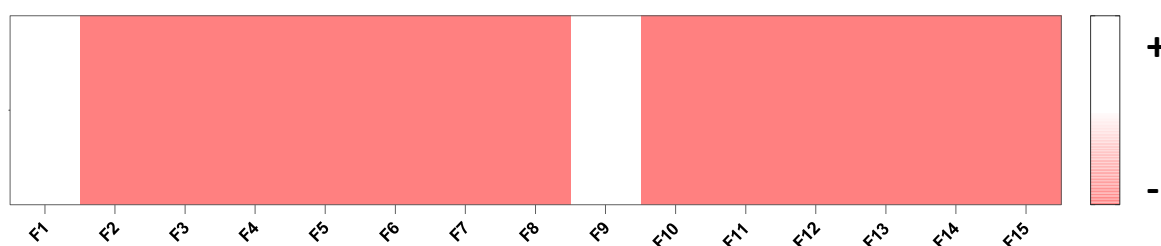
**Figure 50:** Fractionnement de 28,2 mg/mL de filtrat de *B. velezensis* 32a par HPLC préparative avec un gradient comme suit : 0 à 10 min (98 % A et 2 % B), 10-15 min (95 % A et 5 % B), 15-35 min (70 % A et 30 % B), 35-55 min (40 % A et 60 % B), 55-80 min (0 % A et 100 % B), 80-95 min (98 % A et 2 % B) et un débit à 2 mL/min sur une colonne C18 (150 × 100 mm, 5 µm, Interchim, Montluçon, France)

## I.1 Caractérisation biologique des fractions

Étant donné que *A. tumefaciens* C58 est plus sensible aux composés antibactériens de la souche 32a, cette souche a été sélectionnée pour réaliser le test d'activité des fractions. Les fractions de F1 à F7 et F15 ont été remises dans de l'eau étant donné qu'elles ont été majoritairement éluées avec un gradient de solvant de 98 à 70 % d'eau + 0,1 % AF. Par contre, les fractions de F8 à F14 ont été dissoutes dans du DMSO à 2,5 % (sélectionnée comme la plus forte concentration n'inhibant pas *A. tumefaciens*), car elles ont été principalement éluées avec un gradient de solvant de 60 à 100 % d'acétonitrile + 0,1 % d'AF (**Tableau 15**). Les résultats du test ont montré que seules les fractions F1 et F9 sont actives vis-à-vis du phytopathogène cible à des concentrations de 41,73 et 1 g/L, respectivement (**Tableau 15 + Figure 51**). Cela suggère que la fraction F9 contient une ou plusieurs molécules contribuant à l'activité antibactérienne, alors que l'effet observé dans la fraction F1 pourrait être attribué aux sels qui sont généralement très concentrés au pic d'injection.

**Tableau 15:** Tableau récapitulatif des concentration finales des différentes fractions testées

| Fractions | Matière sèche (g) | Volume final de dissolution (µL) | Solvant de dissolution | Concentration finale testé (g/L) |
|-----------|-------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| F1        | 0,1252            | 3000                             | H <sub>2</sub> O       | 41,7333                          |
| F2        | 0,0015            | 500                              | H <sub>2</sub> O       | 3,0000                           |
| F3        | 0,0017            | 500                              | H <sub>2</sub> O       | 3,4000                           |
| F4        | 0,0006            | 500                              | H <sub>2</sub> O       | 1,2000                           |
| F5        | 0,0003            | 500                              | H <sub>2</sub> O       | 0,6000                           |
| F6        | 0,0010            | 500                              | H <sub>2</sub> O       | 2,0000                           |
| F7        | 0,0008            | 500                              | H <sub>2</sub> O       | 1,6000                           |
| F8        | 0,0009            | 500                              | 2,5 % de DMSO          | 1,8000                           |
| F9        | 0,0008            | 800                              | 2,5 % de DMSO          | 1,0000                           |
| F10       | 0,0018            | 700                              | 2,5 % de DMSO          | 2,5714                           |
| F11       | 0,0009            | 700                              | 2,5 % de DMSO          | 1,2857                           |
| F12       | 0,0013            | 700                              | 2,5 % de DMSO          | 1,8571                           |
| F13       | 0,0012            | 700                              | 2,5 % de DMSO          | 1,7143                           |
| F14       | 0,0011            | 700                              | H <sub>2</sub> O       | 1,5714                           |
| F15       | 0,0015            | 700                              | H <sub>2</sub> O       | 2,1429                           |



**Figure 51:** Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions individuelles du filtrat de la souche 32a contre *A. tumefaciens* C58. La couleur blanche indique la présence d'une activité (+), tandis que la couleur rouge indique l'absence d'activité (-).

## I.2 Caractérisation biochimique des fractions

Après avoir identifié les fractions actives, une analyse biochimique a été réalisée sur l'ensemble des fractions à l'aide de la technique RP-HPLC-MS pour déterminer les molécules responsables de l'inhibition d'*A. tumefaciens*.

En utilisant les données de masse des métabolites connus de *B. subtilis*, aucune molécule connue n'a été détectée dans les fractions de F1 à F8, F10, F14 et F15. Cependant, des signaux ioniques intenses ont été observés dans la fraction F9 avec des masses correspondant à la bacillibactine aux  $m/z$   $[M+H]^+$  883,35,  $m/z$   $[M+Na]^+$  905,24 et  $m/z$   $[M+K]^+$  921,15. De plus, des signaux ioniques dans les fractions F11 et F12 indiquaient une masse moléculaire de 402,53 Da, en accord avec celle de la macrolactine A, avec des masses aux  $m/z$   $[M+Na]^+$  425,17 et  $m/z$   $[M+K]^+$  441,04. Il est important de noter que des traces de bacillibactine et de macrolactine A ont été détectées dans la fraction 12. Cette détection peut être due au fait que ces molécules restent piégées dans la colonne et se retrouvent donc dans cette fraction. De plus, l'oxydifficidine, correspondant à la forme oxydée de la difficidine ( $m/z$  560,70), a été repérée dans la fraction F13 avec ses formes déphosphorylée ( $m/z$  503,28) et ( $m/z$  519,21) ([Figure 52, Tableau 16](#)).

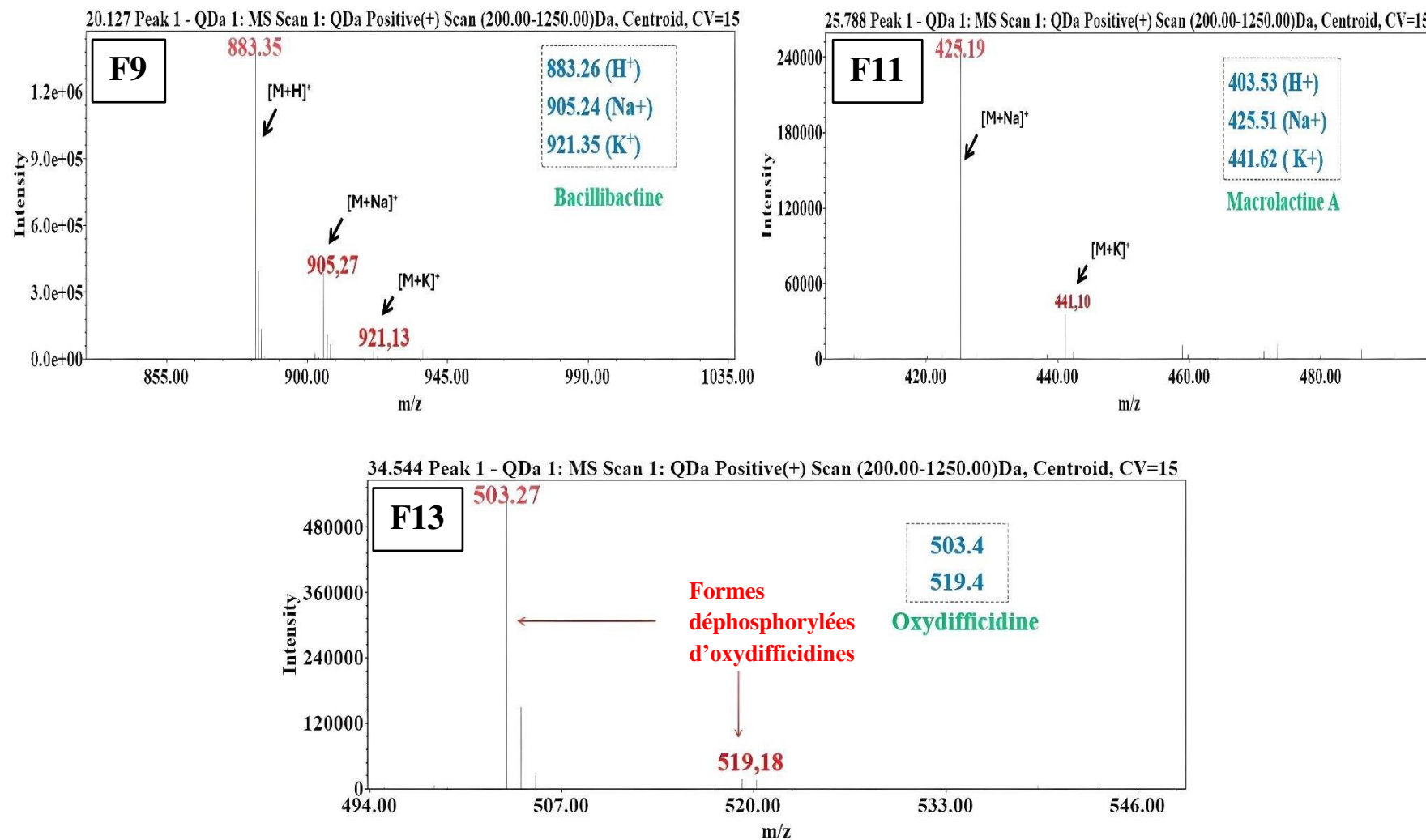


Figure 52: Identification des molécules actives dans les fractions F9, F11 et F13

**Tableau 16:** Composition des différentes fraction purifiées

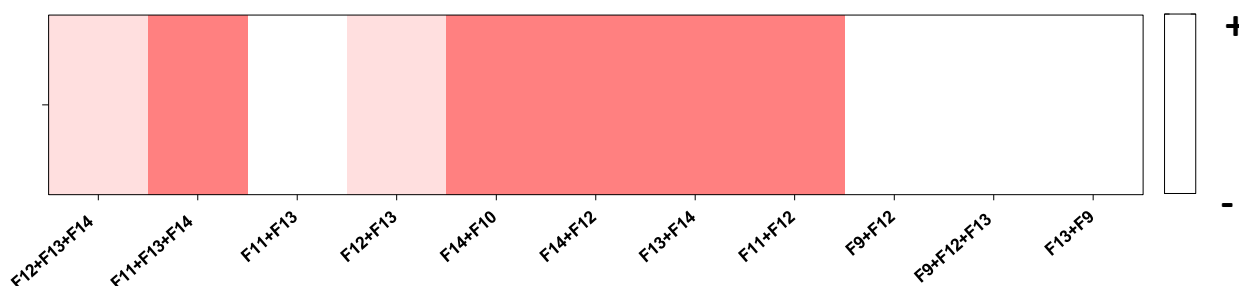
| Fraction | Composition                   |
|----------|-------------------------------|
| F9       | Bacillibactine                |
| F11      | Macrolactine A                |
| F12      | Macrolactine + Bacillibactine |
| F13      | Oxydifficine                  |

### **I.3 Etude de l'effet synergique entre la macrolactine A, l'oxydifficine et la bacillibactine dans l'inhibition d'*A. tumefaciens* C58**

Plusieurs combinaisons de fractions ont été testées pour identifier celles qui sont capables d'inhiber la croissance d'*A. tumefaciens* (Tableau 17). Les résultats ont révélé que 6 combinaisons ont montré une activité inhibitrice (Figure 53). Les mélanges contenant les fractions F12+F13+F14 et F12+F13 présentaient une activité plus faible. En revanche, les mélanges des fractions F9+F12 (à 0,8+0,8 g/L), F9+F13 (à 0,8+0,8 g/L), F9+F12+F13 (à 0,5+0,5+0,5 g/L) et F11+F13 (50 %+50 %) se sont avérés les plus actifs contre *A. tumefaciens*. L'analyse des fractions F9, F11, F12 et F13 par RP-HPLC-MS permet de conclure que ces fractions sont respectivement constituées de bacillibactine, de macrolactine A, de macrolactine A avec la bacillibactine et de l'oxydifficine. Par conséquent, ces observations confirment l'effet synergique entre la macrolactine A et l'oxydifficine, tel que prouvé précédemment dans ce travail, ainsi que l'implication significative de la bacillibactine dans l'antagonisme contre *A. tumefaciens* C58.

**Tableau 17:** Les fractions testées en combinaison contre *A. tumefaciens* C58

| Fractions testées en combinaison | Proportions ( %)  |
|----------------------------------|-------------------|
| F12+F13+F14                      | 33,33+33,33+33,33 |
| F11+F13+F14                      | 33,33+33,33+33,33 |
| F11+F13                          | 50+50             |
| F12+F13                          | 50+50             |
| F10+F14                          | 50+50             |
| F12+F14                          | 50+50             |
| F13+F14                          | 50+50             |
| F11+F12                          | 50+50             |
| F9+F12                           | 50+50             |
| F9+F12+F13                       | 33,33+33,33+33,33 |
| F9+F13                           | 50+50             |



**Figure 53:** Évaluation de l'activité antibactérienne des mélanges de fractions de la souche 32a contre *A. tumefaciens* C58. La couleur blanche indique une activité, la couleur rouge indique l'absence d'activité et le rouge clair correspond à une faible activité

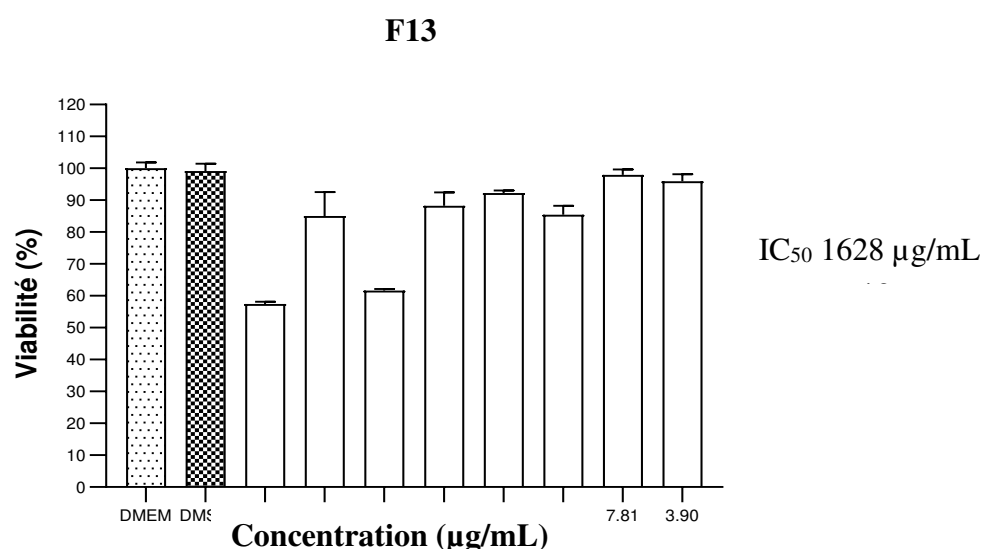
## II. Etude de l'activité cytotoxique de la synergie entre les molécules anti-*Agrobacterium*

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet des molécules présentes dans les fractions actives sur la prolifération de la lignée cellulaire de type Vero. En effet, l'étude de la cytotoxicité des fractions individuelles F9, F11, F13 et des mélanges F11+F13, F9+F11, F9+F11+F13 et F13+F9 est en cours de réalisation au laboratoire BioEcoAgro contre Vero afin de compléter les répétitions biologiques nécessaires. Les résultats présentés dans cette section

correspondent aux premiers résultats obtenus lors de la première répétition technique. Les données de la répétition biologique seront exposées ultérieurement lors de la soutenance.

## II.1 Cytotoxicité de la fraction individuelle F13

Différentes concentrations de la fraction F13 (dans laquelle l'oxydifficidine a été détectée par RP-HPLC-MS) allant de 3,90 à 500  $\mu\text{g/mL}$  ont été testées sur les cellules Vero afin de déterminer leur cytotoxicité. La [figure 54](#) présente l'évolution de la viabilité des cellules en fonction de la concentration de F13 utilisée. Les résultats préliminaires indiquent une diminution de l' $\text{IC}_{50}$  à partir de 500  $\mu\text{g/mL}$  (l'effet à 125  $\mu\text{g/mL}$  étant considéré comme point abérant et devra être retesté). Néanmoins, les pourcentages de viabilité des cellules restent très élevés même à la plus haute concentration testée. Par conséquent, l' $\text{IC}_{50}$  n'a pas pu être encadrée dans ces concentrations.

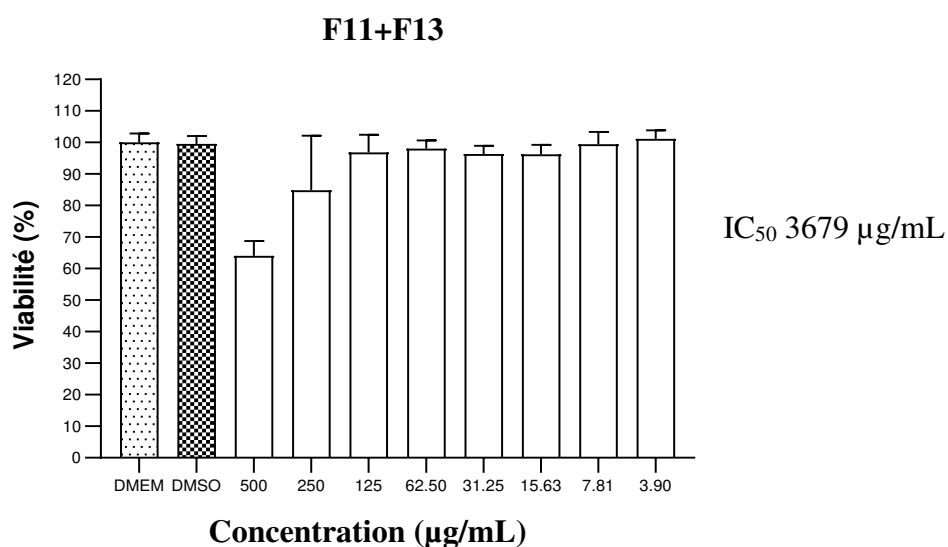


**Figure 54:** Evaluation de l'effet de la fraction F13 sur la viabilité des cellules Vero

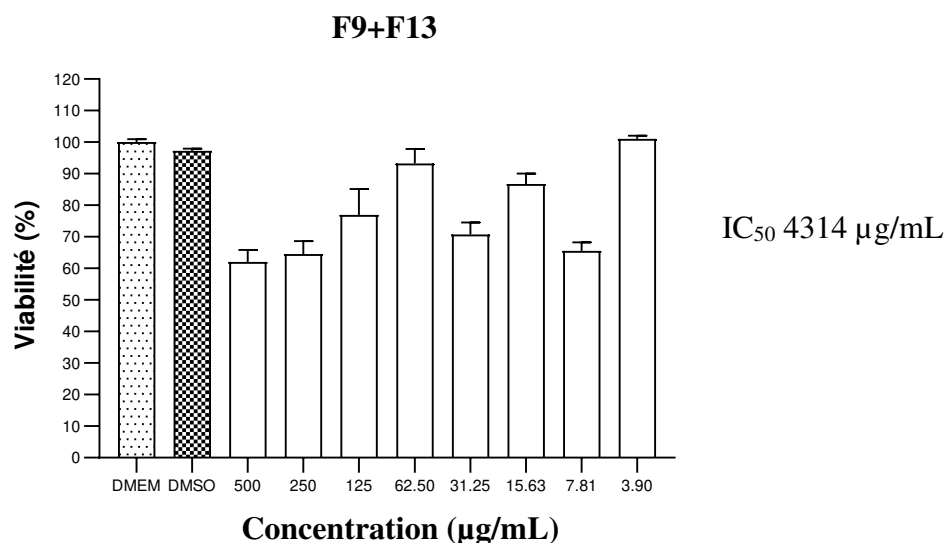
## II.2 Cytotoxicité de la synergie entre les molécules dans les fractions F11+F13, F9+F13 et F9+F11

Des mélanges équimolaires de trois fractions différentes F11+F13, dans lesquelles la macrolactine et l'oxydifficidine ont été détectées, F9+F13, où la bacillibactine et l'oxydifficidine ont été identifiées, et F9+F11, où la bacillibactine et la macrolactine A ont été

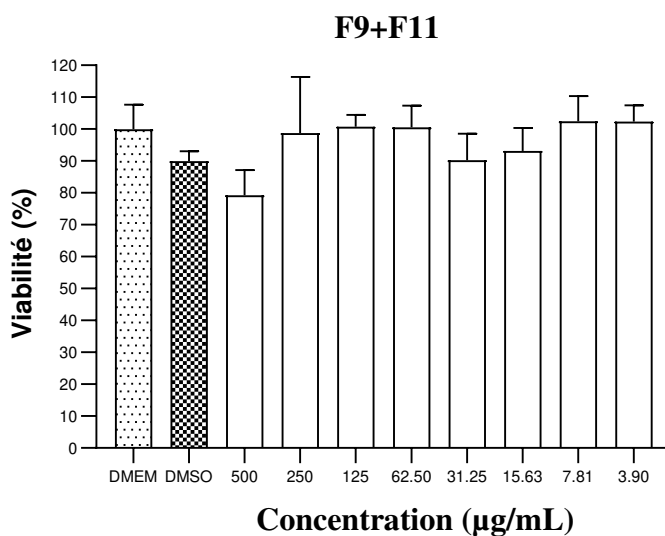
trouvées par RP-HPLC-MS ont été testés sur des cellules Vero pour évaluer leur cytotoxicité. Les concentrations de ces mélanges ont été testées à des doses allant de 3,90 à 500 µg/mL, et les résultats ont montré que l'IC<sub>50</sub> était supérieur à 500 µg/mL, bien que les pourcentages de viabilité cellulaire en fonction des concentrations de F13 étaient de 98 à 90 % à des concentrations allant de 62 à 3,90 µg/mL. L'effet de la synergie entre F11 et F13 présente des pourcentages de viabilité un peu plus importants que l'effet seul de F13 qui était toujours aux alentours de 98 et 100 % au mêmes concentrations. Cela semble démontrer que la cytotoxicité d'un mélange équimolaire entre F13 et F11 provient principalement de la cytotoxicité intrinsèque de F13 (oxydifficidine) (Figure 55).



**Figure 55:** Evaluation de l'effet du mélange des fractions (F11+ F13) sur la viabilité des cellules Vero



**Figure 56:** Evaluation de l'effet du mélange des fractions (F9+ F13) sur la viabilité des cellules Vero



**Figure 57:** Evaluation de l'effet du mélange des fractions (F9+ F11) sur la viabilité des cellules Vero

### III. Discussion

L'évaluation de la cytotoxicité des molécules de biocontrôle est essentielle pour assurer la sécurité de leur utilisation en agriculture. Ces évaluations jouent un rôle clé dans la prise de décisions éclairées concernant l'application de ces molécules, en prenant en considération les risques potentiels pour l'environnement et la santé humaine. D'après les résultats obtenus au cours de ce travail de recherche, deux molécules produites par la souche 32a de *B. velezensis*

ont montré un effet synergique entre la macrolactine A et la difficidine vis-à-vis des souches d'*A. tumefaciens*. De plus, l'implication significative d'un sidérophore, la bacillibactine, dans l'inhibition de ce pathogène a été mise en évidence. En effet, l'objectif principal de ce chapitre est de confirmer l'effet synergique et l'implication de ces trois molécules dans le processus d'antagonisme des souches d'*Agrobacterium*. Puis, nous avons évalué la cytotoxicité de ces molécules anti-*A. tumefaciens* sur les cellules Vero. Pour ce faire, nous avons suivi une série d'étapes méthodique. Tout d'abord, nous avons effectué une ultrafiltration membranaire à 10 KDa sur le surnageant de la souche 32a. Cette étape visait à séparer les lipopeptides du reste des molécules bioactives. Les lipopeptides inactifs ont été retenus dans la partie rétentat tandis que les molécules d'intérêt de petite taille ont été retrouvées dans le filtrat. Ensuite, nous avons procédé à quatre étapes de diafiltration pour continuer à purifier les molécules d'intérêt de petites tailles dans le filtrat. Par la suite, le filtrat a été soumis à un fractionnement par HPLC préparative. Un total de 15 fractions a été collecté et évalué pour leur activité inhibitrice contre *A. tumefaciens*. Parmi ces fractions, seule la fraction F9 a montré un halo d'inhibition bactérien. Une analyse HPLC-MS de cette fraction a révélé la présence de signaux intenses correspondant à la bacillibactine. Ces résultats suggèrent fortement que la bacillibactine joue un rôle significatif dans l'activité inhibitrice observée contre *A. tumefaciens*. Ceci confirme également les conclusions précédentes du test *in vitro* réalisé sur le mutant GA1 de la bacillibactine. De même, une étude a révélé que la privation du fer stimule la production de bacillibactine, ce qui entraîne une augmentation significative de l'activité bactéricide de *B. amyloliquefaciens* MBI600 contre *P. syringae* pv. *tomato* dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. De plus, d'autres recherches ont montré que les souches de *Bacillus* qui synthétisent la bacillibactine ont la capacité de chélater le fer présent dans le sol en formant des complexes stables avec cette molécule. Cette complexation rend le fer non disponible pour d'autres pathogènes tels que *Cephalosporium maydis* (Ghazy & El-Nahrawy, 2021), *Pseudomonas marginalis* (Lyng et al., 2024) et *F. oxysporum* (Yu et al., 2011), ce qui inhibe leur croissance. En comparaison avec les résultats obtenus avec nos différents mutants, l'absence d'activité dans les fractions F11, F12 et F13 pourrait être expliquée par le fait qu'il n'y avait qu'une seule molécule présente dans chaque fraction. Alors que, nos résultats indiquent que les combinaisons des fractions F11+F13 (macrolactine A+oxydifficidine), F9+F12 (bacillibactine+(bacillibactine + macrolactine A)), F9+F13 (bacillibactine+oxydifficidine) et F9+F12+F13 (bacillibactine+(bacillibactine+macrolactine A)+oxydifficidine) étaient les plus efficaces contre *A. tumefaciens* C58. Ces observations confirment la contribution de la synergie entre la

macrolactine A et l'oxydifficidine dans la lutte contre *A. tumefaciens*, comme cela a été noté dans le chapitre précédent avec nos différents mutants. Nos résultats sont en accord avec une autre étude qui a également montré que l'oxydifficidine purifiée présente une activité antibactérienne plus prononcée contre *A. tumefaciens*, avec une CMI de 3,3 µg/mL (**Im et al., 2020**). Il est intéressant de noter que la macrolactine A purifiée a également montré une inhibition de la souche *A. tumefaciens* C58, ce qui renforce l'idée que ces composés ont un potentiel prometteur en tant qu'agents anti-*Agrobacterium* (**Chen et al., 2021**).

Le deuxième objectif de ce chapitre est d'évaluer l'effet cytotoxique de chaque molécule de manière individuelle et d'analyser leur comportement lorsqu'elles agissent en synergie. Pour cela, les fractions F11, F13 et F9 contenant respectivement la macrolactine A, l'oxydifficidine et la bacillibactine ont été testées vis-à-vis des cellules Vero. Le résultat préliminaire montre que les pourcentages de viabilité des cellules étaient très élevés pour les concentrations allant de 3,9 à 500 µg/mL. Par conséquent, l'IC<sub>50</sub> n'a pas pu être encadrée dans ces concentrations. Ce qui suggère que l'IC<sub>50</sub> de ces molécules, qu'elles soient utilisées seules ou en synergie, est supérieure à 500 µg/mL.

Comparativement aux autres familles de lipopeptides, les molécules de l'iturine A et de la mycosubtiline ont une cytotoxicité modérée (IC<sub>50</sub> de 10 à 100 mg/L), tandis que la fengycine et la surfactine ont une cytotoxicité faible (IC<sub>50</sub> supérieure à 100 mg/L) (**Kourmentza et al., 2020**). Les résultats préliminaires indiquent que les molécules de l'oxydifficidine, de la bacillibactine et de la macrolactine A, utilisées seules ou en synergie, ont une IC<sub>50</sub> supérieure à 500 µg/mL. Cela signifie que ces molécules ont une faible cytotoxicité sur les cellules Vero. En plus, par rapport à un additif alimentaire approuvé en agroalimentaire tel que la nisine, qui présente une IC<sub>50</sub> d'environ 150 µg/mL vis-à-vis des cellules Vero (**Kourmentza et al., 2020**), les molécules anti-*Agrobacterium* ont une IC<sub>50</sub> supérieure à 500 µg/mL. Ces résultats suggèrent donc une très faible cytotoxicité de ces molécules. Des études antérieures ont montré que la macrolactine A a une forte capacité d'inhibition envers le virus d'*Herpes simplex* de type I ainsi que de type II, avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 5,0 µg/mL et 8,3 µg/mL, respectivement. Dans la même étude, les résultats de la comparaison de sa cytotoxicité sur les lignées cellulaires Hep-2 (lignée tumorale de cellules épithéliales humaines) et MA-104 ont montré une plage potentielle d'index thérapeutique de 10 à 100 (**Gustafson et al., 1989**). De plus, des études ont révélé que les molécules de 7-O-malonyl-macrolactine A et de 7-O-succinyl-macrolactine A présentaient une toxicité réduite sur les cellules épithéliales humaines HeLa et les fibroblastes de souris

L929 par rapport à la macrolactine A. En particulier, la 7-O-malonyl-macrolactine A a partiellement inhibé la prolifération des cellules HeLa à une concentration de 31,25 µg/mL et totalement à 62,5 µg/mL (**Romero-Tabarez et al., 2006**).

# *Conclusion générale et perspectives*



Les bactéries pathogènes des plantes provoquent plus de 1 milliard de dollars de pertes chaque année dans la chaîne de production alimentaire. *A. tumefaciens* occupe la troisième position des bactéries phytopathogènes en fonction de leur pathogénicité, leur impact économique et leur aspect moléculaire pour la transformation des plantes. Elle provoque la maladie de la galle du collet chez de nombreuses espèces d'importance agricole et économique, telles que la plupart des dicotylédones, certains monocotylédones et certains gymnospermes (un peu plus de 600 espèces réparties en 93 familles). Une fois que la plante est infectée par *A. tumefaciens*, la lutte curative contre la maladie devient extrêmement difficile, car même en l'absence de la bactérie, la croissance de la tumeur continue à progresser. Par conséquent, la lutte contre *A. tumefaciens* est un domaine de recherche en évolution, et de nouvelles stratégies de prévention et de lutte biologique peuvent être développées pour gérer efficacement la maladie de la galle du collet et réduire les restrictions liées à l'utilisation de souches OGM. Les représentants du genre *Bacillus* sont considérés comme des PGPR et sont connus pour leur capacité à contrôler les maladies des plantes. Ils produisent une vaste gamme de métabolites secondaires biologiquement actifs y compris les lipopeptides (surfactine, fengycine, et iturine), les polykétides (difficidine, macrolactine et bacilleane) et la bacilysine.

Dans une étude précédente, la souche 32a de *B. velezensis* a été isolée et identifiée comme étant une souche de biocontrôle efficace contre les souches phytopathogènes *A. tumefaciens* C58 et B6. C'est dans ce cadre que la valorisation des métabolites de la souche de *B. velezensis* 32a a été proposée pour le développement d'un nouveau biobactéricide contre la galle du collet.

### ***B. velezensis* 32a, une souche productrice de nombreux métabolites bioactifs**

Dans une première partie du travail, une analyse biochimique par RP-HPLC-MS a été effectuée à partir du surnageant de culture de la souche 32a dans le but de décrypter son contenu en métabolites secondaires. En effet, la souche 32a de *B. velezensis* produit diverses isoformes de lipopeptides cycliques, incluant des surfactines (C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub> et C<sub>15</sub>), la fengycine (A: C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>18</sub> ou B: C<sub>16</sub> et B: C<sub>15</sub>), des iturines (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>17</sub>), ainsi que de la bacillibactine. Toutefois, en utilisant la RP-HPLC-MS, la masse molaire seule ne nous a pas permis d'identifier avec précision le composé iturinique produit par la 32a, étant donné que la mycosubtiline est structurellement identique à l'iturine. Par ailleurs, au regard des masses obtenues pour les iturines, nous avons émis l'hypothèse que la souche pouvait produire également de la bacillomycine D. Par conséquent, une spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a été

réalisée, et les résultats obtenus ont confirmé que le lipopeptide iturinique présent dans le surnageant de 32a était de l'iturine A. De plus, trois types différents de polykétides ont été identifiés, à savoir quatre formes de macrolactine (macrolactine A, macrolactine D, 7-O-malonyl-macrolactine A, 7-O-succinyl-macrolactine A), deux formes de bacillaène (A et B), ainsi que la bacilysine et son dérivé chloré. Ainsi, la souche 32a pourrait être répertoriée parmi les souches de *Bacillus* les plus rares qui coproduisent à la fois la bacilysine et la chlorotétaine. Afin de déterminer quels métabolites spécifiques produits par la souche 32a jouent un rôle dans l'activité antagoniste, des tests ont été effectués en utilisant trois familles de lipopeptides purs de *B. subtilis* ainsi que différents mélanges de ces composés contre les souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6. En effet, en se basant sur la méthode de diffusion à partir d'un puits, l'évaluation qualitative du pouvoir antagoniste des lipopeptides purifiés a montré que ces composés seuls ou en synergie n'ont pas d'effet sur les souches d'*A. tumefaciens* à 100 mg/L. Concernant l'évaluation quantitative par la méthode de microdilution en série, les résultats obtenus montrent que les lipopeptides n'étaient efficaces qu'à des concentrations relativement élevées de 1000 mg/L, ce qui ne qualifie pas cette activité comme antibactérienne, mais plutôt comme un effet surfactant/détergent sur les membranes bactériennes. Ces résultats indiquent que les lipopeptides ne sont probablement pas à l'origine de l'activité anti-*A. tumefaciens*, car leur efficacité n'a été constatée qu'à des concentrations relativement élevées. Cela suggère que les polykétides et la bacilysine ou d'autres molécules devraient être plus profondément explorés afin d'évaluer leur possible contribution dans l'antagonisme envers *A. tumefaciens*.

### **Macrolactine, difficidine et bacillibactine trois métabolites actifs contre *A. tumefaciens***

Dans le deuxième chapitre, afin de déchiffrer la contribution des polykétides et de la bacilysine dans l'antagonisme et le biocontrôle de la maladie de la galle du collet, des souches mutantes de trois polykétides (macrolactines (Bvm), bacillaène (Bvbe), difficidine (Bvd) et de la bacilysine (Bvbc) ont été générées. Pour cela, des vecteurs recombinants des différentes molécules ont été préparés. Ces vecteurs ont été utilisés pour transformer la souche 32a par une double recombinaison homologue en interrompant à chaque fois la production de l'une de ces molécules par l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine. Sachant que la souche de *B. velezensis* 32a s'est avérée extrêmement difficile à l'incorporation d'ADN exogène, trois protocoles différents d'électro-transformation (Electro-transformation selon **Cao et al. (2011)** ; électro-transformation selon **Zhang et al. (2011)**; transformation suivant un protocole

d'*Enterococcus faecalis* optimisé au laboratoire BioEcoAgro) et l'utilisation des protoplastes ont été investigués. Après plusieurs tentatives infructueuses d'essais de transformation, nous avons réussi à construire des mutants de *B. velezensis* 32a présentant des interruptions sélectives des gènes responsables de la production des polykétides et de la bacilysine en utilisant le protocole de compétence naturelle induite par la limitation en azote. Les mutants obtenus ont été comparés par rapport à la souche sauvage 32a pour leurs activités *in vitro* vis-à-vis des souches C58 et B6 d'*A. tumefaciens*. Le mutant  $\Delta dfnD$  de 32a, déficient en difficidine, était totalement incapable de contrôler la croissance d'*A. tumefaciens* C58 et B6. Parmi les trois autres mutants, seul  $\Delta mlnA$  a montré une légère diminution de l'activité. Ces résultats indiquent que la difficidine est le composé le plus impliqué dans l'antagonisme contre C58 et B6, tandis que les macrolactines peuvent également jouer un rôle essentiel. Par la suite, pour approfondir l'étude de l'interaction entre les composés, une comparaison a été effectuée entre les mutants de 32a et 17 mutants issus d'une souche similaire *B. velezensis* GA1, fournie par l'unité BioEcoAgro en Belgique. Comme observé avec le mutant de la souche 32a, un mutant de GA1 dépourvu de la synthèse de la difficidine provoque la perte totale de l'activité, confirmant ainsi le rôle crucial de ce métabolite dans la suppression d'*A. tumefaciens*. Cependant, un mutant déficient dans la production des macrolactines et des bacillaènes était incapable de supprimer la croissance d'*A. tumefaciens* malgré la production de la difficidine. Cette constatation indique probablement un effet synergique de la difficidine avec les macrolactines ou les bacillaènes. Par conséquent, une souche mutante doublement déficiente en macrolactines et en bacilysine a été utilisée. Les résultats obtenus ont montré que ce mutant ( $\Delta bacA$ ,  $\Delta mlnA$ ) et ses composés (difficidine, bacillaènes et lipopeptides) n'inhibaient pas les souches d'*A. tumefaciens*. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'un effet synergique entre la difficidine et les macrolactines plutôt qu'entre la difficidine et les bacillaènes dans l'inhibition d'*A. tumefaciens*. De même, les résultats montrent que le mutant déficient en bacillibactine a considérablement réduit l'activité antibactérienne contre les souches d'*A. tumefaciens*, suggérant que la bacillibactine pourrait potentiellement aider à inhiber le pathogène cible. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des surnageants de GA1 et de ses différents mutants ont été évaluées contre les souches bactériennes cibles. Selon les résultats obtenus, *A. tumefaciens* C58 s'est révélé significativement plus sensible à la majorité des mutants de GA1 par rapport à la souche B6.

### **Macrolactine, difficidine et bacillibactine trois métabolites peu cytotoxiques agissant en synergie contre *A. tumefaciens***

Dans le dernier chapitre, notre intérêt s'est tout d'abord porté sur l'étude de la synergie de ces molécules actives ayant une activité anti-*A. tumefaciens*. Puis nous avons également commencé à investiguer leur cytotoxicité sur les cellules rénales du singe vert africain (Vero). Pour ce faire, dans un premier temps, la purification des composés actifs de 32a contre *A. tumefaciens* a été réalisée en suivant des étapes d'ultrafiltration, de diafiltration et de fractionnement par HPLC préparative. Ensuite, les 15 fractions collectées ont été testées contre le pathogène cible en milieu solide par la méthode des puits. L'évaluation du pouvoir antagoniste des fractions purifiées a montré que seule la F9 (à 1 g/L) a présenté une activité contre *A. tumefaciens*, alors que le test d'activité des autres fractions seules n'a pas révélé d'activité anti-*A. tumefaciens*. Cependant, le mélange des fractions F11+F13 (à 0,8+0,8 g/L), F9+F11 (à 0,8+0,8 g/L), F9+F11+F13 (à 0,5+0,5+0,5 g/L) et F13+F9 (à 0,8+0,8 g/L) a montré une activité inhibitrice d'*A. tumefaciens*. L'analyse des fractions F9, F11 et F13 par RP-HPLC-MS permet de conclure que ces fractions sont respectivement constituées de bacillibactine, de macrolactine A et d'oxydifficidine. Par conséquent, ces observations confirment l'effet synergique entre la macrolactine A et l'oxydifficidine, tel que prouvé précédemment dans ce travail, ainsi que l'implication significative de la bacillibactine dans l'antagonisme contre *A. tumefaciens*. L'étude de la cytotoxicité des fractions individuelles F9, F11, F13 et des mélanges F11+F13, F9+F11, F9+F11+F13 et F13+F9 est en cours de réalisation contre la lignée cellulaire Vero. Les premiers résultats qui restent à confirmer montrent une très faible cytotoxicité de ces molécules ou de leurs mélanges avec des IC<sub>50</sub> supérieures à 500 mg/L.

En conclusion, ce projet de thèse a proposé une étude approfondie sur l'implication spécifique des métabolites secondaires produits par la souche 32a de *B. velezensis* dans l'inhibition *in vitro* des souches d'*A. tumefaciens*, responsables de la maladie de la galle du collet. Il a mis en lumière d'importantes synergies entre les molécules de type PKS et l'inefficacité des molécules de type NRPS. Des perspectives restent à explorer pour approfondir la recherche et exploiter les résultats obtenus en vue de développer un nouveau produit biobactéricide destiné à contrôler cette maladie dévastatrice et à en tirer profit dans diverses applications agricoles. En effet, l'évaluation de la cytotoxicité à des quantités plus élevées des molécules d'intérêt (la macrolactine A, l'oxydifficidine et la bacillibactine) restent à déterminer. Selon les résultats préliminaires du troisième chapitre, l'IC<sub>50</sub> n'a pas été déterminée dans les

concentrations testées. Étant donné que la quantité de fractions actives obtenue après purification par HPLC préparative n'a pas été suffisante, il sera nécessaire de réaliser d'autres expériences de purification afin d'évaluer la cytotoxicité à des concentrations plus élevées.

Ensuite, la validation de l'efficacité de biocontrôle des métabolites d'intérêt *in vivo* doit être entreprise. Malgré les résultats prometteurs obtenus dans une étude antérieure, où l'utilisation de la souche 32a a significativement réduit l'incidence de la maladie de la galle du collet sur des disques de carottes ainsi que sur des plantes de tomate, il serait pertinent d'envisager des tests *in vivo* sur les mêmes modèles de plantes. Ces essais permettraient d'explorer l'efficacité des molécules de macrolactine, d'oxydifficine et de bacillibactine à réduire voire à inhiber la formation de biofilm d'*Agrobacterium* ainsi que l'incidence de la maladie. De plus, le test de la combinaison molécules-souche sauvage pourrait améliorer l'efficacité du biocontrôle. Ces molécules pourraient également être étudiées pour leur efficacité contre d'autres types de bactéries phytopathogènes, telles que *Xylella*, *Erwinia*, et bien d'autres encore.

Par ailleurs, le développement d'une nouvelle solution de biocontrôle passe nécessairement par des étapes d'optimisation de la production et de la purification afin de rendre réaliste l'exploitation future de cette solution. L'étude de l'amélioration de la production de ces métabolites d'intérêt par génie génétique et par génie fermentaire semble donc indispensable. Les résultats obtenus suggèrent la possibilité de construire d'autres mutants en utilisant la technique récente de Crispr-Cas9 pour faciliter la manipulation génétique de la souche 32a de *B. velezensis*. Ces mutations viseraient à induire la surproduction de molécules cibles en modifiant la région promotrice de certains gènes. Le séquençage génomique de la souche serait un ajout précieux pour compléter les résultats biochimiques obtenus par RP-HPLC-MS et améliorer les stratégies de génie génétique. De plus, une amélioration de la production des molécules d'intérêt par génie fermentaire pourrait être envisageable en utilisant des milieux synthétiques afin de sélectionner les conditions optimales de production des métabolites d'intérêt. En outre, l'optimisation d'un milieu complexe pourrait être une solution écologique, en utilisant des coproduits comme substrats nutritifs, tels que les déchets de taille, la margine, le compost, dans le but de réduire les coûts de production élevés.

La confirmation de l'efficacité de ces molécules en plein champ pour valider leur efficacité dans les conditions climatiques naturelles (aride, tempérée) est nécessaire. Cela

permettrait de simuler les conditions réelles dans lesquelles les molécules seront utilisées, prenant en compte des facteurs tels que la variabilité des températures, l'humidité et les différents types de sols.

Une fois l'efficacité de ces molécules confirmée dans les conditions naturelles, une étape d'homologation sera nécessaire pour étudier la compatibilité des molécules actives avec la faune utile et les plantes hôtes. Cette étude vise à déterminer si les molécules actives citées présentent un risque pour les organismes bénéfiques tels que les microorganismes du sol, les prédateurs naturels des ravageurs, ainsi que les plantes non-cibles. Ces essais permettraient d'évaluer leur potentiel d'utilisation pratique dans la lutte contre la maladie de la galle du collet.

# *Valorisation des résultats et formations doctorale*

## Valorisation des résultats

### Publications

- ARTICLE N°1 : Sarra Yousfi, François Krier, Barbara Deracinois, Sébastien Steels, François Coutte, Olfa Frikha-Gargouri (2024). Characterization of *Bacillus velezensis* 32a metabolites and their synergistic bioactivity against crown gall disease (IF2023= 6,7) (DOI : 10.1016/j.micres.2023.127569).
- ARTICLE N°2 intitulé : « Purification of anti-*Agrobacterium* metabolites from *Bacillus velezensis* 32a and study of their cytotoxicity against Vero cell line » qui est en cours de rédaction.

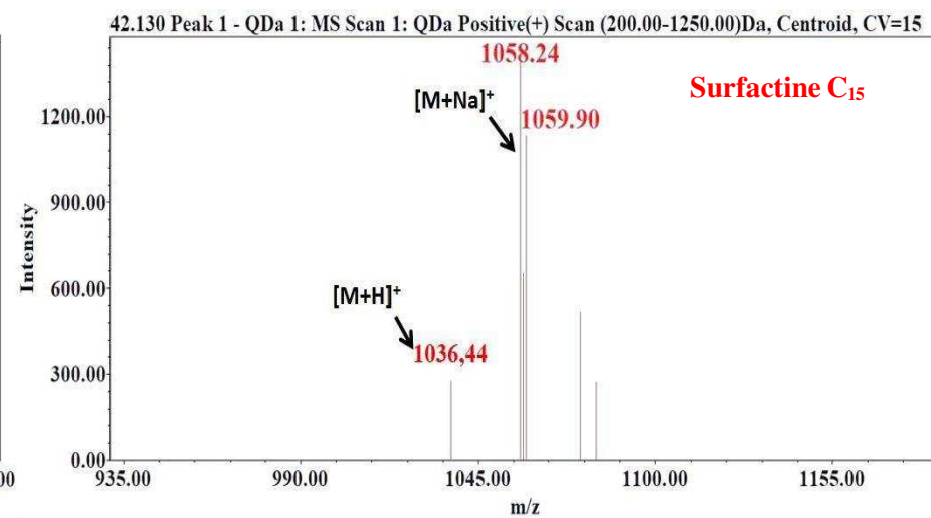
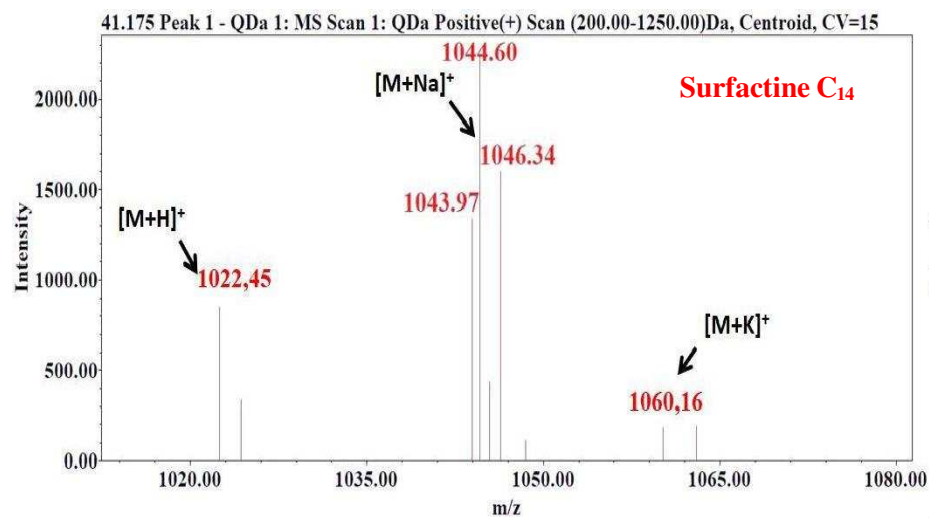
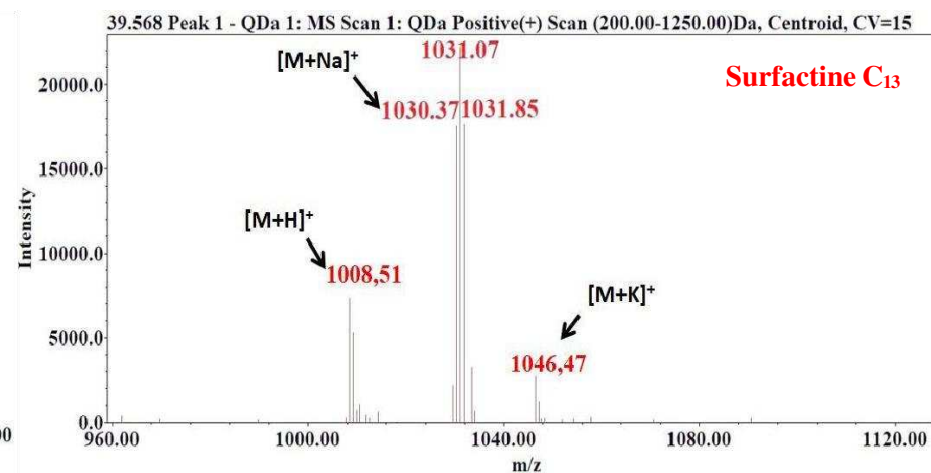
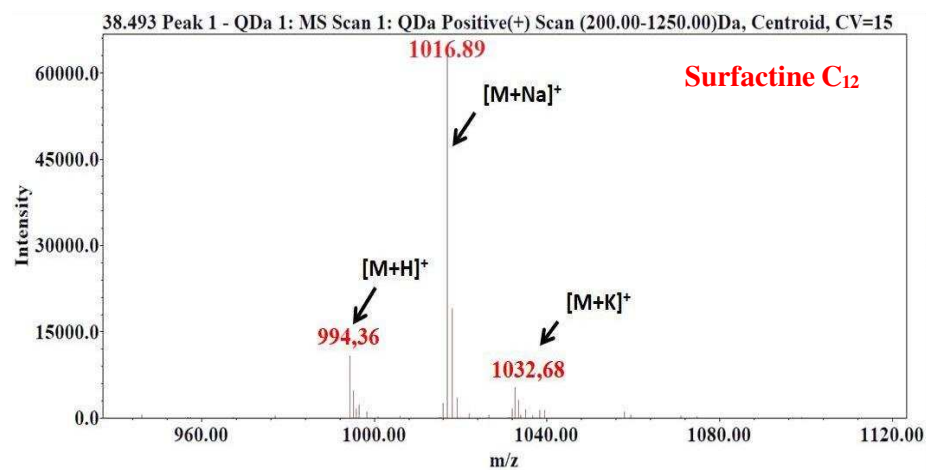
### Communications

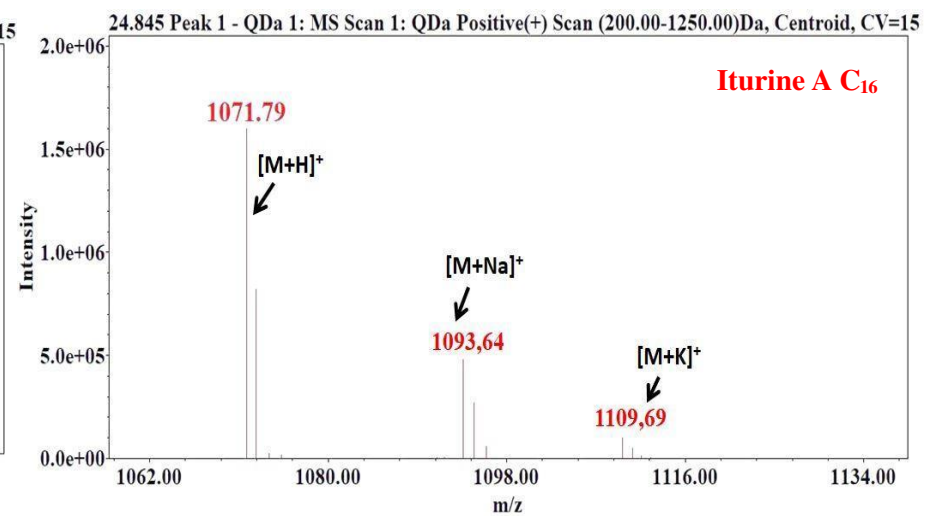
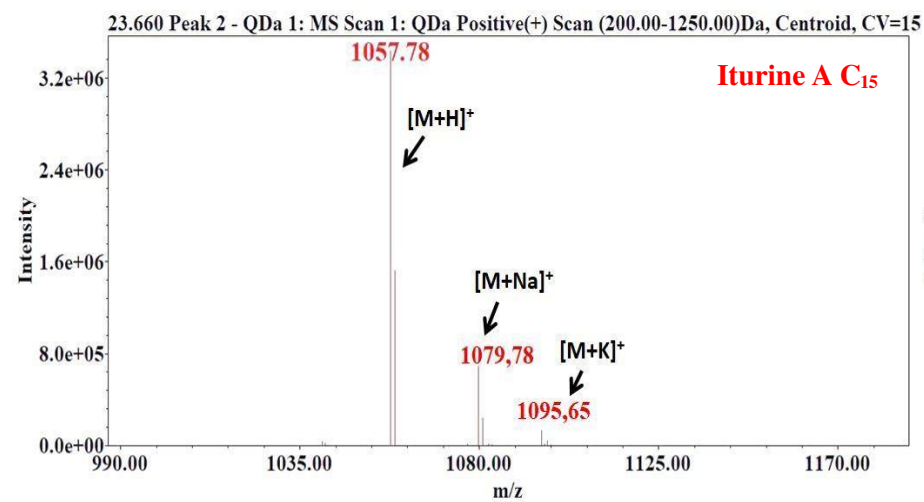
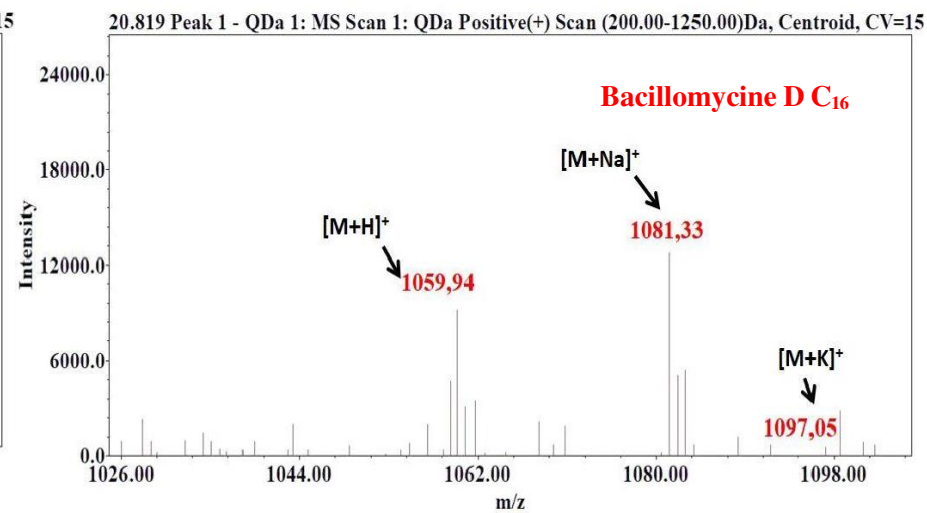
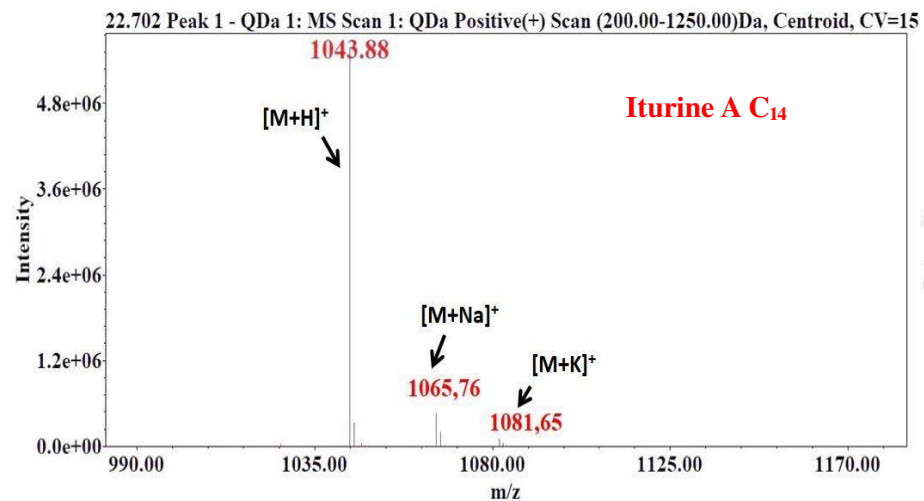
- Communication orale en anglais intitulée : « Difficidin and Macrolactin, two polyketides produced by *Bacillus velezensis* acting synergistically to biocontrol crown gall disease » François Coutte, Sarra Yousfi, François Krier, Olfa Frikha-Gargouri au congrès international Plant BioProTech du 17 au 20 juin 2024 à Castellon de la Plana, Espagne.
- Communication orale en anglais intitulée : « *Bacillus velezensis* 32a: A treasure trove of secondary metabolites and their synergistic bioactivity against crown gall disease » Sarra Yousfi, François Krier, Barbara Deracinois, Sébastien Steels, François Coutte, Olfa Frikha-Gargouri au 21<sup>th</sup> International Days of Biotechnology du 18 au 21 décembre 2023 à Mahdia-Tunisie.
- Communication orale en anglais intitulée « Identification and evaluation of bioactive compounds produced by *Bacillus velezensis* 32a towards *Agrobacterium tumefaciens* strains » Sarra Yousfi, François Krier, François Coutte, Olfa Frikha Gargouri au 20<sup>th</sup> International Days of Biotechnology du 19 au 22 décembre 2022 à Hammamet-Tunisie.
- Communication d'un poster intitulé « Bioactive metabolites from *Bacillus velezensis* 32a and their potential management of crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* strains » Sarra Yousfi, François Krier, Olfa Frikha Gargouri and François Coutte au congrès international Plant BioProTech du 28 Juin au 1 juillet 2022 à Reims-France.

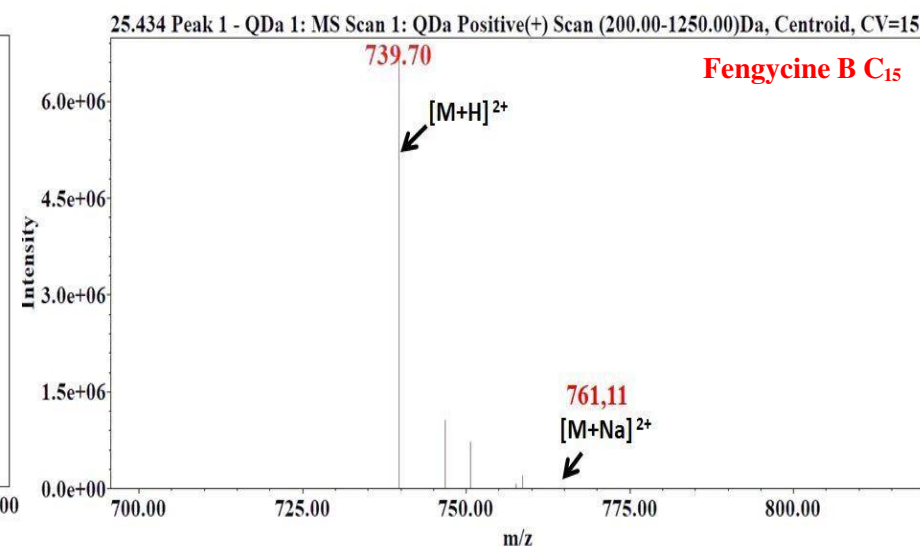
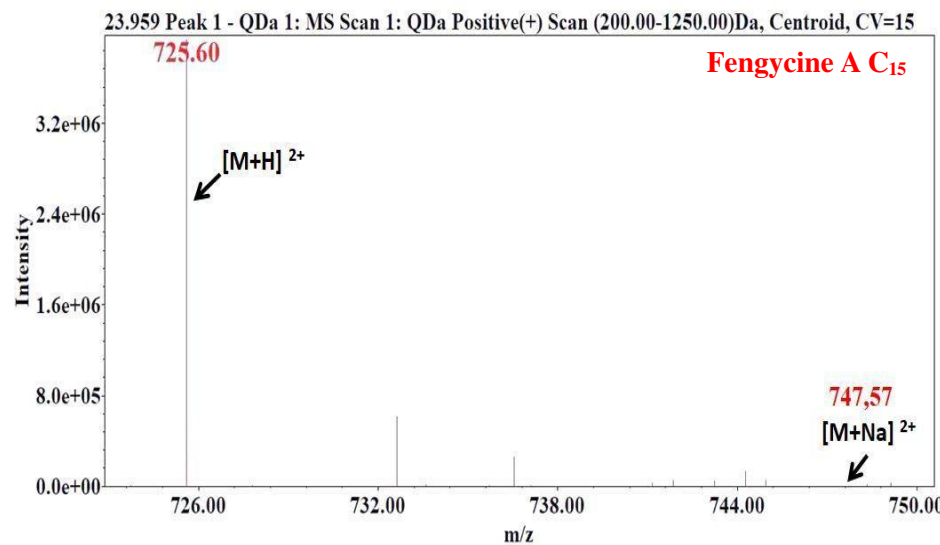
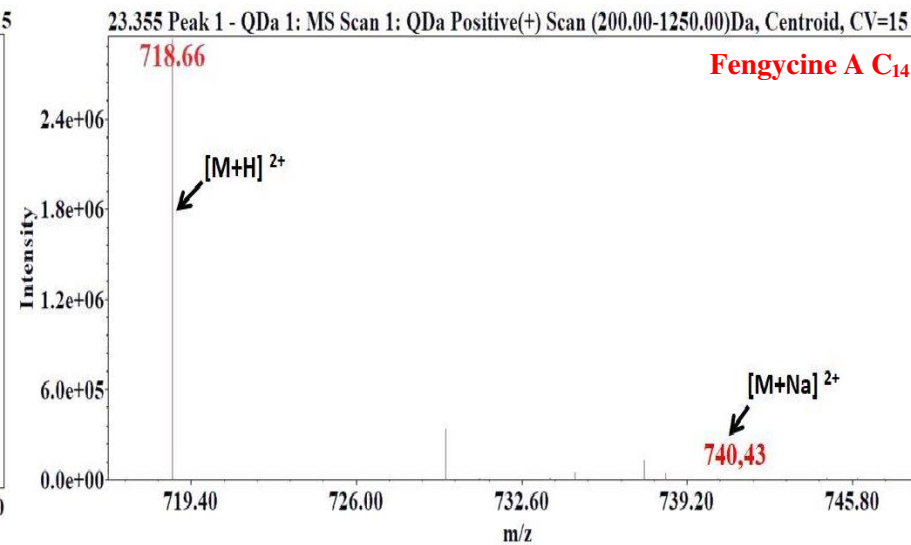
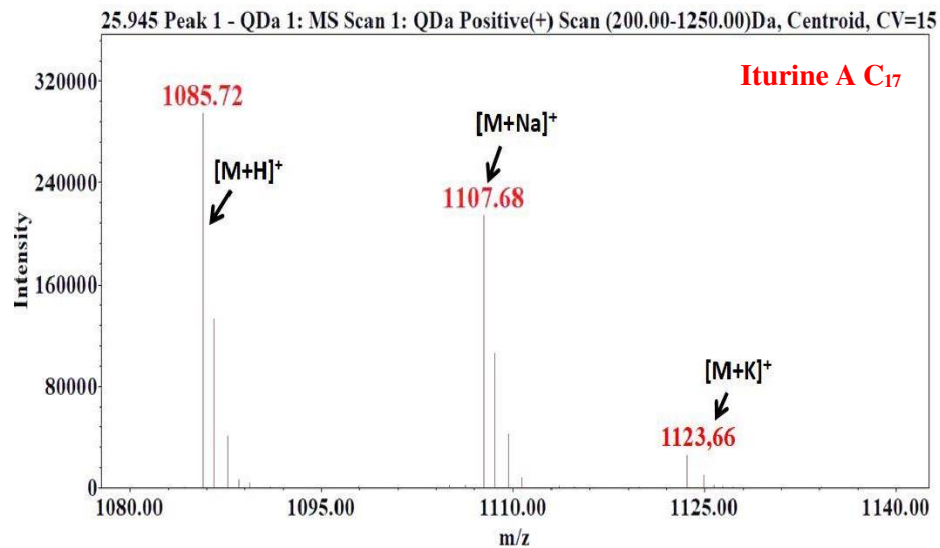
### Formations doctorales

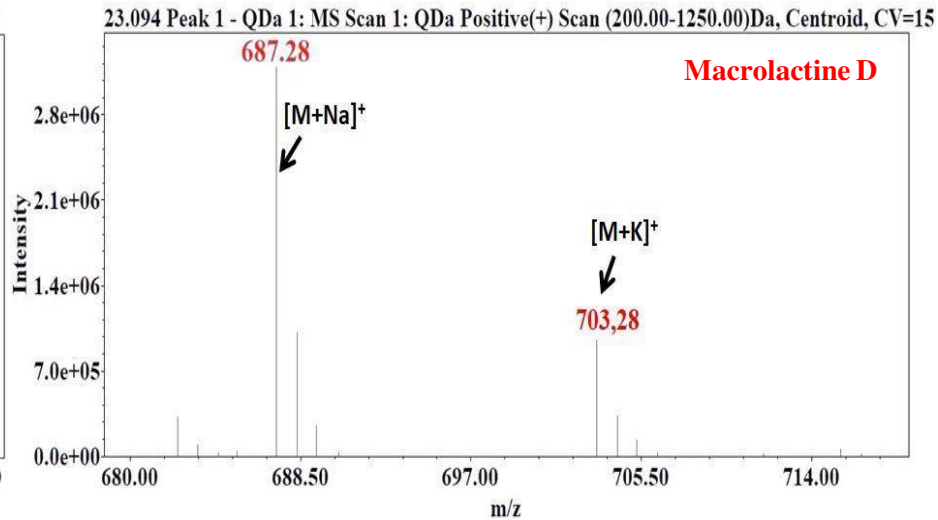
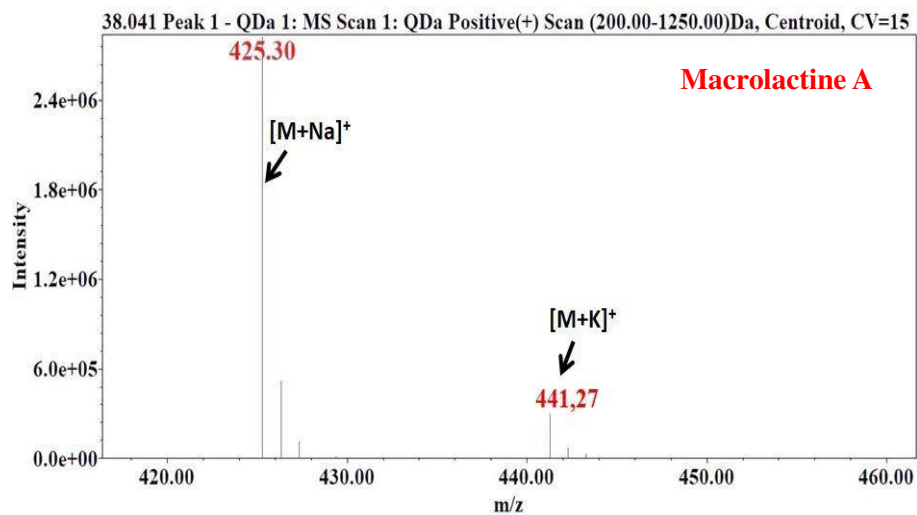
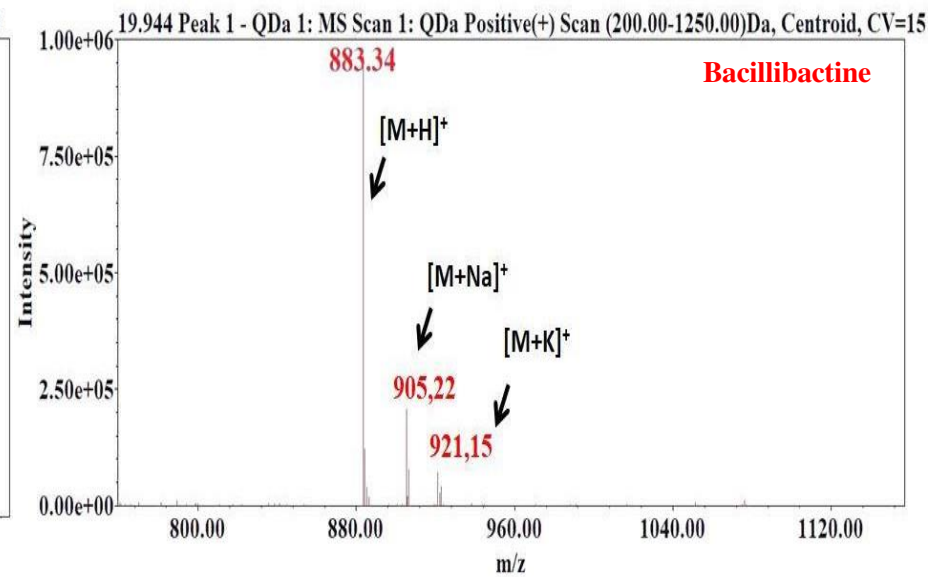
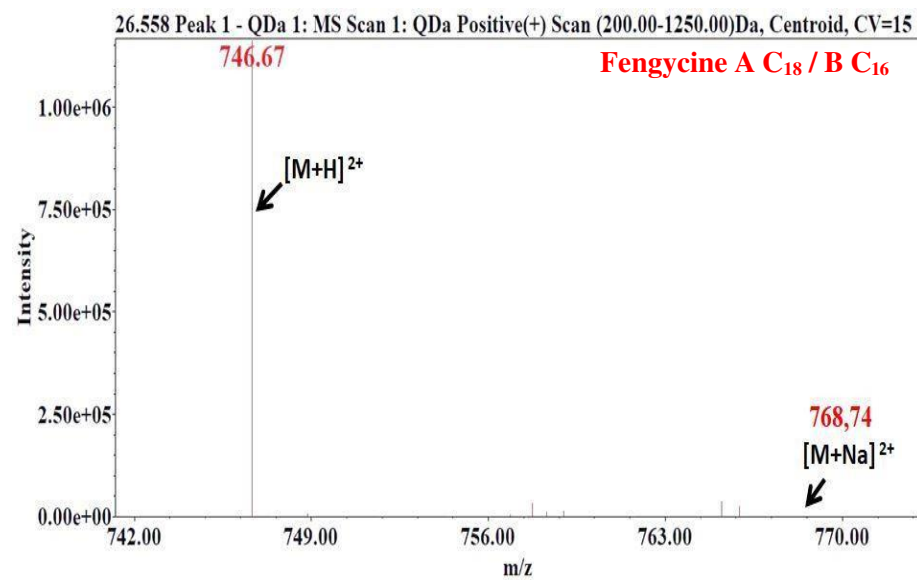
- Formation en Jeunes chercheurs, initiez-vous à l'entreprise du 15 au 17 mai 2023: Campus Flers-Château-Université de Lille, France.
- Formation théorique et pratique en “Plant-beneficial function prediction of *Bacillus subtilis* species through NGS technology ” financé par le centre international de génie génétique et de biotechnologie (ICGEB) qui s’est tenue du 6 au 13 novembre 2022: Laboratoire des Biopesticides du centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie.
- Formation CPF Linguistique en Français du 25 février 2022 au 10 juin 2022: Campus cité scientifique-Villeneuve d’Ascq-Lille, France.
- Formation en éthique de la recherche et intégrité scientifique du 14 février 2022 au 19 avril 2022 : cours en ligne, MOOC.
- Formation: Langage de programmation Python du 04 février 2022 au 06 février 2022: Tunisie
- Formation: Gestion bibliographique avec Zotero le 7 mars 2022: EDSMRE-Université de Lille, France.
- Formation: Bio-informatique: Algorithmes de recherche et Optimisation, Analyse des séquences biologiques complexes, Modélisation et simulation *in silico*, Analyse des séquences par les scripts Python/Bio python, Alignement et Motif Search par Clustal Omega et FASTA/BLAST, Modélisation 3D par Prosite et Molecular Docking du 10 au 13 Janvier 2022: Tunisie.
- Formation en microbiologie Industrielle (fermentation) du 10 janvier au 11 janvier 2022, Villeneuve d’Ascq-Lille, France.
- Formation: Logiciel SPSS: Analyse des données appliquées à la médecine et à la biologie du 12 au 14 novembre 2021: Tunisie.
- Formation: Anglais de Communication du 15 au 18 aout 2021: Tunisie.
- Formation: Anglais: Rédaction d’article du 7 au 10 juillet 2021: Tunisie.

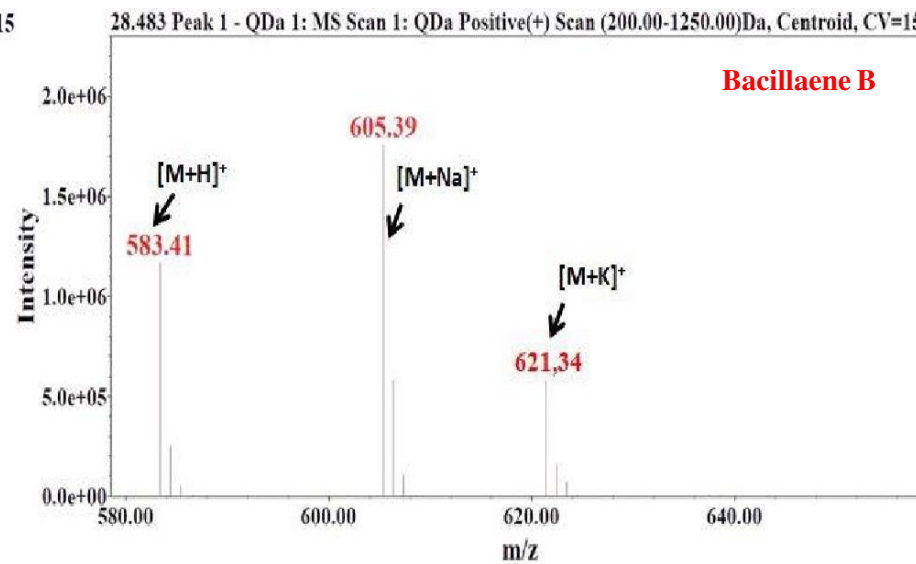
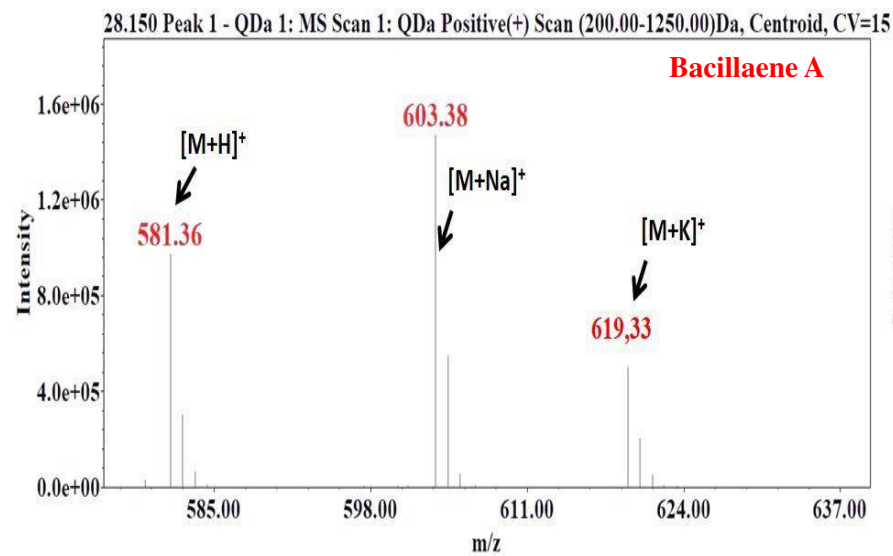
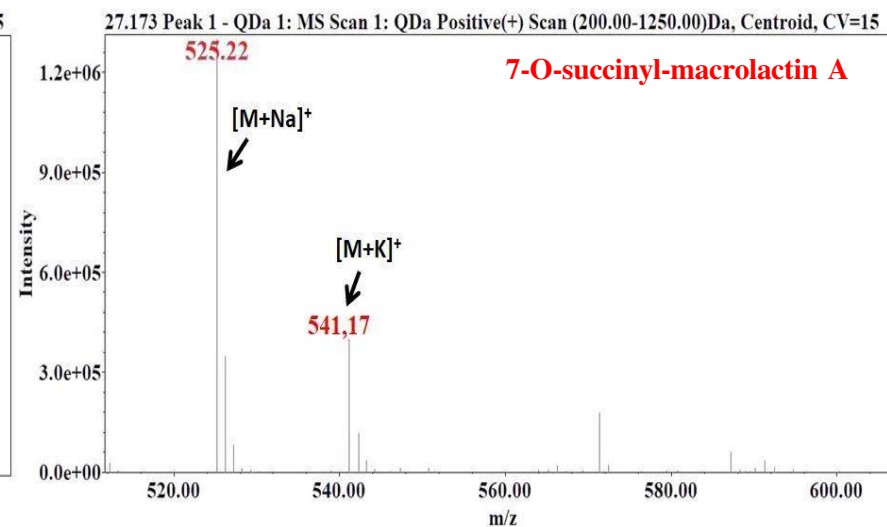
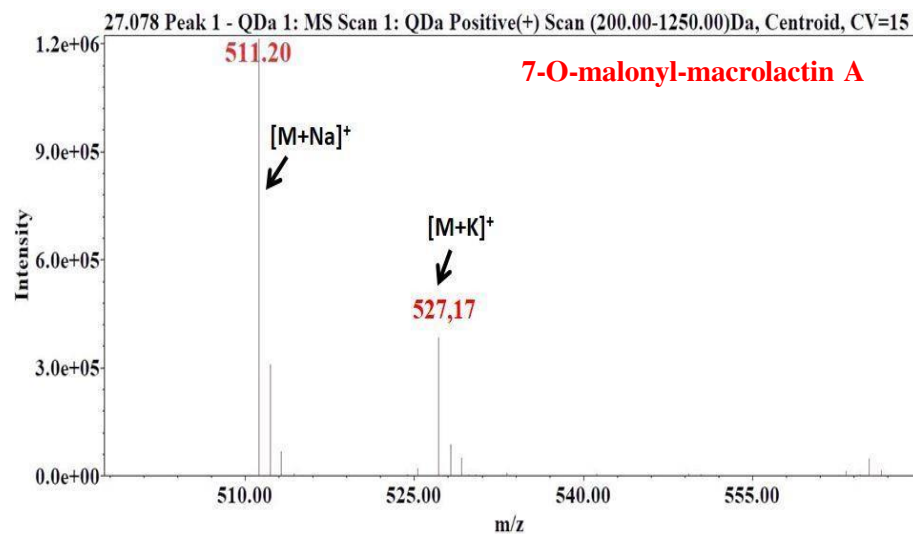
**Annexe 1 :** Analyse RP-HPLC-MS et identification des lipopeptides, polykétides, bacilysine et chlorotétaine dans le surnageant de culture de la souche 32a de *B. velezensis* après 72 heures de croissance en milieu Landy.

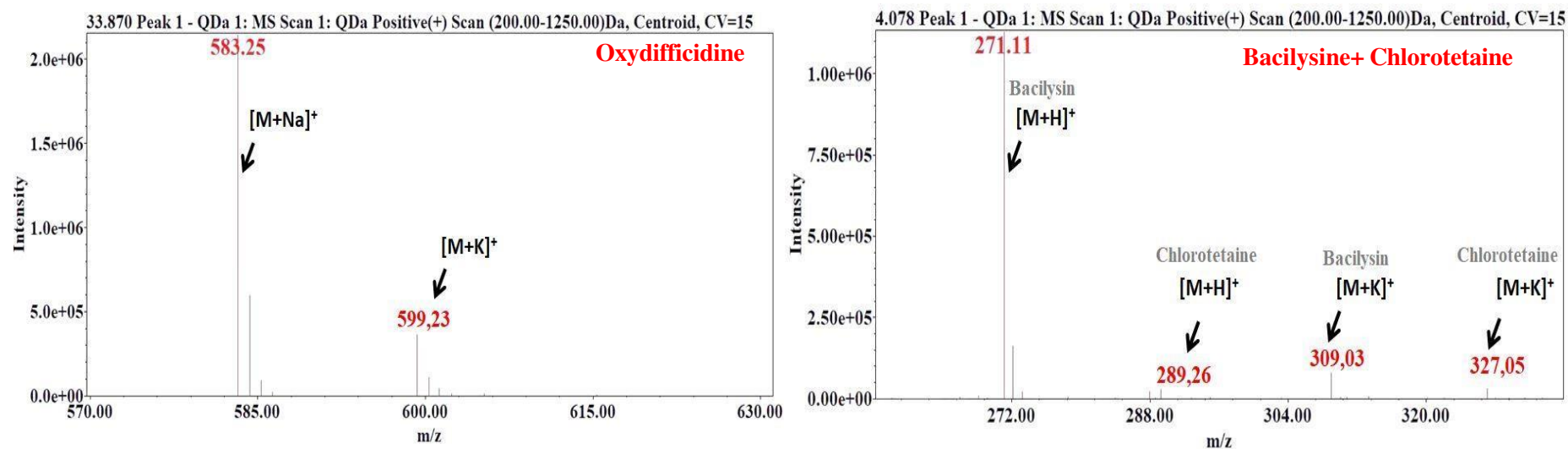












**Annexe 1:** Analyse RP-HPLC-MS et identification des lipopeptides, polykétides, bacilysine et chlorotétaine dans le surnageant de culture de la souche 32a de *B. velezensis* après 72 heures de croissance en milieu Landy. Tous les spectres de masse ont été enregistrés en mode ion positif (m/z représentant le rapport masse/charge).





# Characterization of *Bacillus velezensis* 32a metabolites and their synergistic bioactivity against crown gall disease

Sarra Yousfi<sup>a,b</sup>, François Krier<sup>b</sup>, Barbara Deracinois<sup>b</sup>, Sébastien Steels<sup>c</sup>, François Coutte<sup>b,\*</sup>,<sup>1</sup>, Olfa Frikha-Gargouri<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biopesticides, Center of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia

<sup>b</sup> Université de Lille, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Equipe Métabolites Secondaires d'Origine Microbienne, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

<sup>c</sup> Université de Liège, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, équipe Métabolites Secondaires d'Origine Microbienne, TERRA Teaching and Research Centre, Gembloux Agro-Bio Tech, B-5030 Gembloux, Belgium

## ARTICLE INFO

### Keywords:

*Bacillus velezensis*  
*Agrobacterium tumefaciens*  
Lipopeptides  
Polyketides  
Oxydifficidin  
Macrolactin

## ABSTRACT

Crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* is considered to be the main bacterial threat of stone fruit plants in Mediterranean countries. In a previous study, *Bacillus velezensis* strain 32a was isolated from Tunisian rhizosphere soil and revealed high antagonistic potential against *A. tumefaciens* strains. In order to better characterize the antagonistic activity of this strain against this important plant pathogen, the production of secondary metabolites was analyzed using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The results revealed the production of different compounds identified as surfactins, fengycins, iturins and bacillibactin belonging to the lipopeptide group, three polyketides (macrolactins, oxydifficidin and bacillaenes), bacilysin and its chlorinated derivative; chlorotetaine. The involvement of lipopeptides in this antagonistic activity was ruled out by performing agar and broth dilution tests with pure molecules. Thus, the construction of *B. velezensis* 32a mutants defective in polyketides and bacilysin biosynthesis and their antagonistic activity was performed and compared to a set of derivative mutants of a comparable strain, *B. velezensis* GA1. The defective difficidin mutants ( $\Delta dfnA$  and  $\Delta dfnD$ ) were unable to inhibit the growth of *A. tumefaciens*, indicating the high-level contribution of difficidin in the antagonism process. While the macrolactin deficient mutant ( $\Delta mlnA$ ) slightly decreased the activity, suggesting a synergetic effect with difficidin. Remarkably, the mutant  $\Delta dhbC$  only deficient in bacillibactin production showed significant reduction in its capacity to inhibit the growth of *Agrobacterium*. Taken collectively, our results showed the strong synergetic effect of difficidin and macrolactins and the significant implication of siderophore to manage crown gall disease.

## 1. Introduction

Currently, the global food security is under pressure across the incredibly high rate of population growth that requires more food than has ever been produced in Human history. To face the requirements of a projected 10 billion population by 2050, food production will need to increase by 60% according to the FAO (Fedoroff, 2015; FAO, 2019). However, plant diseases significantly decrease agricultural yields, leading to a 40% reduction in global food crop production annually (FAO, 2021). Bacterial diseases specifically cause losses of over \$1 billion per year (Kannan and Bastas, 2015).

Particularly, crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*, is considered to be the main pathogen threat of stone fruit plants in Mediterranean countries (Krimi et al., 2002). According to their pathogenicity, their economic impact and their molecular aspect, *A. tumefaciens* ranks third among the most virulent phytopathogenic bacteria (Mansfield et al., 2012). It is an important soil-borne phytopathogenic bacterium with a global distribution that causes tumors on over 600 species of plants (Chandrasekaran et al., 2019). The disease manifests as galls on the lower stem and main roots of the plant. *A. tumefaciens* transfers T-DNA from its Ti plasmid to the host plant genome through plant injury, resulting in uncontrolled synthesis of

\* Corresponding author.

E-mail address: [francois.coutte@polytech-lille.fr](mailto:francois.coutte@polytech-lille.fr) (F. Coutte).

<sup>1</sup> Present address: Université de Lille, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Equipe Métabolites Secondaires d'Origine Microbienne, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127569>

Received 14 October 2023; Received in revised form 22 November 2023; Accepted 6 December 2023

Available online 10 December 2023

0944-5013/© 2023 The Authors.

Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

growth hormones and the formation of galls (Moriya et al., 2021).

Regarding the parasitic growth of *A. tumefaciens* on plants, eradicating the disease become extremely challenging once established in an area. Preventing crown gall is the most effective method of control. Soil fumigation, soil solarization and soil amendments have shown success in certain cases as pre-planting applications to control the spread of the crown gall bacterium (Gupta and Khosla, 2007; Gupta and Kamal, 2011). Chemical eradication of crown gall using the commonly-used copper hydroxide compounds has been ineffective due to the pathogen resistance and its potential phytotoxicity to certain plant species (Agris, 2005). Biological control using the non-pathogenic strain *A. radiobacter* K84 carrying the resistance plasmid pAg84 encoding bacteriocin K84, has been effective in preventing crown gall (Shim, 1987). Nevertheless, resistance can occur through gene transfer to the pathogenic *Agrobacterium* strains. Genetically modified strain K1026 was developed to minimize resistance but faces legal restrictions in certain countries (Jones and Kerr, 1989). Therefore, innovative methods need to be explored to effectively manage crown gall disease and prevent the establishment of *A. tumefaciens*.

To handle plant diseases, biological control agents (BCAs), including specialized microbes or their metabolites, are receiving increasing attention from scientists and farmers. Some species belonging to the *Bacillus* genus are classified as plant growth promoting bacteria (PGPR), and these species have been used as a main source of BCAs to manage soil-borne plant pathogens (Im et al., 2020; Pei et al., 2022).

Notably, different *B. velezensis* isolates such as FZB42, GA1, SQR9, S1 and S6 have received considerable attention due to their richness in biosynthetic gene clusters representing approximately 10% of the whole genome (Arguelles-Arias et al., 2009; Xu et al., 2013; Wu et al., 2015; Fazole Rabbee and Baek, 2020; Platel et al., 2021). Among these genes, *srfA*, *fen* and *itu* operons encode the biosynthesis of non-ribosomal lipopeptides (LPs), namely surfactins, fengycins and iturins, respectively. (Zhang and Sun, 2018). Iturins and surfactins molecules are cyclic lipopeptides with  $\beta$ -amino fatty acid for iturins and  $\beta$ -hydroxy fatty acid for surfactins (Romero et al., 2007; Ongena and Jacques, 2008). The lipodecapeptide fengycin, also known as plipastatin has a  $\beta$ -hydroxy fatty acid on its side chain (Fazole Rabbee and Baek, 2020). LPs are mainly reported for their antifungal activity against plant pathogens. Surfactins are primarily recognized for their synergistic effects when combined with fengycin or mycosubtilin in the fight against *Bremia lactucae* and *Venturia inaequalis* (Maget-Dana et al., 1992; Deraivel et al., 2014; Desmyttere et al., 2019). Fengycins exhibit strong antifungal activity by inhibiting the growth of a large number of plant pathogens, particularly filamentous fungi (Deleu et al., 2008; Gao et al., 2017; Desmyttere et al., 2019; Fan et al., 2017).

Three additional genes, namely *mln*, *bae* and *dfn*, have been identified to direct the synthesis of three polyketides (PKs): macrolactins, bacillaenes and difficidin, respectively, while the *bac* gene guides the synthesis of bacilysin (Chen et al., 2006; Chen et al., 2009).

Macrolactins are a large group of 22- to 25-membered lactone macrolides with various biological activities, which have been originally isolated from an unclassified deep-sea bacterium (Schneider et al., 2007). These molecules have shown biocontrol activity against *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *A. tumefaciens* and *Ralstonia solanacearum* (Sopheareth et al., 2013; Salazar et al., 2020; Chen et al., 2021; Sui et al., 2022). Bacillaene, classified as a polyene antibiotic has a linear structure consisting of a conjugated hexaene chain. It exerts bacteriostatic effect on prokaryotic protein synthesis (Patel et al., 1995). Difficidin was characterized as a highly unsaturated macrocyclic polyene with a 22-membered carbon skeleton, and a phosphate moiety which is rarely found in secondary metabolites of *Bacillus* species (Wilson et al., 1987). It has been reported that they exhibit antagonistic activity against a wide spectrum of bacteria, including *Rhizobium radiobacter* and *Erwinia amylovora* (Hossain et al., 2015; Dagher et al., 2021). Bacilysin is a dipeptide antibiotic composed of an L-alanine residue at the N terminus attached to L-anticapsin, at the C terminus (Parker and

Walsh, 2013). This dipeptide displayed an antifungal activity against *Phytophthora sojae* (Han et al., 2021) and biocontrol potential against rice blight and leaf streak pathogens (Wu et al., 2015). PKs are a large group of secondary metabolites widely used as antimicrobial and immunosuppressive agents. One distinguishing characteristic of these structurally diverse compounds is the presence of oxygen atoms in different positions that are obtained from carbonyl groups (Beletskaya et al., 2015).

In a previous study, *B. velezensis* 32a isolated from Tunisian rhizosphere soil sample was characterized as an effective biocontrol strain against *A. tumefaciens* strains, among other isolates (Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017a,b). Its high antagonistic effect is probably explained by its ability to produce a wide range of bioactive compounds (Ben Abdallah et al., 2015).

In this frame, the present study aimed to explore active compounds from *B. velezensis* 32a against *A. tumefaciens* strains. To reach this objective, a comprehensive approach combining biochemical analytical methods and molecular techniques was developed. First, the content of secondary metabolites from the cell-free supernatant of the 32a strain was determined by reverse phase-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (RP-HPLC-MS). Then, the specific implication of lipopeptides in the antagonistic activity against *A. tumefaciens*, was assessed using pure lipopeptides alone and in mixture. Finally, the involvement of polyketides and bacilysin as bioactive compounds against *A. tumefaciens* was tested through the generation of 32a mutant strains deficient in the synthesis of difficidin, macrolactin, bacillaene, and bacilysin. These mutants were also compared with mutants of another strain of *B. velezensis* in order to highlight the synergistic activity of polyketides in combating this plant disease.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

*B. velezensis* 32a was isolated from Tunisian rhizosphere soil sample and characterized as an effective biocontrol strain towards a wide spectrum of bacterial and fungal pathogens (Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017a,b). In addition, a similar strain named *B. velezensis* GA1 known for its high antimicrobial potential (Andric et al., 2021) was used for more in-depth investigation of the antagonistic compounds. This strain was isolated from Italian strawberry fruits by the Laboratorio Vitrocoop Cesana (Toure et al., 2004), which was later identified (Arguelles-Arias et al., 2009) and completely sequenced (Hoff et al., 2021). GA1 and its mutants (Table 1) were kindly supplied by the team of Prof. Philippe Jacques from the UMRt BioEcoAgro of the University of Liege-Gembloux AgroBioTech (Belgium).

In this study, the bacterial pathogen *A. tumefaciens* strains C58 and B6 (Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017b) were used in order to explore active compounds from *Bacillus* strains. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Shanghai) was used as a host for molecular cloning. *B. velezensis* 32a and GA1 were cultivated in Landy medium at 30 °C (Guez et al., 2021). *A. tumefaciens* strains and *E. coli* DH5 $\alpha$  were cultivated in Luria-Bertani medium (LB) at 30 and 37 °C, respectively. Bacteria were routinely cultivated in LB solidified with 1.5% agar and kept at 4 °C before use. When required, ampicillin (60  $\mu$ g/mL), kanamycin (50  $\mu$ g/mL) and chloramphenicol (5  $\mu$ g/mL) were added to the medium. *Agrobacterium*, *Bacillus* and *E. coli* strains were stored for a long time at -80 °C using glycerol 30%. Strains used in this study are presented in Table 1.

### 2.2. Production of secondary metabolites by *B. velezensis* 32a for their analytical characterization

The production of secondary metabolites by 32a strain was carried out in Landy medium (Guez et al., 2021). To regulate the pH during the

**Table 1**  
Bacterial strains and plasmids used in this study.

| Strain or plasmid           | Relevant characteristics  | Source or reference                      |
|-----------------------------|---|--|
| <b>Strains</b>              |   |  |
| <i>B. velezensis</i> 32a    | Wild type   | (Ben Abdallah et al., 2015)              |
| <i>B.velezensis</i> GA1     | Wild type   | (Toure et al., 2004)                     |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ | <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> <i>M15</i> ), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (article responses of beneficial)/ " <i>supE44</i> <i>DlacU169</i> (U80 <i>lacZDM15</i> ) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> " | Invitrogen (Shanghai)                    |
| <i>A. tumefaciens</i> C58   | Nopaline pathogenic strain (agrocin 84-sensitive pathogen)  | (Ben Abdallah et al., 2015)              |
| <i>A. tumefaciens</i> B6    | Octopine pathogenic strain (agrocin 84-resistant pathogen)  | (Ben Abdallah et al., 2015)              |
| Bvd                         | $\Delta$ <i>dfnD</i> ::Km <sup>r</sup> : 32a deficient in difficidin synthesis  | This study                               |
| Bvm                         | $\Delta$ <i>mInA</i> ::Km <sup>r</sup> : 32a deficient in macrolactin synthesis   | This study                               |
| Bvbe                        | $\Delta$ <i>baeJ</i> ::Km <sup>r</sup> : 32a deficient in bacillaene synthesis  | This study                               |
| Bvbc                        | $\Delta$ <i>baeC</i> ::Km <sup>r</sup> : 32a deficient in bacilysin synthesis   | This study                               |
| G1                          | GA1 $\Delta$ <i>mInA</i> ::cat: GA1 deleted of <i>mInA</i> gene; unable to produce macrolactins   | (Andric et al., 2021)                    |
| G2                          | GA1 $\Delta$ <i>baeS</i> ::cat: GA1 deleted of <i>baeS</i> gene; unable to produce bacillaene   | (Andric et al., 2021)                    |
| G3                          | GA1 $\Delta$ <i>baeA</i> ::cat: GA1 deleted of <i>baeA</i> gene; unable to produce bacilysin and chlorotetain   | (Andric et al., 2021)                    |
| G4                          | GA1 $\Delta$ <i>dhbC</i> ::cat: GA1 deleted of <i>dhbC</i> gene; unable to produce bacillibactin  | (Andric et al., 2021)                    |
| G5                          | GA1 $\Delta$ <i>sfp</i> ::cat: GA1 deleted of <i>sfp</i> gene; unable to produce lipopeptides and polyketides   | (Andric et al., 2021)                    |
| G6                          | GA1 $\Delta$ <i>dfnA</i> ::cat: GA1 deleted of <i>dfnA</i> gene; unable to produce difficidin and oxydifficidin   | (Andric et al., 2021)                    |
| G7                          | GA1 $\Delta$ <i>dfnM</i> ::cat: GA1 deleted of <i>dfnM</i> gene; unable to produce oxydifficidin  | (Andric et al., 2021)                    |
| G8                          | GA1 $\Delta$ <i>baeJ</i> ::cat: GA1 deleted of <i>baeJ</i> gene; unable to produce bacillaene   | (Andric et al., 2021)                    |
| G9                          | GA1 $\Delta$ <i>srfaC</i> ::cat: GA1 deleted of <i>srfaC</i> gene; unable to produce surfactins   | (Andric et al., 2021)                    |
| G10                         | GA1 $\Delta$ <i>fenA</i> ::cat: GA1 deleted of <i>fenA</i> gene; unable to produce fengycins  | (Andric et al., 2021)                    |
| G11                         | GA1 $\Delta$ <i>ituA</i> ::cat: GA1 deleted of <i>ituA</i> gene; unable to produce iturins  | (Andric et al., 2021)                    |
| G12                         | GA1 $\Delta$ <i>fenA</i> ::cat $\Delta$ <i>ituA</i> ::phleo $\Delta$ <i>srfaA</i> ::kana: GA1 deleted of <i>fenA</i> , <i>ituA</i> and <i>srfaA</i> genes; unable to produce surfactins, fengycins and iturins  | (Andric et al., 2021)                    |
| G13                         | GA1 $\Delta$ <i>baeJ</i> ::cat $\Delta$ <i>dfnA</i> ::phleo: GA1 deleted of <i>baeJ</i> and <i>dfnM</i> genes; unable to produce bacillaene and difficidins   | (Andric et al., 2021)                    |
| G14                         | GA1 $\Delta$ <i>baeJ</i> ::cat $\Delta$ <i>mInA</i> ::phleo: GA1 deleted of <i>baeJ</i> gene; unable to produce bacillaene metabolites and macrolactins   | University of Liege-Gembloux AgroBiotech |
| G15                         | GA1 $\Delta$ <i>dfnA</i> ::cat $\Delta$ <i>mInA</i> ::phleo: GA1 deleted of <i>dfnA</i> gene; unable to produce difficidin and oxydifficidin and macrolactins   | University of Liege-Gembloux AgroBiotech |
| G16                         | GA1 $\Delta$ <i>baeA</i> ::cat $\Delta$ <i>mInA</i> ::phleo: GA1 deleted of <i>baeA</i> ; unable to produce bacilysin and macrolactins  | University of Liege-Gembloux AgroBiotech |
| G17                         | GA1 $\Delta$ <i>glycT</i> ::cat: GA1 deleted of <i>glycT</i> gene; unable to produce glycosylated form of bacillaenes and macrolactins  | University of Liege-Gembloux AgroBiotech |
| <b>Plasmids</b>             |   |  |
| pGEM-T Easy                 | Cloning vector; Amp <sup>r</sup>  | Promega Corp                             |

**Table 1 (continued)**

| Strain or plasmid | Relevant characteristics   | Source or reference           |
|-------------------|--|-------------------------------|
| pDG792            | Plasmid containing a kanamycin resistance gene   | (Guérout-Fleury et al., 1995) |
| <i>psrfAC</i>     | pGEM-T Easy carrying a 1.9 kb fragment from <i>srfaC</i> ; Amp <sup>r</sup>            | This study                    |
| <i>pfenD</i>      | pGEM-T Easy carrying a 1.6 kb fragment from <i>fenD</i> ; Amp <sup>r</sup>             | This study                    |
| <i>pdfnD</i>      | pGEM-T Easy carrying a 1.5 kb fragment from <i>dfnD</i> ; Amp <sup>r</sup>             | This study                    |
| <i>pmlnA</i>      | pGEM-T Easy carrying a 1.5 kb fragment from <i>mInA</i> ; Amp <sup>r</sup>             | This study                    |
| <i>pbaeJ</i>      | pGEM-T Easy carrying a 1.7 kb fragment from <i>baeJ</i> ; Amp <sup>r</sup>             | This study                    |
| <i>pituD</i>      | pGEM-T Easy carrying a 1.5 kb fragment from <i>ituD</i> ; Amp <sup>r</sup>             | This study                    |
| <i>pksrfAC</i>    | pGEM-T Easy carrying <i>srfaC</i> ::Km <sup>r</sup> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> | This study                    |
| <i>pkfenD</i>     | pGEM-T Easy carrying <i>fenD</i> ::Km <sup>r</sup> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | This study                    |
| <i>pkdfnD</i>     | pGEM-T Easy carrying <i>dfnD</i> ::Km <sup>r</sup> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | This study                    |
| <i>pkmlnA</i>     | pGEM-T Easy carrying <i>mInA</i> ::Km <sup>r</sup> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | This study                    |
| <i>pksrfAC</i>    | pGEM-T Easy carrying <i>baeJ</i> ::Km <sup>r</sup> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | This study                    |
| <i>pkituD</i>     | pGEM-T Easy carrying <i>ituD</i> ::Km <sup>r</sup> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | This study                    |
| <i>pkbacC</i>     | pGEM-T Easy carrying <i>baeC</i> ::Km <sup>r</sup> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | This study                    |

cat: chloramphenicol resistance/ Km: kanamycin resistance/ phleo: phleomycin resistance/ Amp: ampicillin resistance

culture, 0.1 M of 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) at an initial pH value of 7 was added to this medium. Briefly, a fresh colony of 32a was inoculated into LB liquid medium and incubated at 30 °C for 24 h at 200 rpm. After incubation, a culture of 50 mL in Landy medium was carried out in 250 mL Erlenmeyer flask and used to inoculate a 1 L Erlenmeyer flask containing 200 mL of Landy medium with an initial OD<sub>600</sub> of 0.2. The culture was then incubated with shaking at 30 °C for 72 h.

Then, culture was centrifuged for 30–40 min at 11000 rpm to remove cell debris. After centrifugation, the supernatants were stored at 4 °C before their RP-HPLC-MS analysis.

### 2.3. Lipopeptides, polyketides and bacilysin identification by RP-HPLC-MS

RP-HPLC-MS was employed to identify the compounds produced in the cell-free supernatant of *B. velezensis* 32a strain. Antimicrobial compounds were separated and characterized using an Acquity H-Class system (Waters, Massachusetts, USA) equipped with a C18 column (250 × 3.0 mm, 5 μm particles, Interchim, Montluçon, France) and combined with a photodiode array detector (PDA) and an ACQUITY QDA mass detector (Waters).

Supernatants were dissolved in 50% ethanol and 10 μL were injected in the column with a flow rate of 0.6 mL/min. UV detection was performed at 214, 230 and 280 nm. The latter allows optimal visualization of lipopeptides, bacilysin and polyketides, respectively. The run condition was carried out as described by Dussert et al. (2022). The compound ionization was carried out with a heated electrospray ionization source (HESI) and the mass measurements were carried out in positive mode and over a mass range from *m/z* 200–1250.

The presence of lipopeptides, polyketides and bacilysin were confirmed by their molecular masses with a tolerance of ± 0.65 *m/z*. In addition, to confirm the lipopeptides identification, standard solutions of surfactin A, iturin A and fengycin (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) were made using pure powders that were diluted in ethanol to a final concentration of 400 mg/L. Whereas, polyketides (macrolactins,

difficidin and bacillaenes) and bacilysin are not offered for sale as a commercial standard sample. Three independent replicates were conducted.

#### 2.4. High Resolution Mass Spectrometry analysis of the iturinic lipopeptides in *B. velezensis* 32a

The corresponding iturinic lipopeptide (iturin A or mycosubtilin) in 32a was determined by RP-HPLC-tandem MS (RP-HPLC-MS/MS) to characterize the amino acid residues of the iturinic sequence. Briefly, 10  $\mu$ L of filtered 32a supernatants (as previously described above) and iturin A and mycosubtilin standard solutions concentrated at 1000 mg/L were chromatographed using the same RP-HPLC conditions as described above (as previously described above). The chromatographed peptides were then ionized into the electrospray ionization source of the Q-TOF Synapt G2-Si™ (Waters Corporation, Manchester, UK). MS analysis was performed in sensitivity, positive ion and data-dependent analysis (DDA) modes using the proprietary Mass Lynx software (Waters).

The source temperature was set at 150 °C and the capillary and cone voltages were set at 3000 and 60 V, respectively. The MS data were collected for  $m/z$  values in the range of 200 and 1500 Da with a scan time of 0.2 s. A maximum of 5 precursor ions were chosen for MS fragmentation, with an intensity threshold of 1000. The MS/MS data were collected for  $m/z$  values in the range of 10–3000 Da using the collision-induced dissociation (CID) mode and a scan time of 0.1 s at an energy collision of 10–15 V for low  $m/z$  (200 Da) and a range of 20–100 V for high  $m/z$  (1500 Da).

#### 2.5. Antibacterial activity of commercial lipopeptides against *A. tumefaciens*

Iturin A (I), surfactin A (S) and plipastatin (member of fengycin family, F) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA with HPLC $\geq$ 95%, 98% and 90% respectively). Mycosubtilin (M) (HPLC=100%) was supplied from Lipofabrik (Lesquin, France).

In order to study the ability of purified lipopeptides to inhibit the growth of phytopathogenic bacteria, 1 mL of the inoculum at 10<sup>8</sup> CFU/mL was evenly inoculated onto LB agar plates using the flooding method (Bobu et al., 2016).

Due to their low solubility in aqueous solutions, purified lipopeptides were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 g/L and then diluted in sterile water to 100 mg/L. Mixtures of (surfactin A + fengycin), (surfactin A + mycosubtilin + iturin A), and (surfactin A + fengycin + mycosubtilin + iturin A) were prepared at a ratio of 1:1 (v/v), 1:1:1 (v/v/v) and 1:1:1:1 (v/v/v/v), respectively; in order to determine their synergistic interactions. As a control, water containing 1% DMSO was employed. Thereafter, 100  $\mu$ L of pure lipopeptide were placed into each well previously created in the agar plate. Plates were left at 4 °C for 2–4 h to allow the diffusion of the bacterial compounds. Subsequently, the plates were incubated for 48 h at 30 °C. Furthermore, broth microdilution methodology (as recommended by ISO 20776–1:2019) was carried out in sterile 96-well microplates to quantitatively measure the *in vitro* antagonistic activity of purified lipopeptides against *Agrobacterium* strains.

A stock solution of lipopeptides were prepared at an initial concentration of 1000 mg/L in Muller-Hinton Broth (MHB) medium supplemented with 2.5% DMSO selected as the lowest inhibitory concentration to suppress *Agrobacterium* growth. Each column contained 100  $\mu$ L of two-fold dilution of the lipopeptide or of the lipopeptide mixture in MHB medium. Thereafter, 10<sup>8</sup> CFU/mL of the bacterial inoculum was introduced in each well. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and the OD<sub>600 nm</sub> was evaluated with microplate spectrophotometer (Microplates reader SpectraMax® iD3, Molecular Devices, San Jose, United States). Three independent replicates were conducted.

#### 2.6. Construction of *B. velezensis* 32a mutants defective in polyketides and bacilysin biosynthesis

32a mutant strains devoid in polyketides and bacilysin production were obtained by double-crossover homologous recombination method (Xu et al., 2014). Briefly, the genomic DNA of 32a strain was extracted using the Promega Brand Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. The resulting DNA was used as a template to amplify *difficidin* (*dfnD*), *macrolactin* (*mlnA*), *bacillaene* (*baeJ*), and *bacilysin* (*bacC*) biosynthetic genes using the primers listed in Table S1 (Supplementary materials). PCR amplifications were carried out in 50  $\mu$ L reaction mixture containing 10  $\mu$ L PCR buffer (5X), 4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5  $\mu$ L of dNTP-mix (2 mM), 5  $\mu$ L of each primer (10 mM), 2 U of Taq DNA polymerase (GoTaq, Promega, Madison, WI, USA) and 50 ng of genomic DNA. The PCR program consisted of an initial denaturation at 95 °C for 5 min; followed by 35 cycles composed of denaturation at 95 °C for 45 s, annealing at the adequate melting temperature (Table 2), elongation at 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplifications were analyzed by electrophoresis in an 1.5% agarose gel and visualized under UV light using a gel documentation system (Biorad Gel Doc XR+).

To disrupt *difficidin*, *macrolactin*, *bacillaene*, and *bacilysin* synthesis in 32a, the PCR products were cloned in pGEM-T Easy vector and the ligation mixtures were transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  using the heat shock procedure (Sambrook, 2001). Transformants were grown overnight in LB medium containing 60  $\mu$ g/mL ampicillin. Plasmids of white pGEM-T Easy transformants (*pdfnD*, *pmlnA*, *pbaeJ*, and *pbacC*) were extracted and digested with the *Hind*III restriction enzyme. Simultaneously, pDG792 was digested with the same enzyme to obtain the kanamycin cassette (1.5 kb), which was then ligated to *pdfnD*, *pmlnA*, *pbaeJ*, and *pbacC* plasmids (Table 1). The ligation mixture was used to transform *E. coli* DH5 $\alpha$ . After overnight growth of transformants in LB medium containing 50  $\mu$ g/mL of kanamycin, the resulting *pkdfnD*, *pkmlnA*, *pkbaeJ*, and *pkbacC* plasmids were subsequently amplified by the TempliPhi™ method and PCR and integrated into the genome of *B. velezensis* 32a by double-crossover homologous recombination using the natural competence induced by nitrogen limitation protocol (Andric et al., 2021), generating the knockout mutants Bvd ( $\Delta dfnD::Km^r$ ), Bvm ( $\Delta mlnA::Km^r$ ), Bvbe ( $\Delta baeJ::Km^r$ ), and Bvbc ( $\Delta bacC::Km^r$ ). In short, *B. velezensis* strain 32a was grown at 37 °C and 160 rpm in LB liquid medium until the OD<sub>600</sub> value reached 1. Cells were then washed twice, once with peptone water and once with modified Spizizen minimal salt liquid medium (MMG) (19 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydrous; 6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g/L Na<sub>3</sub> citrate anhydrous; 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O; 2 g/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> (sterilized by filtration at 0.22  $\mu$ m); 2  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub>; 8 g/L glucose; 2 g/L glutamic acid; pH 7.0). 32a cells were adjusted to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.01 using MMG liquid medium and mixed with 100 ng of the treated DNA. After transformation for 24 h at 37 °C, cells were plated onto LB agar supplemented with kanamycin antibiotic (50  $\mu$ g/mL). Positive transformants were verified by PCR using the primers used for amplification and subsequently confirmed by designing primers that represent the flanked upstream and downstream regions (Table S1).

#### 2.7. Antibacterial assays of *B. velezensis* 32a and GA1 mutants against *A. tumefaciens*

The effect of polyketides and bacilysin production by 32a or GA1 mutants and the wild-type strains on the antibacterial activity was compared. Briefly, *B. velezensis* 32a, GA1 and their mutants were grown in Landy medium at 30 °C for 12 h at 200 rpm. The 12 h pre-cultures were diluted 100-fold in Landy medium and cultured at 30 °C with shaking at 200 rpm for 24 h to produce the antagonistic compounds. After centrifugation, the supernatants were filtered through CA 0.22  $\mu$ m membrane filters (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) in order to prepare samples for antibacterial assays. Three

**Table 2**  
Metabolite production of *B. velezensis* 32a detected by RP-HPLC-MS.

| Compound               | Theoretical ( <i>m/z</i> ) compound | Observed mass-to charge ( <i>m/z</i> ) ratio | Difference between theoretical and observed mass-to charge ( <i>m/z</i> ) ratio | Assignment   | Retention time (min)   | Reference                  |
|------------------------|-------------------------------------|--|---|--|--|----------------------------|
| Surfactins             | 994,64; 1016,62; 1032,73            | 994.36; 1016.89; 1032.68                     | 0.28; 0.27; 0.05  | C <sub>12</sub> -Surfactin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 38.49  | (Shahid et al., 2021)      |
|                        | 1008,66; 1030,64; 1046,75           | 1008.51; 1030.37; 1046.47                    | 0.15; 0.27; 0.28  | C <sub>13</sub> -Surfactin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 39.56  | (Shahid et al., 2021)      |
|                        | 1022,67; 1044,65; 1060,76           | 1022.45; 1044.60; 1060.16                    | 0.22; 0.05; 0.47  | C <sub>14</sub> -Surfactin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 41.17  | (Shahid et al., 2021)      |
|                        | 1036,69; 1058,67                    | 1036.44; 1058.24                             | 0.25; 0.43  | C <sub>15</sub> -Surfactin [[M]+H, +Na] <sup>+</sup>   | 42.13  | (Shahid et al., 2021)      |
|                        | Bacillomycin D                      | 1059.56; 1081.54; 1097.65                    | 1059.94; 1081.33; 1097.05   | 0.38; 0.21; 0.6  | C <sub>16</sub> -Bacillomycin D [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>        | 20.81                      |
| Iturins                |                                     | 1043,55; 1065,53; 1081,50                    | 1043.88; 1065.76; 1081.65   | 0.33; 0.23; 0.15   | C <sub>14</sub> -Iturin A/mycosubtilin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup> | 22.70                      |
|                        | 1057,56; 1079,54; 1095,52           | 1057.78; 1079.78; 1095.65                    | 0.22; 0.24; 0.13  | C <sub>15</sub> -Iturin A/mycosubtilin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 23.66  | (Ongena and Jacques, 2008) |
|                        | 1071,58; 1093,56; 1109,53           | 1071.79; 1093.64; 1109.69                    | 0.21; 0.08; 0.16  | C <sub>16</sub> -Iturin A/mycosubtilin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 24.84  | (Ongena and Jacques, 2008) |
|                        | 1085,59; 1107,58; 1123,55           | 1085.72; 1107.68; 1123.66                    | 0.13; 0.1; 0.11   | C <sub>17</sub> -Iturin A/mycosubtilin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 25.94  | (Ongena and Jacques, 2008) |
|                        | Fengycins                           | 718,38; 740,37; 756,47                       | 718.66; 740.43; 756.97  | 0.28; 0.06; 0.5  | C <sub>15</sub> -Fengycin A [[M]+H, +Na, +K] <sup>2+</sup>           | 23.35                      |
| 725,39; 747,37; 763,35 |                                     | 725.60; 747.57; 763.39                       | 0.21; 0.2; 0.04   | C <sub>16</sub> -Fengycin A [[M]+H, +Na, +K] <sup>2+</sup>   | 23.95  | (Koumoutsis et al., 2004)  |
| 739,41; 761,39; 777,36 |                                     | 739.70; 761.11; 777.07                       | 0.29; 0.28; 0.29  | C <sub>15</sub> -Fengycin B [[M]+H, +Na, +K] <sup>2+</sup>   | 25.43  | (Koumoutsis et al., 2004)  |
| 746,42; 768,40; 784,37 |                                     | 746.67; 768.74                               | 0.25; 0.34  | C <sub>18</sub> -Fengycin A [[M]+H, +Na] <sup>2+</sup><br>or<br>C <sub>16</sub> -Fengycin B [[M]+H, +Na] <sup>2+</sup> | 26.55  | (Koumoutsis et al., 2004)  |
| Bacillibactin          |                                     | 883.26; 905.24; 921.35                       | 883.34; 905.22; 921.15  | 0.08; 0.02; 0.2  | Bacillibactin [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>                          | 19.94                      |
|                        | Macrolactins                        | 425,48; 441,59                               | 425.30; 441.27  | 0.18; 0.32   | Macrolactin A [[M]+Na, +K] <sup>+</sup>                              | 38.04                      |
| 687,68; 703,79         |                                     | 687.28; 703.28                               | 0.4; 0.51   | Macrolactin D [[M]+Na, +K] <sup>+</sup>  | 23.09  | (Arbuwan et al., 2018)     |
| 511,58; 527,69         |                                     | 511.20; 527.17                               | 0.38; 0.52  | 7-O-malonyl-macrolactin A [[M]+Na, +K] <sup>+</sup>  | 27.07  | (Schneider et al., 2007)   |
| 525,58; 541,69         |                                     | 525.22; 541.17                               | 0.36; 0.52  | 7-O-succinyl-macrolactin A [[M]+Na, +K] <sup>+</sup>   | 27.17  | (Schneider et al., 2007)   |
| Bacillaene             | 581.35; 603,33; 619,44              | 581.36; 603.38; 619.33                       | 0.01; 0.05; 0.11  | Bacillaene A [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 28.15  | (Chen et al., 2006)        |
|                        | 583,5; 605,48; 621,59               | 583.41; 605.39; 621.34                       | 0.09; 0.09; 0.25  | Bacillaene B [[M]+H, +Na, +K] <sup>+</sup>   | 28.48  | (Chen et al., 2006)        |
|                        | Difficidin                          | 583,68; 599,79                               | 583.25; 599.23  | 0.43; 0.56   | Oxydifficidin [[M]+Na, +K] <sup>+</sup>                              | 33.87                      |
| Bacilysin              |                                     | 271,28; 309,37                               | 271.11; 309.03  | 0.17; 0.34   | Bacilysin [[M]+H, +K] <sup>+</sup>                                   | 4.07                       |
|                        | 289,73; 327,82                      | 289.26; 327.25                               | 0.47; 0.57  | Chlorotetaine [[M]+H, +K] <sup>+</sup>   | 4.07   | (Phister et al., 2004)     |

independent replicates were conducted. The resulting supernatants were then tested against *Agrobacterium* strains for their antibacterial activity using the agar well diffusion test and MIC determination method accordance with the following procedure. Overnight cultures of *Agrobacterium* strains (C58 and B6) were standardized to 10<sup>8</sup> CFU/mL in LB agar medium (1.2% agar) and quickly distributed on the plates (Chen et al., 2021). Then, wells were created aseptically and filled with 100 µL of 32a and GA1 cell-free supernatants or mutants' cell-free supernatants. The antibacterial activity was examined by measuring the distance between the edges of the well and the area where *Agrobacterium* growth is inhibited. The antibacterial activity of the wild-type GA1 was considered to exhibit 100% of the inhibition growth. Values are means of triplicate assays.

The minimal inhibitory concentrations of cell-free supernatants from GA1 and its mutants were performed using the broth microdilution method. On a 96-well microtitration plate, two-fold dilutions of the supernatants were performed using MHB and liquid Landy medium (v/v), starting with 1/2 dilution until 1/16 serial dilutions. Then, *Agrobacterium* cell suspension was inoculated into each well to a final density

of 10<sup>8</sup> CFU/mL and plates were incubated for 48 h at 30 °C. After incubation, wells were inspected for growth of the pathogen by colorimetric assay performed by adding a sterile volume (25 µL) of MTT reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) at a concentration of 0.5 mg/mL into each well, followed by a 30 min incubation at 30 °C. In living cells, dehydrogenase activity reduces the yellow tetrazolium salt in MTT to a purple formazan. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest dilution of supernatant that shows no visible growth of the tested *Agrobacterium* strains. The experiments were repeated three times.

## 2.8. Statistical analysis

The two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison tests were used to determine significant differences ( $p < 0.05$ ) between purified lipopeptides and their mixtures.

Statistical analyses for evaluating the antagonistic activity of 32a and GA1 mutants against the bacterial pathogen were determined by two-way ANOVA with post hoc Tukey's and Dunnett's tests respectively.

The statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 9.0.1 Software.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of *B. velezensis* 32a secondary metabolites on phytopathogenic *Agrobacterium*

Based on agar well diffusion method, cell-free supernatant of strain 32a showed a strong inhibitory activity against the pathogenic *A. tumefaciens* strains C58 and B6 (Fig. 1), where the inhibition zone was about 30 and 28 mm, respectively. The higher antibacterial activity was reported against *A. tumefaciens* C58.

#### 3.2. MS identification of the lipopeptides, polyketides and bacilysin compounds produced by *B. velezensis* 32a

Antimicrobial compounds produced by *B. velezensis* 32a in Landy medium from 72 h culture were analyzed using RP-HPLC-MS with an  $m/z$  ranging from 200 to 1250. Using prior data about MS analysis of molecules from *B. subtilis* and according to the analysis of purified lipopeptides, three well-known families of cyclic lipopeptides (surfactins, fengycins, and iturins), three different kinds of polyketides (macrolactins, oxydifficidin and bacillaenes), bacilysin and chlorotetaine; a chlorinated derivative of bacilysin; were observed. The main results are summarized in Table 2.

The strain efficiently secretes different variants or isoforms of surfactin, iturin, and fengycin (Fig. S1). Ion signals at  $m/z$  1016.89, 1030.37, 1044.60, and 1058.24 which differed by an interval of 14 Da, could be attributed to the  $[M+Na]^+$  ions of surfactins with C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, and C<sub>15</sub>  $\beta$ -hydroxy fatty acid chains, respectively. It is also possible that these masses belong to the C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, and C<sub>16</sub> isoforms of surfactin A with a valine at position 7 (Vater et al., 2002), since mass spectrometry alone did not permit us to identify the amino acid sequence of the peptide moiety. Moreover, the protonated surfactin ion  $[M+H]^+$  and those corresponding to potassium adducts  $[M+K]^+$  were also recorded.

The second set of observed mass signals belongs to the bacillomycin D cyclic lipopeptides (CLPs) with an intense sodiated ion signal for C<sub>16</sub> at  $m/z$  1081.33. Furthermore,  $m/z$  profiles of protonated form  $[M+H]^+$  at  $m/z$  1043.88, 1057.78, 1071.79, and 1085.72 correlated with the calculated mass values of iturin A or mycosubtilin homologues with acyl chains of C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, and C<sub>17</sub>, respectively. Similarly, RP-HPLC-MS contributes to identify ion signals at  $m/z$  718.66, 725.60, 746.67, and 739.70 as the protonated doubly charged forms  $[M+2H]^{2+}$  of fengycin A C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, and C<sub>18</sub> or fengycin B C<sub>16</sub> and fengycin B C<sub>15</sub> with hydrogen adducts, respectively (Dussert et al., 2022). In addition, ion signals corresponding to  $m/z$   $[M+H]^+$  883.34,  $m/z$   $[M+Na]^+$  905.22 and  $m/z$   $[M+K]^+$  921.15 suggested that *B. velezensis* 32a could be able to produce the catecholic siderophore bacillibactin.

In-depth analysis of 32a supernatant showed signals in  $m/z$  range

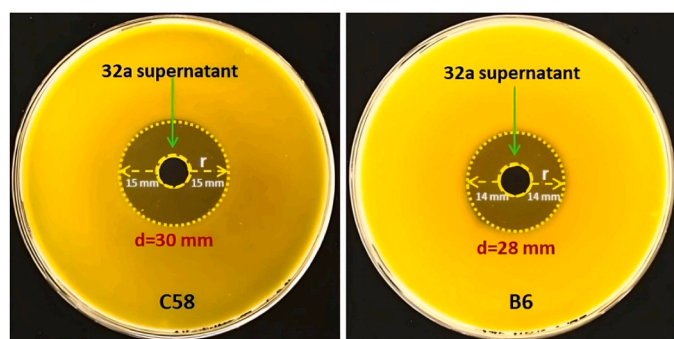


Fig. 1. Antibacterial activity of 32a supernatant against *A. tumefaciens* strains C58 and B6; r: radius, d: diameter.

from 425.30 to 781.36 demonstrating the ability of the 32a strain to produce antimicrobial polyketides. Intense signals at  $m/z$   $[M+Na]^+$  425.30 and  $m/z$   $[M+K]^+$  441.27 indicated a molecular mass of 402.53 Da in agreement with that of the macrolactin A molecule. Moreover, ion signals at  $m/z$  687.28, 511.20, and 525.22 were assigned to the sodiated form of macrolactin D, 7-O-malonyl macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A, respectively.

Signals of polyene antibiotic bacillaenes at  $m/z$  583.5 and 581.36 were assigned as bacillaene B (Chen et al., 2006) and bacillaene A, respectively.

Furthermore, oxydifficidin, the oxydized form of difficidin ( $m/z$  560.70) was detected as its sodiated ( $m/z$  583.25) and potassium ( $m/z$  599.23) forms, respectively.

Besides the lipopeptides and polyketides, RP-HPLC-MS analysis of 32a supernatant showed intense ion signals at  $m/z$  271.11 ( $[M+H]^+$ ) and 309.03 ( $[M+K]^+$ ) suggesting the presence of the dipeptide antibiotic bacilysin. In addition, an isotopic massif with two typical isotopic signals at  $m/z$  289.29 and 291.33, corresponding to the main chlorine isotopes, suggested the detection of chlorotetaine, a chlorinated derivative of bacilysin that eluted with bacilysin at 4.07 min

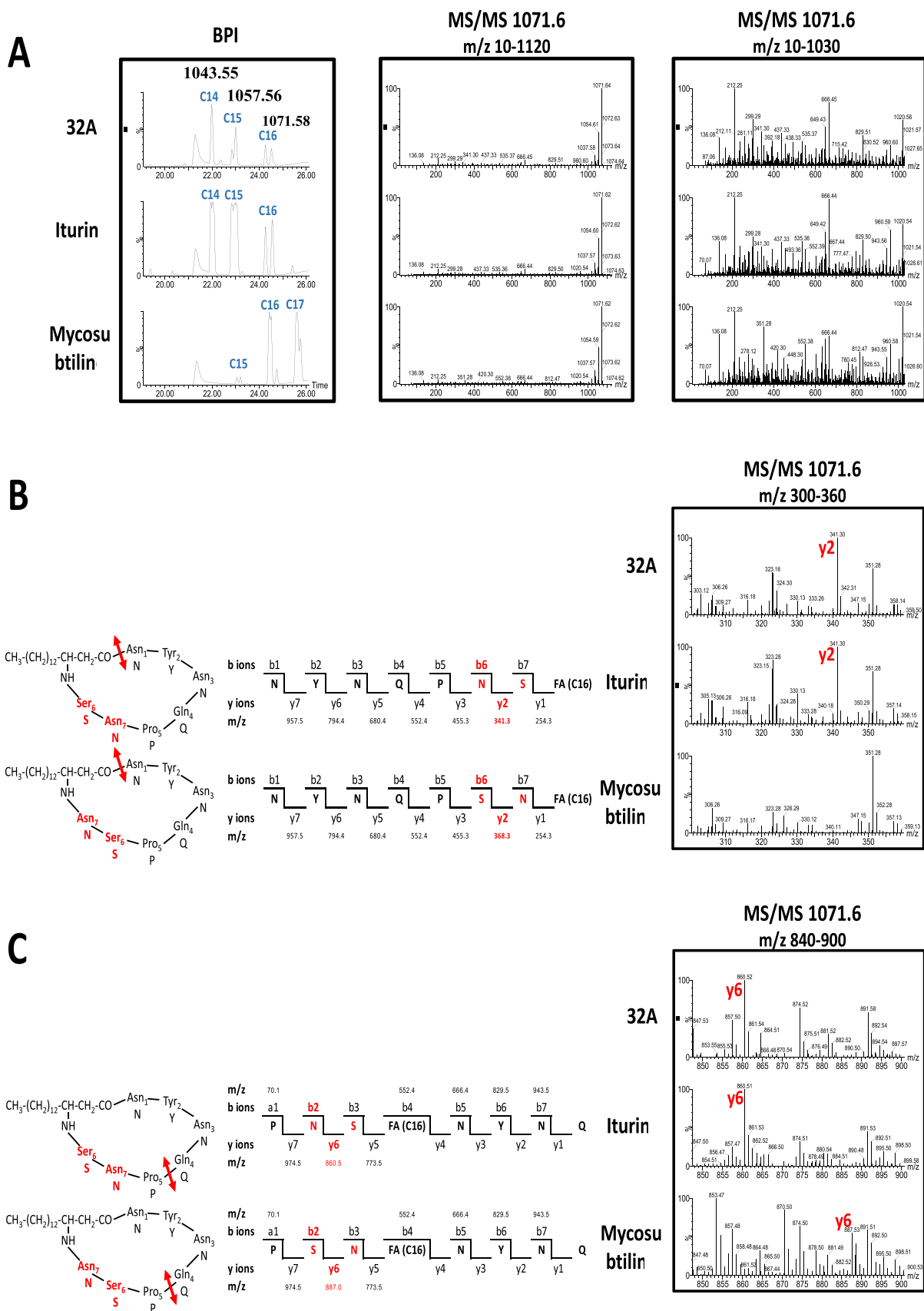
#### 3.3. Identification of iturin A production by *B. velezensis* 32a using tandem mass spectrometry (MS/MS)

In order to figure out the primary peptide sequences of iturinic lipopeptides produced by *B. velezensis* 32a, the filtered supernatant and iturin A and mycosubtilin standard solutions were analyzed by RP-HPLC-MS/MS and fragmentation mass spectra were compared.

As shown in Fig. 2 A, four predominant forms (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, and C<sub>17</sub>) were detected. Particularly, 32a overlaps with iturin A, by sharing three identical forms (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> and C<sub>16</sub>). To confirm this hypothesis, the fragmentation of the common form C<sub>16</sub> ( $m/z$  1071.60) of the three samples was submitted to CID-based fragmentation. Fig. 2 B and C displayed a series of b and y ions, indicating the initial opening of the peptide rings in iturin A and mycosubtilin, both between the fatty acid chain (FA) and the asparagine (Fig. 2B), as well as between the proline and glutamine bond (Fig. 2 C). At first sight, the MS/MS spectra of the three samples have similar ions because mycosubtilin is structurally identical to iturin A. In Fig. 2B, MS/MS spectrum showed the y (-H<sub>2</sub>O) fragment ions of iturin A at  $m/z$  in order 254.30 (y1), 341.30 (y2), 455.32 (y3), 552.43 (y4), 680.43 (y5), 794.41 (y6), and 957.54 (y7) from the C terminus. According to these typical CID fragments, the sequence could be deduced as Ser-Asn-Pro-Gln-Asn-Tyr-Asn. However, the MS/MS spectrum of mycosubtilin C<sub>16</sub> showed a fragmentation pattern from C terminus as follows: 254.30 (y1), 368.30 (y2), 455.32 (y3), 552.43 (y4), 680.43 (y5), 794.41 (y6), and 957.54 (y7), corresponding to peptide sequence Asn-Ser-Pro-Gln-Asn-Tyr-Asn. By comparing the two fragmentation spectra, only the y2 ion allows the differentiation of iturin A and mycosubtilin.

In the case of proline-glutamine cleavage in iturin A ring (Fig. 2 C), the y and b (-H<sub>2</sub>O) series protonated ions at  $m/z$  974.53 (y7), 860.52 (y6), 773.54 (y5), 552.42 (b4), 666.10 (b5), 829.54 (b6), and 943.50 (b7) were visualized, suggesting that the precursor ion (C<sub>16</sub>) possessed a sequence of Pro-Asn-Ser-FA-Asn-Tyr-Asn-Gln. In the same way, the corresponding MS/MS spectrum of mycosubtilin shows the same y and b ions with the exception of the y6 ions ( $m/z$  887.00).

These findings indicate that the ESI-MS/MS analysis of the iturinic lipopeptide in 32a reveals a peptide sequence closely similar to that of iturin A and mycosubtilin, with a single difference observed in the ions y2 (Figs. 2 B) and y6 (Fig. 2 C). Additionally, the ions y2 and y6, with corresponding masses of 341.30 and 860.52 were specifically matched in the ESI-MS/MS spectrum of 32a and iturin A. Therefore, comparing the MS/MS analyses of iturin A and mycosubtilin standards with those of *B. velezensis* 32a, it was proved that the iturinic lipopeptide produced by this strain exhibits a stronger alignment with iturin A.



**Fig. 2.** RP-HPLC-MS/MS analysis of C16 iturin A lipopeptide in *B. velezensis* 32a, iturin A and mycosubtilin standards. (A): Base peak intensity chromatograms and MS/MS spectra of  $[M + H]^+$  precursor ions at  $m/z$  1071.58 zoomed between  $m/z$  10–1120 and 10–1030. (B) and (C): schematic structure of iturin A and mycosubtilin with the b-type and y-type ionic fragments viewed in corresponding MS/MS spectrum, corresponding to different position of broken bonds during fragmentation. MS/MS spectra zoomed between  $m/z$  840–900 highlight b6 and y6 ions.

3.4. Antibacterial activity of purified lipopeptides against *A. tumefaciens*

The antibacterial activity of purified lipopeptides surfactin A, iturin A, mycosubtilin and fengycin and different mixtures of these compounds was investigated against *A. tumefaciens* C58 and B6. Based on the well agar diffusion test, the qualitative evaluation of purified lipopeptides showed that these compounds alone or in synergy at 100 mg/L have no effect on *A. tumefaciens* strains. To further examine antibacterial activity of lipopeptides, the growth inhibition of pathogenic bacteria in liquid medium was determined and the results showed that lipopeptides were effective only at relatively high concentration of 1000 mg/L (Fig. 3).

Surfactin (S) alone was the most efficient against *A. tumefaciens* C58. This compound effectively inhibited bacterial growth at concentrations of 1000, 500 and 250 mg/L, corresponding to the highest inhibition

percentages for C58 (98%, 92% and 54%) and B6 (96%, 54% and 38%). However, fengycin alone did not cause apparent growth inhibition against *Agrobacterium* B6, and it was unable to inhibit the growth of B6 strain below 500 mg/L. When surfactin was combined with fengycin, a strong inhibitory growth rate was observed at concentrations of 1000 and 500 mg/L, leading to growth rate reductions of 97% and 81%, respectively. Given that fengycin alone did not exhibit any antibacterial effect below 1000 mg/L, surfactin was thought to be more responsible for the mixture S/F activity.

In comparison to C58, *A. tumefaciens* B6 displayed more resistance to lipopeptides, as evidenced by the absence of inhibitory growth with mycosubtilin, fengycin, and iturin treatments. Moreover, the inhibitory growth rates of surfactin, surfactin/fengycin (S/F), surfactin/mycosubtilin/iturin (S/M/I), and surfactin/fengycin/mycosubtilin/iturin (S/

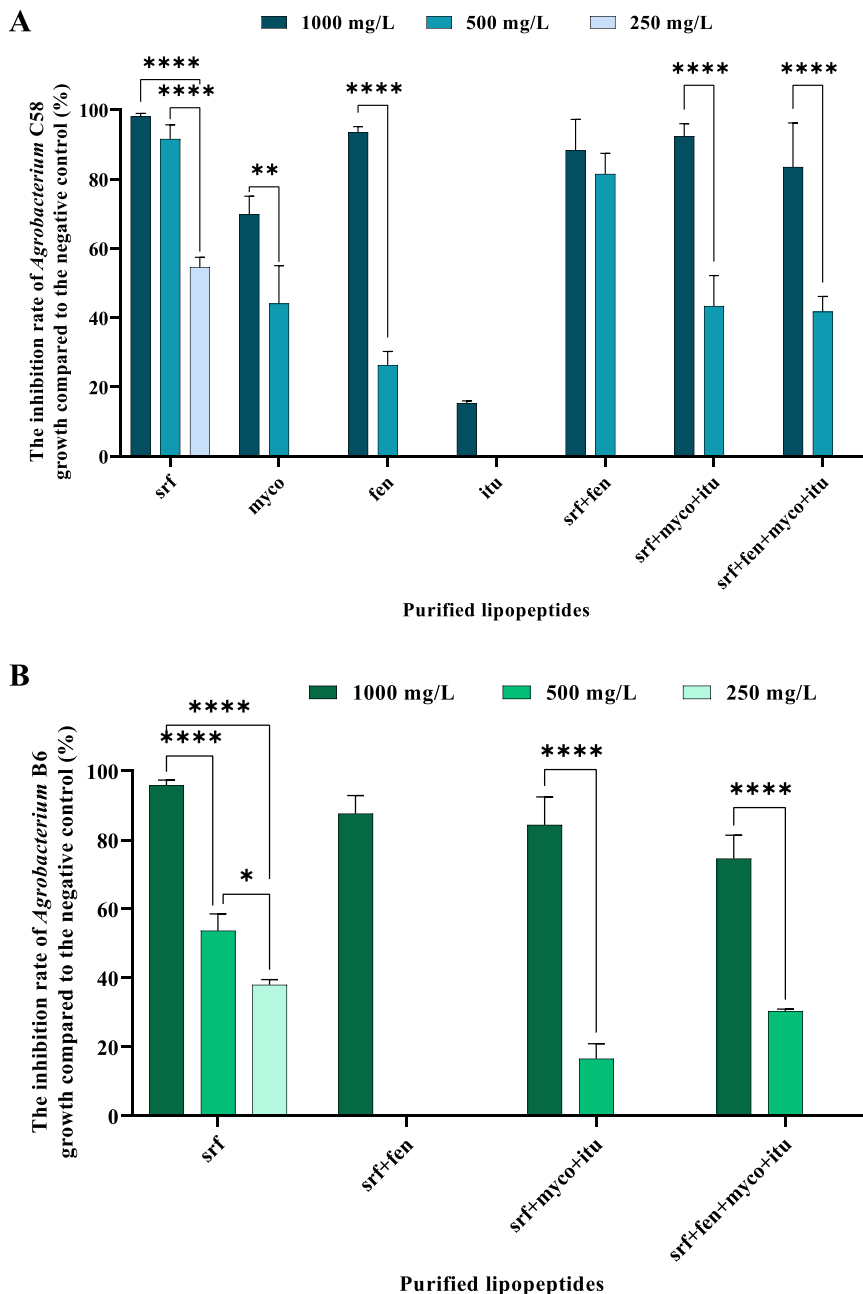


Fig. 3. Analysis of the inhibitory growth rate of *A. tumefaciens* C58 (A) and B6 (B) under different concentrations of the commercialized lipopeptides. Statistical analysis of the data was performed with three replicates. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Two-way ANOVA with post hoc Tukey's test was used to determine the significance with \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.0001$ . Absence of asterisks indicates that  $p$  values above 0.05 were considered non-significant. srf: surfactin, myco: mycosubtilin, fen: fengycin, itu: iturin.

F/M/I) were all lower than those observed with C58 (Fig. 3).

Altogether, these results showed weak antagonistic activities of purified lipopeptides against pathogenic *A. tumefaciens* strains. The highest antibacterial activity could be attributed to the purified surfactin and its combination with M/I that synergistically improve their own activities.

### 3.5. Characterization of mutants defective in metabolites biosynthesis from *B. velezensis* 32a towards *Agrobacterium* pathogen

To investigate the process by which *B. velezensis* 32a inhibits *Agrobacterium* growth, mutant strains of three polyketides (macrolactin (Bvm), bacillaene (Bvbe), difficidin (Bvd) and bacilysin (Bvbc)) were constructed by knock-out of the targeted gene using insertion of an antibiotic resistance cassette. The results of PCR amplification revealed the presence of amplicons with expected sizes (Fig. S2). In fact, the difference in size between the wild type and the transformants corresponds to 1500 bp corresponding to the size of the kanamycin cassette. These findings indicated that the target genes were successfully disrupted by the incorporation of Km cassette into the genome through double homologous recombination.

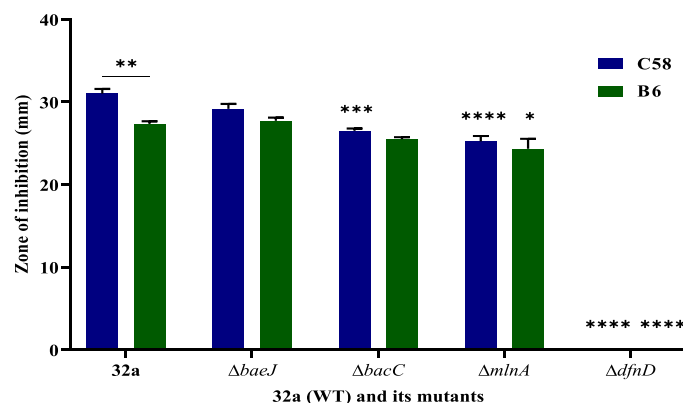
Regarding the antibacterial characterization of these mutants and comparing with wild-type, results showed that Bvd ( $\Delta dfnD$ ) mutant, deficient in difficidin but able in lipopeptides, bacillaenes, macrolactins and bacilysin production, completely lost the antagonistic activity against *A. tumefaciens* C58 and B6 (Fig. 4 and Fig. S3). This result indicates the high-level contribution of difficidin in the antagonism process.

However, the inhibiting effect exerted by Bvbe ( $\Delta baeJ$ ), on *Agrobacterium* strains was comparable with that of 32a, while Bvbc ( $\Delta bacC$ ) showed a significant decrease of only *Agrobacterium* C58 growth. This suggests that bacilysin and bacillaene may not play a role in the *in vitro* control of *Agrobacterium*. However, Bvm ( $\Delta mlnA$ ) significantly decreased the activity of both *A. tumefaciens* C58 and B6.

These results indicated that difficidin is the most implicated compound in the antagonism against C58 and B6, while macrolactin can be also essential.

### 3.6. In-depth investigation of metabolites interaction using GA1 mutants towards *Agrobacterium*

To further study the interaction of difficidin with the other compounds that could be involved in the antibacterial mechanism, a set of derivative mutants of the comparable *B. velezensis* GA1 strain were



**Fig. 4.** Comparison of antibacterial effect of cell-free supernatants from *B. velezensis* 32a (WT) and its mutants against *A. tumefaciens* C58 and B6. Statistical analysis of the data was performed with three replicates. Asterisks (\*) denote significant differences between the WT and each mutant \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.0005$ , \*\*\*:  $p < 0.0001$ , as determined by two-way ANOVA with Tukey's test. Absence of asterisks indicates that  $p$  values above 0.05 were considered non-significant.

tested (Table 1). Our analysis from the antagonistic activity of GA1 mutants against the bacterial pathogen revealed that nearly ten mutants have proven a significantly difference compared with the Wild type (Fig. 5).

Among these mutants, G5 strain was completely unable to inhibit the *Agrobacterium* growth due to a defect in *sfp* gene encoding 4'-phosphopantetheinyl transferase required for polyketides and lipopeptides biosynthesis (Chen et al., 2006). Since bacilysin is produced via a non-ribosomal pathway which is Sfp-independent (Islam et al., 2022),  $\Delta sfp$  reject the hypothesis of bacilysin contribution but further suggest the implication of lipopeptides and polyketides in the *A. tumefaciens* inhibition. As expected from the results obtained with the mutant of our 32a strain, the entire loss of activity of G6 ( $\Delta dfnA$ ), the mutant strain devoid in difficidin synthesis, confirms the critical role of this metabolite in the suppression of *Agrobacterium*. However, the mutant G14 ( $\Delta baeJ$ ,  $\Delta mlnA$ ) deficient in macrolactin and bacillaene production was unable to suppress the growth of *Agrobacterium* despite de production of difficidin. This finding indicated that the combined production of difficidin, bacilysin and lipopeptides was not able to control bacterial development which probably revealed a synergetic effect of difficidin with macrolactins or bacillaenes. Consequently, a double mutant strain deficient in macrolactin and bacilysin was used. It was found that G16 strain ( $\Delta bacA$ ,  $\Delta mlnA$ ) and its compounds (difficidin, bacillaene and lipopeptides) showed no inhibition of *Agrobacterium* strains (Fig. 5). These results therefore support the hypothesis of a synergetic effect between difficidin and macrolactins rather than difficidin and bacillaenes in the inhibition of *Agrobacterium*. Comparing to the wild type GA1, G3 mutant ( $\Delta bacA$ ) significantly decreased the *Agrobacterium* growth (88% and 87% for C58 and B6, respectively). A mutant unable to produce glycosylated form of bacillaenes and macrolactins particularly demonstrated the highest inhibitory growth rate (117% and 115% for C58 and B6, respectively) and significantly improved the antibacterial activity compared to the GA1 strain.

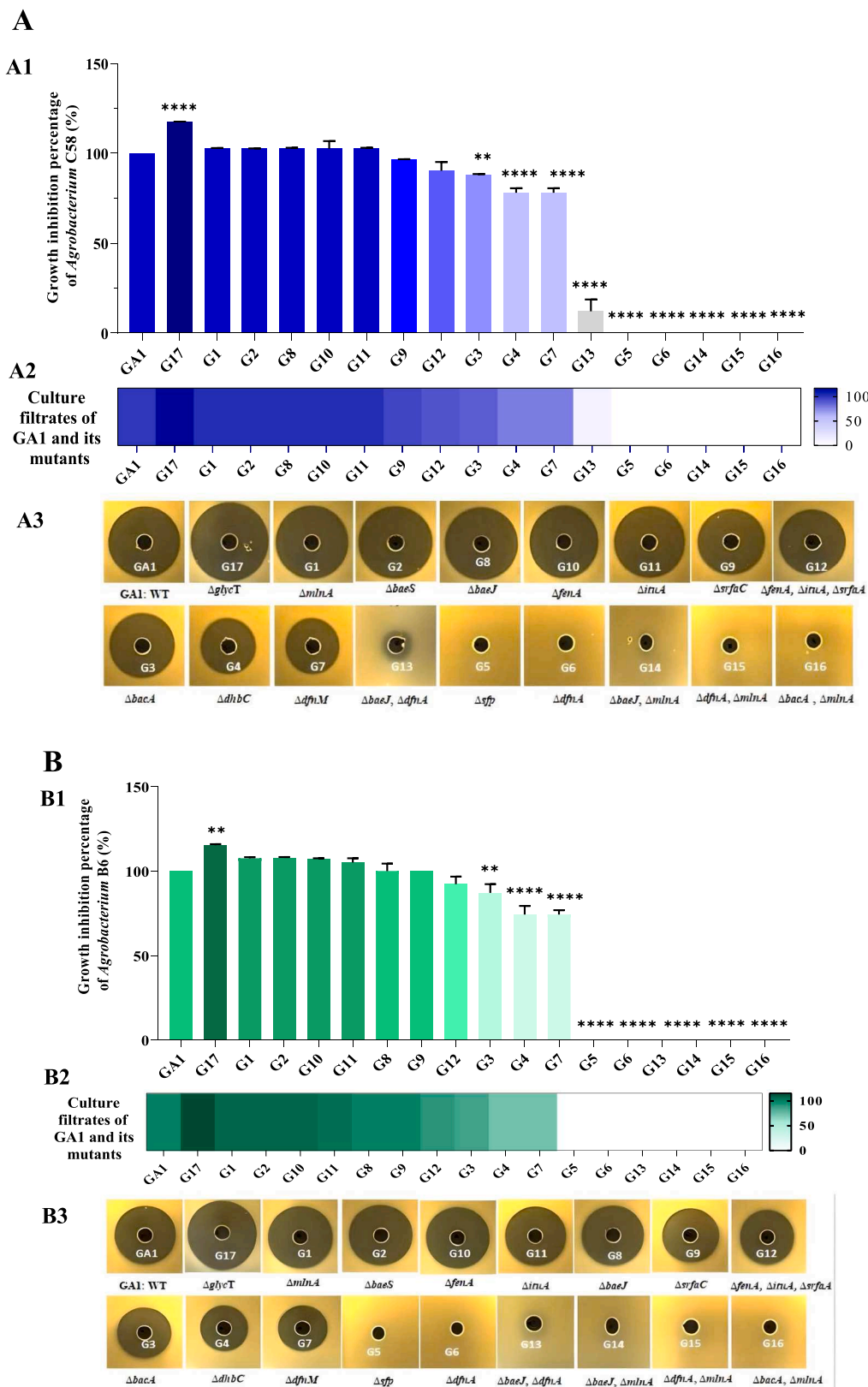
Furthermore, our statistical analysis shows that the bacillibactin deficient mutant G4 ( $\Delta dhbC$ ) significantly decreased the antibacterial activity against both *Agrobacterium* C58 and B6 with inhibitory growth rate of 78% and 74%, respectively. These results indicated that bacillibactin may potentially help to inhibit the target pathogen. In contrast, when tested against *A. tumefaciens* strains, the following mutants of bacillaene (G2:  $\Delta baeS$  and G8:  $\Delta baeJ$ ), macrolactin (G1:  $\Delta mlnA$ ) and lipopeptides (G12:  $\Delta fenA$ ,  $\Delta ituA$ ,  $\Delta srfaA$ , G9:  $\Delta srfaC$ , G11:  $\Delta ituA$  and G10:  $\Delta fenA$ ) showed no significant difference compared to the wild type and still exerted antibacterial activity similar to that of GA1.

### 3.7. Minimum inhibitory concentration analyses of GA1 and its mutants

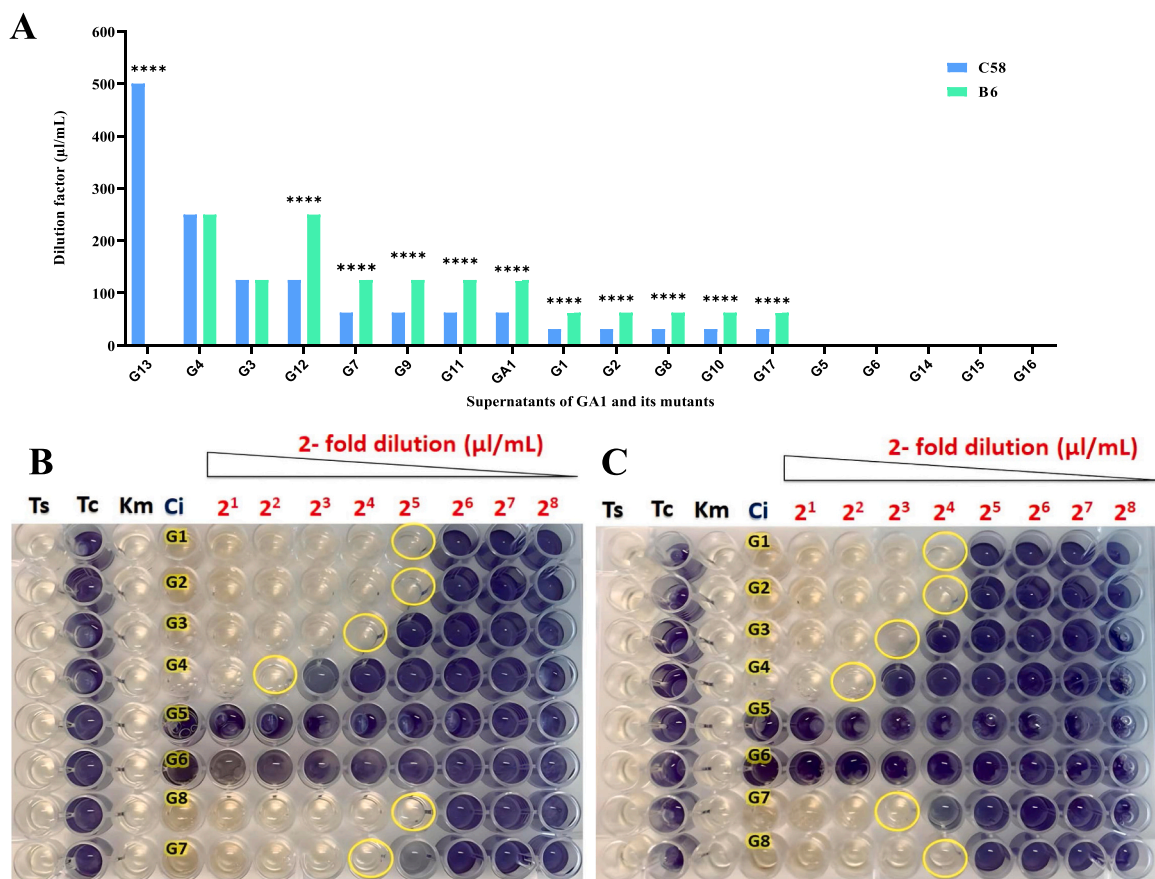
The MIC values of supernatants from GA1 and its various mutants were assessed against the target bacterial strains. According to the obtained results, *A. tumefaciens* C58 significantly displayed more sensitivity towards the majority of GA1 mutants compared to B6 strain. For instance, there was no visible growth of *Agrobacterium* C58 and B6 in wells containing GA1 supernatant at dilution factors of  $2^4$  (62.5  $\mu\text{L/mL}$ ) and  $2^3$  (125  $\mu\text{L/mL}$ ), respectively (Fig. 6). However, growth of *Agrobacterium* strains was observed in the wells with five mutant supernatants (G5:  $\Delta sfp$ , G6  $\Delta dfnA$ , G14:  $\Delta baeJ$ ,  $\Delta mlnA$ , G15:  $\Delta dfnA$ ,  $\Delta mlnA$  and G16:  $\Delta bacA$ ,  $\Delta mlnA$ ) at dilution factor of  $2^1$  to  $2^8$ .

The dilution factor required for inhibiting the growth of *Agrobacterium* C58 of the following strains: G1 ( $\Delta mlnA$ :  $2^5$ ), G2 ( $\Delta baeS$ :  $2^5$ ), G8 ( $\Delta baeJ$ :  $2^5$ ), G10 ( $\Delta fenA$ :  $2^5$ ) and G17 (*glycT*:  $2^5$ ) was lower compared to the wild type strain (GA1:  $2^4$ ). This result was consistent when testing against the B6 strain as well. This finding indicated that single interruption of these genes has no significant contribution in the inhibition of *Agrobacterium*. Instead, it shows that mutation in some genes often improve compound activity.

In addition, MIC determination confirmed the well diffusion tests for which, five mutants (G5, G6, G14, G15 and G16) were found to be



**Fig. 5.** Evaluating antibacterial activity by well-agar diffusion test (A2 and B2), diagram (A1 and B1), and heat map (A3 and B3) of GA1 and its mutants against *A. tumefaciens* C58 (A) and B6 (B). Data in the graphs show the mean and standard deviation of three replicates. Statistical analyses were determined by one-way ANOVA with Dunnett’s test for multiple comparisons. Asterisks indicate that the antagonistic activity of GA1 mutants against the bacterial pathogen was significantly different compared with that of the Wild type (GA1) (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ). Absence of asterisks indicates that  $p$  values above 0.05 were considered non-significant.



**Fig. 6.** Determination of MIC value of *B. velezensis* GA1 and its mutants against *Agrobacterium* strains (A) by microdilution assay using MTT as an indicator. The purple color showed bacterial growth due to the formazan formation, while the pale yellow indicated no bacterial growth. Yellow circles indicate the MIC value for each strain against *A. tumefaciens* C58 (B) and B6 (C). Statistical analysis of the data was performed with three replicates. Asterisks denote significant differences between *A. tumefaciens* C58 and B6 \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.0005$ , \*\*\*:  $p < 0.0001$ , as determined by two-way ANOVA with Tukey test. Absence of asterisks indicates that  $p$  values above 0.05 were considered non-significant.

unable to control *Agrobacterium* growth (CMI > 500 µl/mL).

#### 4. Discussion

Biological control using *Bacillus* genus have been reported to suppress plant diseases that are caused by various soil-borne pathogens (Wu et al., 2015; Slama et al., 2019; Mageshwaran et al., 2022). Based on a previous study, *B. velezensis* 32a was revealed as an effective biocontrol strain against *A. tumefaciens* strains (Ben Abdallah et al., 2015; Frikha-Gargouri et al., 2017b). The current study aimed to explore active compounds from *B. velezensis* 32a against *A. tumefaciens* and their potential to control crown gall through different molecular and biochemical approaches.

As determined by combining chromatographic (HPLC) and high resolution mass spectrometric technics (HR-MS), the 32a strain supernatant revealed the production of ten different compounds identified as surfactins, fengycins, iturin A and bacillomycin D as well as bacillibactin belonging to the lipopeptide group, three different kinds of polyketides (macrolactins, bacillaenes and oxydifficidin), and bacilysin and its chlorinated derivative; chlorotetaine.

*B. velezensis* 32a produces various isoforms of the major cyclic-lipopeptide families, including surfactin (C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, and C<sub>15</sub>), fengycin (A: C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>18</sub> or B C<sub>16</sub> and B C<sub>15</sub>), and iturin A or mycosubtilin (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, and C<sub>17</sub>) (Table 2). However, under RP-HPLC-MS, molecular weights alone did not allow us to identify exactly the corresponding compound of iturin since mycosubtilin is almost structurally identical to iturin. In fact, mycosubtilin's amino acids at positions 6 and 7 are D-Ser → L-Asn while in iturin A, these amino acids are inverted (D-

Asn → L-Ser) (Béchet et al., 2013). Therefore, tandem mass spectrometry (MS/MS) was conducted and our findings proved that the iturin lipopeptides in 32a was iturin A. Likewise, strain 32a was also identified to synthesize bacillomycin D (C<sub>16</sub>). These results were similar to a prior research, which documented that when the 32a strain was grown in an optimized medium (OM), it demonstrated the synthesis of various forms of surfactins (C<sub>12</sub> to C<sub>16</sub>), iturins (C<sub>14</sub> to C<sub>16</sub>) and fengycins (Fengycins A: C<sub>14</sub> to C<sub>17</sub> and fengycins B: C<sub>15</sub> to C<sub>17</sub>) (Ben Abdallah et al., 2015). In addition, these findings reinforce this previous study where no ion signals corresponding to the mass of bacillomycin D from cell free culture of 32a could be detected after 24 h. In fact, their detection could be attributed to the variations in growth conditions as noted in a previous study (Xu et al., 2014). This study revealed that the relative production of bacillomycin D in four *B. amyloliquefaciens* strains was significantly higher after 60 h compared to the levels observed after 12 and 36 h.

Based on the literature data, many *Bacillus* species are known for their ability to produce lipopeptides (Malviya et al., 2020), while the co-production of multiple iturin form is not commonly observed (Dunlap et al., 2019). For example, it has been reported that some *Bacillus* strains produce only one iturin form and some strains of *B. velezensis* clade particularly contains the single producers of bacillomycin D and L (Dunlap et al., 2019). For instance, recent characterization of *B. velezensis* UTB96 compared with the reference strain *B. velezensis* FZB42 revealed that the first produces iturin A, while the second produces only bacillomycin D (Koumoutsis et al., 2004; Vahidinab et al., 2022). Additionally, *B. velezensis* GA1 was found to produce only iturin A (Arguelles-Arias et al., 2009). In fact, to our knowledge, we documented for the first time a *B. velezensis* strain that could produce

two different types of iturinic compound. Our analysis highly recommends strain 32a as a microbial treasure of lipopeptides homologues.

Besides lipopeptides, three polyketides of difficidin, macrolactins and bacillaenes were identified in 32a supernatant. RP-HPLC-MS analysis showed that the strain 32a was able to produce four macrolactin forms (macrolactin A, macrolactin D, 7-O-malonyl-macrolactin A, 7-O-succinyl-macrolactin A), two bacillaene forms (A and B), and both bacilysin and its chlorinated derivative. Previous studies have also reported the presence of different types of polyketides molecules in *B. velezensis*, which exhibited antibacterial activity against phytopathogenic microorganisms (Cao et al., 2018). This polyketides diversity in 32a strain aligns with these findings. Interestingly, previous researchers have noted that only two strains, namely *B. subtilis* BGSC 1E2 (Rapp et al., 1988) and *Bacillus* sp. strain CS93 (Phister et al., 2004), were found to produce both bacilysin and chlorotetaine. Thus, to our knowledge, 32a could be added to the rarest *Bacillus* strains that co-produce both bacilysin and chlorotetaine.

To understand which specific metabolite(s) produced by the 32a strain are involved in the antagonistic activity, three families of purified lipopeptides from *B. subtilis* and different mixtures of these compounds were tested against *Agrobacterium* strains. Our results showed that lipopeptides were effective only at relatively high concentration of 1000 mg/L, which do not define this activity as antibacterial, but rather as a surfactant/detergent effect on the bacterial membranes. These results showed the weak antagonistic activities of purified lipopeptides against pathogenic *A. tumefaciens* strains. The lipopeptides produced by *Bacillus* spp. are better known for their antifungal activity against plant pathogens (especially iturins and fengycins) (Desmyttere et al., 2019; Platel et al., 2021; Leconte et al., 2022), with the exception of surfactin which is very active but mainly against *Legionella* (Vassaux et al., 2021). In our case, the slight antibacterial activity could be attributed to the purified surfactin and its combination with fengycin and M/I. These findings are in agreement with the literature, since surfactin is reported for its antibacterial activity against foodborne *B. cereus*, and human pathogens (Zhao et al., 2018; Barale et al., 2022). In addition surfactin was reported to exhibit a strong synergistic action in combination with iturin A (Maget-Dana et al., 1992) and fengycin against *Phytophthora infestans* (Wang et al., 2020) and *V. inaequalis* (Leconte et al., 2022; Desmyttere et al., 2019).

The high antibacterial potency of *B. velezensis* 32a against the pathogenic strains provided further evidence of the involvement of other antibacterial compounds which are coproduced with lipopeptides such as polyketides and bacilysin. To clarify their roles in the antibacterial activity, 32a deficient mutants defective in difficidin, macrolactin, bacillaene and bacilysin biosynthesis were generated. The  $\Delta dfnD$  deficient in difficidin was completely defective in antibacterial activity against *A. tumefaciens* C58 and B6. Among three other mutants, only  $\Delta mlnA$  was found to slightly decrease the activity. Interestingly, in depth investigation using various mutants of GA1 strain confirms the high contribution of difficidin and highlights a synergetic effect with macrolactin. These results are consistent with many studies that reported the antagonistic activity of difficidin, as well as its oxidized form; oxy-difficidin; against a broad range of both aerobic and anaerobic strains of bacteria (Zimmerman et al., 1987). In addition, it was reported that difficidin was crucial to the antagonistic activity of *B. amyloliquefaciens* AP193 against *P. syringe*, *R. radiobacter* and *X. campestris* (Hossain et al., 2015). Moreover, a recent investigation found that a butanolic extract from the *B. methylotrophicus* DR-08 broth culture containing difficidin and oxydifficidin showed antibacterial activity against *R. solanacearum*, the main cause of tomato bacterial wilt with a MIC value of 12.62 mg/L (Im et al., 2020).

Macrolactins were mainly reported as an antibacterial agent (Yuan et al., 2016). For example, it has been demonstrated that *A. tumefaciens* C58 is directly inhibited by the purified compound of macrolactin A and 7-O-succinyl-macrolactin A by decreasing the cell division of C58 and also by down-regulating the expression of the chromosomal virulence

genes of this pathogen (Chen et al., 2021).

Our findings contrast a previous investigation that demonstrated the synergistic effect between (oxy) difficidin and 2 H-bae (dihydrobacillaene) against *A. tumefaciens* through testing various single mutants and the  $\Delta baeJ$ ,  $\Delta dfnA$  (Andric et al., 2021). Nevertheless, our study reveals that the  $\Delta bacA$ ,  $\Delta mlnA$ , despite producing both difficidin and bacillaene, was unable to inhibit *Agrobacterium* growth. Consequently, the activity against *Agrobacterium* could not be attributed to the synergy between difficidin and bacillaene, but our results clearly emphasize the synergistic effect of difficidin and macrolactin.

According to our findings, bacillibactin deficient mutant of *B. velezensis* GA1 significantly decreased the antibacterial activity. Interestingly, our results showed that bacillibactin may potentially help to inhibit *Agrobacterium*. Similarly, according to a study by (Dimopoulou et al., 2020), iron starvation stimulated the production of bacillibactin, resulting in a significant increase of the bactericidal activity of *B. amyloliquefaciens* MBI600 against *P. syringae* pv. tomato both *in vitro* and *in vivo* conditions.

On the other hand, several studies have demonstrated that the glycosylation of macrolactin and bacillaene decreases their antibacterial efficacy and facilitates the detoxication of toxic metabolites (Qin et al., 2014; Li et al., 2021). This phenomenon elucidates why G17, a mutant unable to produce glycosylated form of bacillaene and macrolactins, exhibits the highest rate of growth inhibition.

*A. tumefaciens* strains have been found to respond differentially to lipopeptides and the majority of GA1 mutants, suggesting also that this phytopathogen respond differentially to polyketides. Our results are in agreement with several studies showing the high susceptibility of nopaline strain C58 to both agrocins produced by the non-pathogenic *A. radiobacter* strains (K84 and K1026) and *B. subtilis* strains (Rhouma et al., 2004, 2008). However, against the octopine strain B6, they were unable to produce any inhibition, indicating the resistance of this strain to treatments.

In conclusion, to elucidate the mechanisms by which *B. velezensis* 32a inhibits *A. tumefaciens* growth, we employed a comprehensive approach involving various molecular and biochemical techniques. Initially, RP-HPLC-MS analysis highlights the high capacity of 32a strain for synthesizing various isoforms of lipopeptides, polyketides and bacilysin. Secondly, using molecular and biochemical pathway from *B. velezensis* 32a and mutants from both 32a and GA1 revealed the high contribution of difficidin and point out its synergistic effect with macrolactin. Taken collectively, our results suggested that these two polyketides could serve as promising candidates to manage crown gall disease. To further analyse more precisely the impact of each of these molecules (difficidin and macrolactins) in the synergy antagonistic phenomenon we have revealed against the *Agrobacterium* phytopathogens, additional analyses such as fractionation of 32a compounds may be necessary.

#### CRedit authorship contribution statement

Sarra Yousfi, François Krier, François Coutte, Olfa Frikha-Gargouri: Conceptualization. Sarra Yousfi, Barbara Deracinois, Sébastien Steels: Investigation, Methodology. Sarra Yousfi, François Krier, Barbara Deracinois, François Coutte, Olfa Frikha-Gargouri: Data curation, Formal analysis. Sarra Yousfi: Writing – original draft, Writing – review & editing. François Krier, Barbara Deracinois, François Coutte, Olfa Frikha-Gargouri: Writing – review & editing. François Coutte, Olfa Frikha-Gargouri: Scientific project management. François Krier, Olfa Frikha-Gargouri: Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing interests.

## Data Availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Acknowledgments

Authors would like to thank the Partenariat Hubert Curien (PHC) UTIQUE n° 46421UF/21G0906 which helped finance part of the work. This work was also supported by a grant from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research and by the University of Lille through the CPER Bi Hauts Eco de France program funding administered by the Hauts-de-France Region. The authors would like to thank Dr Christophe Flahaut for his availability and advice on mass spectrometry analysis.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.micres.2023.127569](https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127569).

## References

- Agrios, G. (2005) Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 26–27, 398–401. - References - Scientific Research Publishing [WWW Document], n. d. URL [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2fqyw2orz553k1wOr45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1257092](https://www.scirp.org/(S(czeh2fqyw2orz553k1wOr45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1257092) (accessed 5.30.23).
- Andric, S., Meyer, T., Rigolet, A., Arias, A.A., Steels, S., Hoff, G., Höfte, M., Mot, R.D., McCann, A., Pauw, E.D., Ongena, M., 2021. Chelator sensing and lipopeptide interplay mediates molecular interspecies interactions between soil bacilli and pseudomonads. <https://doi.org/10.1101/2021.02.22.432387>.
- Arbsuwan, N., Payoungkiattikun, W., Sirithorn, P., Daduang, S., Jangpromma, N., Dhiravisit, A., Hahm, Y.T., Neubert, L.K., Klaynongsruang, S., 2018. Purification and characterization of macrolactins and amicoumacins from *Bacillus licheniformis* BFP011: a new source of food antimicrobial substances. *CyTA - J. Food* 16, 50–60. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1337047>.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Factor.* 8, 63 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>.
- Barale, S.S., Ghane, S.G., Sonawane, K.D., 2022. Purification and characterization of antibacterial surfactin isoforms produced by *Bacillus velezensis* SK. *AMB Express* 12, 7. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01348-3>.
- Béchet, M., Castéra-Guy, J., Guez, J.-S., Chihib, N.-E., Coucheney, F., Coutte, F., Fickers, P., Leclère, V., Wathel, B., Jacques, P., 2013. Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresour. Technol.* 145, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.123>.
- Beletskaya, T., Collins, C., Murray, P., 2015. Polyketides as a source of chemical diversity. *Phycotoxins*. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 381–405. <https://doi.org/10.1002/9781118500354.ch17>.
- Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O., Tounsi, S., 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *J. Appl. Microbiol.* 119, 196–207. <https://doi.org/10.1111/jam.12797>.
- Bobu, E., Nicu, R., Obrocea, P., Ardelean, E., Dunca, S., 2016. Antimicrobial properties of coatings based on chitosan derivatives for applications in sustainable paper conservation. *Cellul. Chem. Technol.* 689–699.
- Cao, Y., Pi, H., Chandransu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J.D., Cai, Y., 2018. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep.* 8, 4360 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>.
- Chandrasekaran, M., Lee, J.M., Ye, B.-M., Jung, S.M., Kim, J., Kim, J.-W., Chun, S.C., 2019. Isolation and Characterization of Avirulent and Virulent Strains of *Agrobacterium tumefaciens* from Rose Crown Gall in Selected Regions of South Korea. *Plants* 8, 452. <https://doi.org/10.3390/plants8110452>.
- Chen, L., Wang, X., Liu, Y., 2021. Contribution of macrolactin in *Bacillus velezensis* CLA178 to the antagonistic activities against *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Arch. Microbiol.* 203, 1743–1752. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02141-1>.
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., Borriss, R., 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* 140, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>.
- Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., Gottschalk, G., Süßmuth, R.D., Borriss, R., 2006. Structural and Functional Characterization of Three Polyketide Synthase Gene Clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* 188, 4024–4036. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-06>.
- Dagher, F., Nickzad, A., Zheng, J., Hoffmann, M., Déziel, E., 2021. Characterization of the biocontrol activity of three bacterial isolates against the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *MicrobiologyOpen* 10. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1202>.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2008. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophys. J.* 94, 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.
- Deravel, J., Lemière, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Béchet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprière, A., Jacques, P., 2014. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6255–6264. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5663-1>.
- Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., Jacques, P., 2019. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front. Microbiol.* 10, 2327 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>.
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D.G., Skandalis, N., 2020. Direct Antibiotic Activity of Bacillibactin Broadens the Biocontrol Range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere* 6, e00376-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00376-21>.
- Dunlap, C.A., Bowman, M.J., Rooney, A.P., 2019. Iturinic Lipopeptide Diversity in the *Bacillus subtilis* Species Group – Important Antifungals for Plant Disease Biocontrol Applications. *Front. Microbiol.* 10.
- Dussert, E., Tourret, M., Dupuis, C., Noblecourt, A., Behra-Miellet, J., Flahaut, C., Ravallec, R., Coutte, F., 2022. Evaluation of Antiradical and Antioxidant Activities of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strains. *Front. Microbiol.* 13.
- Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, Y., 2017. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiol. Res.* 199, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.004>.
- FAO (Ed.), 2019. Moving forward on food loss and waste reduction, The state of food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO, 2021. Scientific review of the impact of climate change on plant pests on behalf of the IPPC Secretariat. <https://doi.org/10.4060/cb4769en>.
- Fazle Rabbee, M., Baek, K.-H., 2020. Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. *Mol. Basel Switz.* 25, 4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>.
- Fedoroff, N.V., 2015. Food in a future of 10 billion. *Agric. Food Secur.* 4, 11 <https://doi.org/10.1186/s40066-015-0031-7>.
- Frikha-Gargouri, O., Ben Abdallah, D., Bhar, I., Tounsi, S., 2017b. *Front. Plant Sci.* 8, 1363.
- Frikha-Gargouri, O., Ben Abdallah, D., Ghorbel, I., Charfeddine, I., Jlaiei, L., Triki, M.A., Tounsi, S., 2017a. Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants: Potential of a *B. methylotrophicus* strain as a biological control agent for crown gall disease. *Pest Manag. Sci.* 73, 568–574. <https://doi.org/10.1002/ps.4331>.
- Gao, L., Han, J., Liu, H., Qu, X., Bie, X., 2017. Plipastatin and surfactin coproduction by *Bacillus subtilis* pB2-L and their effects on microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0874-y>.
- Guéroul-Fleury, A.-M., Shazand, K., Frandsen, N., Stragier, P., 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* 167, 335–336. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00652-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00652-4).
- Guez, J.-S., Vassaux, A., Larroche, C., Jacques, P., Coutte, F., 2021. New Continuous Process for the Production of Lipopeptide Biosurfactants in Foam Overflowing Bioreactor. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9.
- Gupta, A.K., Kamal, B., 2011. Pre-planting application of soil sterilants and herbicides for management of crown gall disease on Tolt' cherry rootstock. *Indian Counc. Agric. Res.*
- Gupta, A.K., Khosla, K., 2007. Integration of soil solarization and potential native antagonist for the management of crown gall on cherry rootstock colt. *Sci. Hortic.* 112, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.004>.
- Han, X., Shen, D., Xiong, Q., Bao, B., Zhang, W., Dai, T., Zhao, Y., Borriss, R., Fan, B., 2021. The Plant-Beneficial Rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 Controls the Soybean Pathogen *Phytophthora sojae* Due to Bacilysin Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e0160121 <https://doi.org/10.1128/AEM.01601-21>.
- Hoff, G., Arguelles Arias, A., Boubsi, F., Pršić, J., Meyer, T., Ibrahim, H.M.M., Steels, S., Luzuriaga, P., Legras, A., Franzil, L., Lequart-Pillon, M., Rayon, C., Osorio, V., de Pauw, E., Lara, Y., Deboever, E., de Coninck, B., Jacques, P., Deleu, M., Petit, E., Van Wuytswinkel, O., Ongena, M., 2021. Surfactin Stimulated by Pectin Molecular Patterns and Root Exudates Acts as a Key Driver of the Bacillus-Plant Mutualistic Interaction. *mBio* 12, e0177421. <https://doi.org/10.1128/mBio.01774-21>.
- Hossain, M.J., Ran, C., Liu, K., Ryu, C.-M., Rasmussen-Ivey, C.R., Williams, M.A., Hassan, M.K., Choi, S.-K., Jeong, H., Newman, M., Kloepper, J.W., Liles, M.R., 2015. Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum. *Front. Plant Sci.* 6 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00631>.
- Im, S.M., Yu, N.H., Joen, H.W., Kim, S.O., Park, H.W., Park, A.R., Kim, J.-C., 2020. Biological control of tomato bacterial wilt by oxydifficidin and difficidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08. *Pestic. Biochem. Physiol.* 163, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.007>.
- Islam, T., Rabbee, M.F., Choi, J., Baek, K.-H., 2022. Biosynthesis, Molecular Regulation, and Application of Bacilysin Produced by *Bacillus* Species. *Metabolites* 12, 397. <https://doi.org/10.3390/metabo12050397>.
- Jones, D.A., Kerr, A., 1989. *Agrobacterium radiobacter* strain K1026, a genetically engineered derivative of strain K84, for biological control of crown gall. *Plant Dis.* 73, 15–18. <https://doi.org/10.1094/pd-73-0015>.
- Role of Defense Enzymes in the Control of Plant Pathogenic Bacteria. In: Kannan, V.R., Bastas, K.K. (Eds.), 2015. in: Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria. CRC Press, pp. 328–339. <https://doi.org/10.1201/b18892-21>.
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R., 2004. Structural and Functional Characterization of Gene Clusters

- Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186, 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>.
- Krimi, Z., Petit, A., Mougel, C., Dessaux, Y., Nesme, X., 2002. Seasonal Fluctuations and Long-Term Persistence of Pathogenic Populations of *Agrobacterium* spp. in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3358–3365. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3358-3365.2002>.
- Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., Deweer, C., Krier, F., Deleu, M., Oste, S., Jacques, P., Coutte, F., 2022. Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*). *Microorganisms* 10, 1810. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>.
- Li, H., Han, X., Dong, Y., Xu, S., Chen, C., Feng, Y., Cui, Q., Li, W., 2021. Bacillaeen: Decomposition Trigger Point and Biofilm Enhancement in *Bacillus*. *ACS Omega* 6, 1093–1098. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03389>.
- Mageshwaran, V., Gupta, R., Singh, S., Sahu, P.K., Singh, U.B., Chakdar, H., Bagul, S.Y., Paul, S., Singh, H.V., 2022. Endophytic *Bacillus subtilis* antagonize soil-borne fungal pathogens and suppress wilt complex disease in chickpea plants (*Cicer arietinum* L.). *Front. Microbiol.* 13, 994847. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994847>.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., 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. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V).
- Malviya, D., Sahu, P.K., Singh, U.B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A.R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., Rai, J.P., Singh, H.V., Brahmaprakash, G.P., 2020. Lesson from Ecotoxicity: Revisiting the Microbial Lipopeptides for the Management of Emerging Diseases for Crop Protection. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 1434. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmood, G., Foster, G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
- Moriya, S., Iwanami, H., Haji, T., Okada, K., Shimizu, T., Suzuki, K., Kitamoto, N., Katayose, Y., Wu, J., Yamamoto, T., Abe, K., 2021. QTL analysis of crown gall disease resistance in apple: first plant R gene candidates effective against *Rhizobium rhizogenes* (Ti). *Tree Genet. Genomes* 17. <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01508-9>.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- Parker, J.B., Walsh, C.T., 2013. Action and timing of BacC and BacD in the late stages of biosynthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. *Biochemistry* 52, 889–901. <https://doi.org/10.1021/bi3016229>.
- Patel, P.S., Fisher, S., Pirmik, D., Aklonis, C., Meyers, E., 1995. Characterization and biological activity. *J. Antibiot.* 7 (Tokyo).
- Pei, D., Zhang, Q., Zhu, X., Zhang, L., 2022. Biological control of *Verticillium* wilt and growth promotion in tomato by rhizospheric soil-derived *Bacillus amyloliquefaciens* Oj-2.16. *Pathogens* 12, 37. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010037>.
- Phister, T.G., O'Sullivan, D.J., McKay, L.L., 2004. Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain cs93 isolated from pozol, a mexican fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 631–634. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.631-634.2004>.
- Platel, R., Sawicki, M., Esmael, Q., Randoux, B., Trapet, P., El Guilli, M., Chtaina, N., Arnould, S., Bricout, A., Rochex, A., Bourdon, N., Halama, P., Jacquard, C., Barka, E. A., Reignault, P., Magnin-Robert, M., Siah, A., 2021. Isolation and identification of lipopeptide-producing *Bacillus velezensis* strains from wheat phyllosphere with antifungal activity against the wheat pathogen *Zygomycetia tritici*. *Agronomy* 12, 95. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010095>.
- Qin, W., Liu, Y., Ren, P., Zhang, J., Li, H., Tian, L., Li, W., 2014. Uncovering a glycosyltransferase provides insights into the glycosylation step during macrolactin and bacillaene biosynthesis. *ChemBioChem* 15, 2747–2753. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402384>.
- Rapp, C., Jung, G., Katzer, W., Loeffler, W., 1988. Chlorotetain from *Bacillus subtilis*, an Antifungal Dipeptide with an Unusual Chlorine-containing Amino Acid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 1733–1734. <https://doi.org/10.1002/anie.198817331>.
- Rhouma, A., Ferchichi, A., Hafsa, M., Boubaker, A., 2004. Efficacy of the non-pathogenic *Agrobacterium* strains K84 and K1026 against crown gall in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 167–176.
- Rhouma, A., Bouri, M., Boubaker, A., Nesme, X., 2008. Potential effect of rhizobacteria in the management of crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar. *J. Plant Pathol.*
- Romero, J., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., 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.* MPMI 20, 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>.
- Salazar, F., Ortiz, A., Sansinenea, E., 2020. A strong antifungal activity of 7-O-succinyl macrolactin a vs macrolactin a from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. *Curr. Microbiol.* 77, 3409–3413. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02200-2>.
- Sambrook, J., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schneider, K., Chen, X.-H., Vater, J., Franke, P., Nicholson, G., Borriss, R., Stüssmuth, R. D., 2007. Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Nat. Prod.* 70, 1417–1423. <https://doi.org/10.1021/np070070k>.
- Shahid, I., Han, J., Hanoog, S., Malik, K.A., Borchers, C.H., Mehnaz, S., 2021. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. *Front. Sustain. Food Syst.* 5.
- Shim, J.-S., 1987. Biological control of crown gall: construction and testing of new biocontrol agents. *Phytopathology* 77, 463. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-463>.
- Slama, H.B., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F.N., Luptakova, L., Triki, M.A., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M.E., Belbahri, L., 2019. Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Front. Microbiol.* 9.
- Sopheareth, M., Chan, S., Naing, K.W., Lee, Y.S., Hyun, H.N., Kim, Y.C., Kim, K.Y., 2013. Biocontrol of late blight (*Phytophthora capsici*) disease and growth promotion of pepper by *Burkholderia cepacia* MPC-7. *Plant Pathol. J.* 29, 67–76. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2012.0114>.
- Sui, X., Han, X., Cao, J., Li, Y., Yuan, Y., Gou, J., Zheng, Y., Meng, C., Zhang, C., 2022. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* EM-1 associated with suppressive rhizosphere soil microbes against tobacco bacterial wilt. *Front. Microbiol.* 13, 940156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.940156>.
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guirao, A., Thonart, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1151–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>.
- Vahidinab, M., Adiek, I., Hosseini, B., Akintayo, S.O., Abrishamchi, B., Pfannstiel, J., Henkel, M., Lilge, L., Voegele, R.T., Hausmann, R., 2022. Characterization of *Bacillus velezensis* UTB96, demonstrating improved lipopeptide production compared to the strain *B. velezensis* FZB42. *Microorganisms* 10, 2225. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112225>.
- Vassaux, A., Rannou, M., Peers, S., Daboudet, T., Jacques, P., Coutte, F., 2021. Impact of the purification process on the spray-drying performances of the three families of lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 815337. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.815337>.
- Vater, J., Kahlitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S., 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6210–6219. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>.
- Wang, J., Zhang, R., Chen, X., Sun, X., Yan, Y., Shen, X., Yuan, Q., 2020. Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. *Microb. Cell. Factor.* 19. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01367-4>.
- Wilson, K.E., Flor, J.E., Schwartz, R.E., Joshua, H., Smith, J.L., Pelak, B.A., Liesch, J.M., Hensens, O.D., 1987. Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization. *J. Antibiot.* 40, 1682–1691. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1682>.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., Gao, X., 2015. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci. Rep.* 5, 12975. <https://doi.org/10.1038/srep12975>.
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., Zhang, R., 2013. Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Antifungal Activity and Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>.
- Xu, Z., Zhang, R., Wang, D., Qiu, M., Feng, H., Zhang, N., Shen, Q., 2014. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* sqr9 by altering the regulation of its degu phosphorylation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2941–2950. <https://doi.org/10.1128/AEM.03943-13>.
- Yuan, J., Zhao, M., Li, R., Huang, Q., Rensing, C., Raza, W., Shen, Q., 2016. Antibacterial compounds-macrolactin alters the soil bacterial community and abundance of the gene encoding PKS. *Front. Microbiol.* 7.
- Zhang, L., Sun, C., 2018. Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus magnaporthe grisea by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (18), e00445. <https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>.
- Zhao, P., Xue, Y., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D., Bai, X., Zuo, Y., Hu, Z., Zhang, F., 2018. Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides* 101, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.018>.
- Zimmerman, S.B., Schwartz, C.D., Monaghan, R.L., Pelak, B.A., Weissberger, B., Gillfillan, E.C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S.A., Tejera, E., Stapley, E.O., 1987. Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *J. Antibiot.* 40, 1677–1681. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1677>.

# *Références bibliographiques*



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- Agrawal, S., & Rami, E. (2022). A Review : *Agrobacterium*-mediated Gene Transformation to Increase Plant Productivity. *The Journal of Phytopharmacology*, 11(2), 111-117. <https://doi.org/10.31254/phyto.2022.11211>
- Agrios, G. (2005) *Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 26-27,398-401. - References—Scientific Research Publishing.* (s. d.). Consulté 30 mai 2023, à l'adresse [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1257092](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1257092)
- Agrios, G. N. (2008). *Plant pathology* (5th ed., [3rd print]). Elsevier Academic Press.
- Ahimou, F., Jacques, P., & Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 749-754. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00295-7)
- Aleti, G., Sessitsch, A., & Brader, G. (2015). Genome mining : Prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 192-203. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.003>
- Ali, S. A. M., Sayyed, R. Z., Mir, M. I., Khan, M. Y., Hameeda, B., Alkhanani, M. F., Haque, S., Mohammad Al Tawaha, A. R., & Poczai, P. (2022). Induction of Systemic Resistance in Maize and Antibiofilm Activity of Surfactin From *Bacillus velezensis* MS20. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879739>
- Allamane, S., Jourdes, P., Ratel, D., Vicat, J. M., Dupré, I., Lainé, M., Berger, F., Benabid, A. L., & Wion, D. (2000). Bacterial DNA methylation and gene transfer efficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3), 1261-1264. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3603>
- Andrić, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020). *Bacillus* Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>
- Andric, S., Meyer, T., Rigolet, A., Arias, A. A., Steels, S., Hoff, G., Höfte, M., Mot, R. D., McCann, A., Pauw, E. D., & Ongena, M. (2021). Chelator sensing and lipopeptide interplay mediates molecular interspecies interactions between soil bacilli and pseudomonads (p. 2021.02.22.432387). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.22.432387>
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1713(1), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>

- Arbsuwan, N., Payoungkiattikun, W., Sirithorn, P., Daduang, S., Jangpromma, N., Dhiravisit, A., Hahm, Y. T., Neubert, L. K., & Klaynongsruang, S. (2018). Purification and characterization of macrolactins and amicoumacins from *Bacillus licheniformis* BFP011 : A new source of food antimicrobial substances. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 50-60. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1337047>
- Arguelles Arias, A. (2011). *Gram-positive antibiotic biosynthetic clusters : A review* (p. 977-986).
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Arora, N., Verma, M., & Mishra, J. (2017). *Rhizobial Bioformulations : Past, Present and Future* (p. 69-99). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3_4)
- Aujoulat, F., Marchandin, H., Zorogniotti, I., Masnou, A., & Jumas-Bilak, E. (2015). *Rhizobium pusense* is the main human pathogen in the genus *Agrobacterium/Rhizobium*. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(5), 472.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.005>

## **B**

- Backer, R., Rokem, J., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria : Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Béchet, M., Castéra-Guy, J., Guez, J.-S., Chihib, N.-E., Coucheney, F., Coutte, F., Fickers, P., Leclère, V., Wathelet, B., & Jacques, P. (2013). Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 145, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.123>
- Beld, J., Sonnenschein, E. C., Vickery, C. R., Noel, J. P., & Burkart, M. D. (2014). The Phosphopantetheinyl Transferases : Catalysis of a Posttranslational Modification Crucial for Life. *Natural product reports*, 31(1), 61-108. <https://doi.org/10.1039/c3np70054b>
- Beletskaya, T., Collins, C., & Murray, P. (2015). Polyketides as a source of chemical diversity. In *Phycotoxins* (p. 381-405). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118500354.ch17>
- Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O., & Tounsi, S. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 196-207. <https://doi.org/10.1111/jam.12797>
- Ben Abdallah, D. B., Tounsi, S., Gharsallah, H., Hammami, A., & Frikha-Gargouri, O. (2018a). Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds

- against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(36), 36518-36529. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3570-1>
- Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O., & Tounsi, S. (2018b). Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. *Biological Control*, 124, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.013>
- Ben Abdallah, D., Tounsi, S., & Frikha-Gargouri, O. (2018c). Inoculum type affect the efficacy of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied Soil Ecology*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.10.010>
- Bergau, L., Shapleigh, J., Frostegård, A., & Bakken, L. (2008). Transcription and activities of NO<sub>x</sub> reductases in *Agrobacterium tumefaciens* : The influence of nitrate, nitrite and oxygen availability. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3070-3081. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01557.x>
- Besson, F., & Michel, G. (1987). Isolation and characterization of new iturins : Iturin D and iturin E. *The Journal of Antibiotics*, 40(4), 437-442. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.437>
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., & Delcambe, L. (1977). [The structure of bacillomycin L, an antibiotic from *Bacillus subtilis* (author's transl)]. *European Journal of Biochemistry*, 77(1), 61-67. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11641.x>
- Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2015). Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*, C(101), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>
- Birch, A. J., Massy-Westropp, R. A., & Moye, C. J. (1955). Studies in relation to biosynthesis. VII. 2-Hydroxy-6-methylbenzoic acid in *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Australian Journal of Chemistry*, 8(4), 539-544. <https://doi.org/10.1071/ch9550539>
- Bobu, E., Nicu, R., Obrocea, P., Ardelean, E., & Dunca, S. (2016). Antimicrobial properties of coatings based on chitosan derivatives for applications in sustainable paper conservation. *Cellulose Chemistry and Technology*.
- Bonmatin, J.-M., Lapr evote, O., & Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides : Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6(6), 541-556. <https://doi.org/10.2174/138620703106298716>
- Borriss, R., Chen, X.-H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spr orer, C., Junge, H., Vater, J., P uhler, A., & Klenk, H.-P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T : A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8), 1786-1801. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023267-0>

- Bouri, M., Chattaoui, M., Ben Gharsa, H., Mcclean, A., Kluepfel, D., Nesme, X., & Rhouma, A. (2016). Analysis of *Agrobacterium* populations isolated from Tunisian soils : Genetic structure, avirulent-virulent ratios and characterization of tumorigenic strains. *Journal of Plant Pathology*, 98. <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I2.032>
- Bouzar, H., & Jones, J. B. (2001). *Agrobacterium larrymoorei* sp. Nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 3), 1023-1026. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1023>
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L.-J., & Sessitsch, A. (2017). Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 61-83. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>
- Brencic, A., & Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 155-194. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.155-194.2005>
- Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T., & Stubbs, M. T. (2002). Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (London, England: 1993)*, 10(3), 301-310. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(02\)00716-5](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00716-5)
- Burr, T. J. (2004). Grape Crown Gall Biology and Strategies for Control. *Foundation Plant Services*.
- Butcher, R. A., Schroeder, F. C., Fischbach, M. A., Straight, P. D., Kolter, R., Walsh, C. T., & Clardy, J. (2007). The identification of bacillaène, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1506-1509. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610503104>

## C

- Cane, D. E., Prabhakaran, P. C., Tan, W., & Ott, W. R. (1991). Macrolide biosynthesis. 6 Mechanism of polyketide chain elongation. *Tetrahedron Letters*, 32(40), 5457-5460. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80057-D](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80057-D)
- Cao, G., Zhang, X., Zhong, L., & Lu, Z. (2011). A modified electro-transformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. *Biotechnology Letters*, 33(5), 1047-1051. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0531-x>
- Cao, Y., Pi, H., Chandransu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8(1), 4360. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10, 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>

- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., & Ongena, M. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(2), 87-100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
- Challis, G. L., & Naismith, J. H. (2004). Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current opinion in structural biology*, 14(6), 748-756. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.005>
- Chandrasekaran, M., Lee, J. M., Ye, B.-M., Jung, S. M., Kim, J., Kim, J.-W., & Chun, S. C. (2019). Isolation and characterization of avirulent and virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens* from rose crown gall in selected regions of south Korea. *Plants*, 8(11), 452. <https://doi.org/10.3390/plants8110452>
- Chen, L., Wang, X., & Liu, Y. (2021). Contribution of macrolactin in *Bacillus velezensis* CLA178 to the antagonistic activities against *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1743-1752. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02141-1>
- Chen, N., Liu, Y., Qin, P., Li, Y., Ma, D., Li, J., Shi, T., & Zhu, Z. (2021). Antibacterial Activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DQB-1 Isolated From the Cecum of Dezhou Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 102, 103616. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103616>
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007-1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>
- Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., & Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140(1-2), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>
- Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süßmuth, R. D., & Borriss, R. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4024-4036. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-06>
- Cho, J. Y., Kim, Dae, S., Park, H. J., Lim, J. H., Yun, H. I., Park, S. C., Kim, S. K., & Rhee, M. H. (2006). A Comparison of the Anti-inflammatory Activity of Surfactin A, B, C, and D from *Bacillus subtilis*. 16(10), 1656-1659.
- Cho, J.-C. (2021). Omics-based microbiome analysis in microbial ecology : From sequences to information. *Journal of Microbiology*, 59(3), 229-232. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0698-3>

- Cho, M. S., Jin, Y. J., Kang, B. K., Park, Y. K., Kim, C., & Park, D. S. (2018). Understanding the ontogeny and succession of *Bacillus velezensis* and *B. subtilis* subsp. *subtilis* by focusing on kimchi fermentation. *Scientific Reports*, 8(1), 7045. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25514-5>
- Cho, W.-I., & Chung, M.-S. (2020). *Bacillus* spores : A review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology*, 29(11), 1447-1461. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics : Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Chapter 23—Plasmids. In D. P. Clark, N. J. Pazdernik, & M. R. McGehee (Éds.), *Molecular Biology (Third Edition)* (p. 712-748). Academic Cell. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9>
- Collinge, D., Jensen, D., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M., & Shaw, R. (2022). Biological control of plant diseases – what has been achieved and what is the direction? *Plant pathology*.
- Conn, H. J. (1942). Validity of the Genus *Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology*, 44(3), 353-360.
- Costechareyre, D., Bertolla, F., & Nesme, X. (2009). Homologous recombination in *Agrobacterium* : Potential implications for the genomic species concept in bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 26(1), 167-176. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn236>
- Curran, S. C., Hagen, A., Poust, S., Chan, L. J. G., Garabedian, B. M., de Rond, T., Baluyot, M. J., Vu, J. T., Lau, A. K., Yuzawa, S., Petzold, C. J., Katz, L., & Keasling, J. D. (2018). Probing the flexibility of an iterative modular polyketide synthase with non-native substrates *in vitro*. *ACS Chemical Biology*, 13(8), 2261-2268. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00422>
- Cutignano, A., Cimino, G., Villani, G., & Fontana, A. (2009). Shaping the polypropionate biosynthesis in the solar-powered mollusc *Elysia viridis*. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 10(2), 315-322. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800531>

## D

- Dagher, F., Nickzad, A., Zheng, J., Hoffmann, M., & Déziel, E. (2021). Characterization of the biocontrol activity of three bacterial isolates against the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *MicrobiologyOpen*, 10(3). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1202>
- Dahmane, N. (2017). Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICES<sub>3</sub> et des facteurs influençant leur mobilité.

- Dan, A. K., Manna, A., Ghosh, S., Sikdar, S., Sahu, R., Parhi, P. K., & Parida, S. (2021). Molecular mechanisms of the lipopeptides from *Bacillus subtilis* in the apoptosis of cancer cells—A review on its current status in different cancer cell lines. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 3(Complete). <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2021.100019>
- Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*, 94(7), 2667-2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. In A. Fiechter (Éd.), *History of Modern Biotechnology I* (p. 1-39). Springer. [https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1)
- Deravel, J., Krier, F., & Jacques, P. (2014a). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*
- Deravel, J., Lemièrre, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Béchet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprêtre, A., & Jacques, P. (2014b). Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6255-6264. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5663-1>
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.1.47-64.1997>
- Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., & Jacques, P. (2019). Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two *Venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2327. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms—A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101754. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D. G., & Skandalis, N. (s. d.). Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere*, 6(4), e00376-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00376-21>
- Domingos, D. F., de Faria, A. F., de Souza Galaverna, R., Eberlin, M. N., Greenfield, P., Zucchi, T. D., Melo, I. S., Tran-Dinh, N., Midgley, D., & de Oliveira, V. M. (2015). Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 3155-3167. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6377-8>

- Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Müller, R., & Marahiel, M. A. (2004). Rational design of a bimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chemistry & Biology*, *11*(2), 261-271. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.01.013>
- Dufour, N., & Rao, R. P. (2011). Secondary metabolites and other small molecules as intercellular pathogenic signals. *FEMS Microbiology Letters*, *314*(1), 10-17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02154.x>
- Dufour, S., Deleu, M., Nott, K., Wathelet, B., Thonart, P., & Paquot, M. (2005). Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1726*(1), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.015>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Rooney, A. P. (2019). Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group – important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01794>
- Dunlap, C. A., Kim, S.-J., Kwon, S.-W., & Rooney, A. P. (2015). Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*(Pt\_7), 2104-2109. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000226>
- Dunlap, C. A., Kim, S.-J., Kwon, S.-W., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(3), 1212-1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>
- Dussert, E., Tourret, M., Dupuis, C., Noblecourt, A., Behra-Miellet, J., Flahaut, C., Ravallec, R., & Coutte, F. (2022). Evaluation of antiradical and antioxidant activities of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* Strains. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.914713>

## *E*

- EFSA Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP). (2014). Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. *EFSA Journal*, *12*(5), 3665. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3665>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcilli, P. S., Fernández Escámez, P. S., ... Herman, L. (2020). Scientific opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019). *EFSA Journal*, *18*(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5966>

- El Arbi, M., Rhouma, A., Chaari, A., & Nesme, X. (2011). Première observation de la maladie de la galle du collet causée par *Agrobacterium tumefaciens* sur l'olivier en Tunisie. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(4), 458-464. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.606430>
- Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380-386. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2023). Potential use of *Bacillus* spp. As an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. *Current Research in Biotechnology*, 5, 100128. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100128>

## F

- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*, 8, 22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018 : The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- FAO (Éd.). (2019). *Moving forward on food loss and waste reduction*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E. A., Jacquard, C., & Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*, 16(2), 177-187. <https://doi.org/10.1111/mpp.12170>
- Fazle Rabbee, M., & Baek, K.-H. (2020). Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21), 4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
- Fei, D., Liu, F.-F., Gang, H.-Z., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Ye, R.-Q., & Mu, B.-Z. (2020). A new member of the surfactin family produced by *Bacillus subtilis* with low toxicity on erythrocyte. *Process Biochemistry*, 94, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.022>
- Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., & Thomas, M. G. (2008). Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular pharmaceuticals*, 5(2), 191-211. <https://doi.org/10.1021/mp700137g>
- Feng, J., Gu, Y., Quan, Y., Zhang, W., Cao, M., Gao, W., Song, C., Yang, C., & Wang, S. (2015). Recruiting a new strategy to improve levan production in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep13814>
- Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides I. *Annual review of microbiology*.

- Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Peix, A., García-Fraile, P., & Velázquez, E. (2020). History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(1), 126046. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126046>
- Frikha-Gargouri, O., Abdallah, D., Bhar, I., & Tounsi, S. (2017). Antibiosis and *bmyB* gene presence as prevalent traits for the selection of efficient *Bacillus* Biocontrol agents against crown gall disease. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1363. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01363>
- Frikha-Gargouri, O., Ben Abdallah, D., Ghorbel, I., Charfeddine, I., Jlaiel, L., Triki, M. A., & Tounsi, S. (2017). Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants : Potential of a *B. methylotrophicus* strain as a biological control agent for crown gall disease. *Pest Management Science*, 73(3), 568-574. <https://doi.org/10.1002/ps.4331>
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and Related Genera : The aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*®, 94(11), 1245-1248. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245>

## G

- Gao, W., He, Y., Zhang, F., Zhao, F., Huang, C., Zhang, Y., Zhao, Q., Wang, S., & Yang, C. (2019). Metabolic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 for enhanced poly- $\gamma$ -glutamic acid synthesis. *Microbial Biotechnology*, 12(5), 932-945. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13446>
- Gerland, P., Raftery, A.E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick, B.K., Chunn, J., Lalic, N., Bay, G., Buettner, T., Heilig, G.K., & Wilmoth, J. (2014). World population stabilization unlikely this century. *Science*, 346(6206), 234-237. <https://doi.org/10.1126/science.1257469>
- Gevers, W., Kleinkauf, H., & Lipmann, F. (1968). The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60(1), 269-276.
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501-517. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.501>
- Ghazy, N., & El-Nahrawy, S. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1195-1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02113-5>
- Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., & Senesi, S. (2012). Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6540-6544. <https://doi.org/10.1128/AEM.01341-12>

- Glick, B. R. (2015). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer international publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0>
- Global Biocontrol Market Report—DunhamTrimmer. (s. d.). <https://Dunhamtrimmer.Com/>. Consulté 27 mars 2024, à l'adresse <https://dunhamtrimmer.com/reports/global-biocontrol-market-report/>
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., & Pang, C. H.-N. (1973). The Genus *Bacillus*. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture
- Grady, E. N., MacDonald, J., Ho, M. T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Renaud, J., & Yuan, Z.-C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
- Grünewald, J., & Marahiel, M. A. (2006). Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(1), 121-146. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.121-146.2006>
- Grünewald, J., & Marahiel, M. A. (2013). Chapter 21—Nonribosomal Peptide Synthesis. In A. J. Kastin (Éd.), *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)* (p. 138-149). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00021-X>
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., Huo, R., Wu, H., Borriss, R., & Gao, X. (2017). Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19).
- Guérout-Fleury, A.-M., Shazand, K., Frandsen, N., & Stragier, P. (1995). Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, 167(1-2), 335-336. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00652-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00652-4)
- Guez, J.-S., Coutte, F., Drucbert, A.-S., Chihib, N.-E., Danzé, P.-M., & Jacques, P. (2009). Resistance of the cell wall to degradation is a critical parameter for isolation of high quality RNA from natural isolates of *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, 191(8), 669-673. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0487-6>
- Guez, J.-S., Vassaux, A., Larroche, C., Jacques, P., & Coutte, F. (2021). New continuous process for the production of lipopeptide biosurfactants in foam overflowing bioreactor. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.678469>
- Guezennec, J. (2017). Chapitre X. Exopolysaccharides bactériens et bioremédiation des métaux : Contribution du milieu marin. In N. Morin-Crini & G. Crini (Éds.), *Eaux industrielles contaminées : Réglementation, paramètres chimiques et biologiques & procédés d'épuration innovants* (p. 307-322). Presses universitaires de Franche-Comté. <https://doi.org/10.4000/books.pufc.11117>

- Guo, M., Huang, Z., & Yang, J. (2017). Is there any crosstalk between the chemotaxis and virulence induction signaling in *Agrobacterium tumefaciens*? *Biotechnology Advances*, 35(4), 505-511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.008>
- Gupta, A. K., & Kamal, B. (2011). Pre-planting application of soil sterilents and herbicides for management of crown gall disease on Tolt' cherry rootstock. Indian council of agricultural research. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJAgS/article/view/2998>
- Gupta, A. K., & Khosla, K. (2007). Integration of soil solarization and potential native antagonist for the management of crown gall on cherry rootstock colt. *Scientia Horticulturae*, 112(1), 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.004>
- Gustafson, K., Roman, M., & Fenical, W. (1989). The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *Journal of the American Chemical Society*, 111(19), 7519-7524. <https://doi.org/10.1021/ja00201a036>

## H

- Haichar, F. el Z., Santaella, C., Heulin, T., & Achouak, W. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*, 77, 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Hamoen, L. W., Venema, G., & Kuipers, O. P. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis* : Shared use of regulators. *Microbiology*, 149(1), 9-17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26003-0>
- Han, X., Shen, D., Xiong, Q., Bao, B., Zhang, W., Dai, T., Zhao, Y., Borriss, R., & Fan, B. (2021). The plant-beneficial *Rhizobacterium Bacillus velezensis* FZB42 controls the soybean pathogen *Phytophthora sojae* due to bacilysin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(23), e0160121. <https://doi.org/10.1128/AEM.01601-21>
- Harwood, C. R., Mouillon, J.-M., Pohl, S., & Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 721-738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
- He, P., Hao, K., Blom, J., Rückert, C., Vater, J., Mao, Z., Wu, Y., Hou, M., He, P., He, Y., & Borriss, R. (2013). Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *Journal of Biotechnology*, 164(2), 281-291. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.12.014>
- Heerklotz, H., & Seelig, J. (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal: EBJ*, 36(4-5), 305-314. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0091-5>
- Heimerl, N., Hommel, E., Westermann, M., Meichsner, D., Lohr, M., Hertweck, C., Grossman, A. R., Mittag, M., & Sasso, S. (2018). A giant type I polyketide synthase participates in zygosporangium maturation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 95(2), 268-281. <https://doi.org/10.1111/tpj.13948>

- Helepciuc, F.-E., & Todor, A. (2023). Making the best of research investment in pathogens control through biocontrol. How is research correlated with agricultural microbial biological control product availability? *PLOS Pathogens*, *19*(1), e1011071. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011071>
- Helfrich, E. J. N., & Piel, J. (2016). Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Natural Product Reports*, *33*(2), 231-316. <https://doi.org/10.1039/C5NP00125K>
- Hert, A. P., & Jones, J. B. (2003). DISEASE | Crown Gall. In A. V. Roberts (Éd.), *Encyclopedia of Rose Science* (p. 140-144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00003-3>
- Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *48*(26), 4688-4716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., & Bechthold, A. (2007). Type II polyketide synthases : Gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Natural Product Reports*, *24*(1), 162-190. <https://doi.org/10.1039/B507395M>
- Hleba, L., Charousova, I., Cisarova, M., Kovacik, A., Kormanec, J., Medo, J., Bozik, M., & Javorekova, S. (2018). Rapid identification of streptomyces tetracycline producers by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, *53*(12), 1083-1093. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1474581>
- Hoff, G., Arguelles Arias, A., Boubsi, F., Pršić, J., Meyer, T., Ibrahim, H. M. M., Steels, S., Luzuriaga, P., Legras, A., Franzil, L., Lequart-Pillon, M., Rayon, C., Osorio, V., de Pauw, E., Lara, Y., Deboever, E., de Coninck, B., Jacques, P., Deleu, M., ... Ongena, M. (2021). Surfactin stimulated by pectin molecular patterns and root exudates acts as a key driver of the *Bacillus*-plant mutualistic interaction. *MBio*, *12*(6), e0177421. <https://doi.org/10.1128/mBio.01774-21>
- Horowitz, S., Gilbert, J. N., & Griffin, W. M. (1990). Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology*, *6*(4), 243-248. <https://doi.org/10.1007/BF01575868>
- Hossain, M., Ran, C., Liu, K., Ryu, C.-M., Rasmussen-Ivey, C., Williams, M., Hassan, M., Choi, S.-K., Jeong, H., Newman, M., Kloepper, J., & Liles, M. (2015). Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00631>
- Huang, Q., Lu, G., Shen, H.-M., Chung, M. C. M., & Ong, C. N. (2007). Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Medicinal Research Reviews*, *27*(5), 609-630. <https://doi.org/10.1002/med.20094>
- Hussein, W. (2019). Fengycin or plipastatin? A confusing question in Bacilli. *BioTechnologia*, *100*, 47-55. <https://doi.org/10.5114/bta.2019.83211>

Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). *Agrobacterium* -mediated plant transformation : Biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>

## I

Im, S. M., Yu, N. H., Joen, H. W., Kim, S. O., Park, H. W., Park, A. R., & Kim, J.-C. (2020). Biological control of tomato bacterial wilt by oxydifficidin and difficidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.007>

Inès, M., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants : Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71, 100-112. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>

Islam, T., Rabbee, M. F., Choi, J., & Baek, K.-H. (2022). Biosynthesis, molecular regulation, and application of bacilysin produced by *Bacillus* Species. *Metabolites*, 12(5), 397. <https://doi.org/10.3390/metabo12050397>

## J

Jacques, P. (2011). Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In G. Soberón-Chávez (Éd.), *Biosurfactants : From Genes to Applications* (p. 57-91). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_3)

Jang, K.-H., & Britz, M. L. (2000). Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants. *Biotechnology Letters*, 22(7), 539-545. <https://doi.org/10.1023/A:1005629224109>

Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S., & Saxild, H. H. (2002). Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 197-200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11009.x>

Jenke-Kodama, H., Sandmann, A., Müller, R., & Dittmann, E. (2005). Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. *Molecular Biology and Evolution*, 22(10), 2027-2039. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi193>

Jiang, C.-H., Yao, X.-F., Mi, D.-D., Li, Z.-J., Yang, B.-Y., Zheng, Y., Qi, Y.-J., & Guo, J.-H. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* F21 against *Fusarium* wilt on watermelon. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00652>

Johnsborg, O., Eldholm, V., & Håvarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation : Prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158(10), 767-778. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.004>

Jones, D. A., & Kerr, A. (1989). *Agrobacterium radiobacter* strain K1026, a genetically engineered derivative of stain K84, for biological control of crown gall. *Plant Disease*, 73(1), 15-18. <https://doi.org/10.1094/pd-73-0015>

Jones, R. A. C., & Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases : Current status and future perspectives. *Annual Review of Virology*, 6(1), 387-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015606>

Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ  $\beta$ -galactosidase : Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 21(12), 1792-1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>

## K

Kado, C. I. (2002). *Crown gall. The Plant Health Instructor*. doi : 10.1094. PHI-I-2002-1118-01.

Kang, X., Guo, Y., Leng, S., Xiao, L., Wang, L., Xue, Y., & Liu, C. (2019). Comparative transcriptome profiling of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat roots in the absence and presence of biocontrol *Bacillus velezensis* CC09. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1474. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01474>

Kang, X., Zhang, W., Cai, X., Zhu, T., Xue, Y., & Liu, C. (2018). *Bacillus velezensis* CC09 : A potential ‘Vaccine’ for controlling wheat diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 31(6), 623-632. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-17-0227-R>

Kannan, V. R., & Bastas, K. K. (Éds.). (2015). Role of defense enzymes in the control of plant pathogenic bacteria. In sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria (0 éd., p. 328-339). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18892-21>

Katsuyama, Y., Funai, N., Miyahisa, I., & Horinouchi, S. (2007). Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chemistry & Biology*, 14(6), 613-621. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.05.004>

Keatinge-Clay, A. T. (2012). The structures of type I polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 29(10), 1050-1073. <https://doi.org/10.1039/c2np20019h>

Kelesidis, T. (2014). The interplay between daptomycin and the immune system. *Frontiers in Immunology*, 5, 52. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00052>

Khalid, F., Khalid, A., Fu, Y., Hu, Q., Zheng, Y., Khan, S., & Wang, Z. (2021). Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed : A review. *Journal of Microbiology*, 59(7), 627-633. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1161-1>

Khan, A. A., Bacha, N., Ahmad, B., Lutfullah, G., Farooq, U., & Cox, R. J. (2014). Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(11), 859-870. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230>

Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D. C., Otte, M. M., Wang, R., Ferguson, C. C., Eichenberger, P., & Driks, A. (2006). The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology*, 59(2), 487-502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04968.x>

- Kim, J.-A., Song, J.-S., Kim, P. I., Kim, D.-H., & Kim, Y. (2022). *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a promising agent for biocontrol of plant pathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 8(10), 1053. <https://doi.org/10.3390/jof8101053>
- Kim, K. S., Baek, C. H., Lee, J. K., Yang, J. M., & Farrand, S. K. (2001). Intracellular accumulation of mannopine, an opine produced by crown gall tumors, transiently inhibits growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 14(6), 793-803. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.793>
- Kohli, G. S., John, U., Figueroa, R. I., Rhodes, L. L., Harwood, D. T., Groth, M., Bolch, C. J. S., & Murray, S. A. (2015). Polyketide synthesis genes associated with toxin production in two species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae). *BMC Genomics*, 16(1), 410. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1625-y>
- Kohli, R. M., Trauger, J. W., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., & Walsh, C. T. (2001). Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 40(24), 7099-7108. <https://doi.org/10.1021/bi010036j>
- Kolek, J., Sedlar, K., Provaznik, I., & Patakova, P. (2016). Dam and Dcm methylations prevent gene transfer into *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 : Development of methods for electrotransformation, conjugation, and sonoporation. *Biotechnology for Biofuels*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0436-y>
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084-1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- Kourmentza, K., Gromada, X., Michael, N., Degraeve, C., Vanier, G., Ravallec-Plé, R., Coutte, F., Karatzas, K., & Jauregi, P. (2020). Antimicrobial activity of lipopeptide biosurfactants against foodborne pathogen and food spoilage microorganisms and their cytotoxicity. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561060>
- Kuchibiro, T., Hirayama, K., Houdai, K., Nakamura, T., Ohnuma, K., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2018). First case report of sepsis caused by *Rhizobium pusense* in Japan. *JMM Case Reports*, 5(1), e005135. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005135>
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. In D. K. Maheshwari (Éd.), *Bacteria in Agrobiolgy : Crop Ecosystems* (p. 37-59). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2)
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., ... Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256. <https://doi.org/10.1038/36786>

Kuzmanović, N., Puławska, J., Prokić, A., Ivanović, M., Zlatković, N., Jones, J. B., & Obradović, A. (2015). *Agrobacterium arsenijevicii* sp. Nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(6), 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.001>

## L

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2013). *Agrobacterium*. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (p. 52-54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00025-5>

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2022). *Agrobacterium*. in *reference module in life sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822563-9.00066-4>

Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., & Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily—The phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology*, 3(11), 923-936. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90181-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90181-7)

Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., Shams, M., Abrouk, D., Lavire, C., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Guéguen, L., Daubin, V., Muller, D., & Nesme, X. (2011). Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biology and Evolution*, 3, 762-781. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr070>

Lautru, S., & Challis, G. L. (2004). Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 6), 1629-1636. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26837-0>

Le Mire, G., Siah, A., Brisset, M.-N., Gaucher, M., Deleu, M., & Jijakli, M. (2018). Surfactin protects wheat against *Zymoseptoria tritici* and activates both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent defense responses. *Agriculture*, 8(1), 11. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010011>

Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., & Jacques, P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Archives of Microbiology*, 186(6), 475-483. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0163-z>

Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., Deweer, C., Krier, F., Deleu, M., Oste, S., Jacques, P., & Coutte, F. (2022). Assessment of lipopeptide mixtures produced by *Bacillus subtilis* as biocontrol products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*). *Microorganisms*, 10(9), 1810. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>

Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). Rapamycin : One Drug, Many Effects. *Cell Metabolism*, 19(3), 373-379. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>

Li, X., Munir, S., Xu, Y., Wang, Y., & He, Y. (2021). Combined mass spectrometry-guided genome mining and virtual screening for acaricidal activity in secondary metabolites of *Bacillus velezensis* W1. *RSC Advances*, 11(41), 25441-25449. <https://doi.org/10.1039/D1RA01326B>

- Lilge, L., Ersig, N., Hubel, P., Aschern, M., Pillai, E., Klausmann, P., Pfannstiel, J., Henkel, M., Morabbi Heravi, K., & Hausmann, R. (2022). Surfactin shows relatively low antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and other bacterial model organisms in the absence of synergistic metabolites. *Microorganisms*, 10(4), 779. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040779>
- Lim, S. M., Yoon, M.-Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H., & Kim, J.-C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic Fungi. *The Plant Pathology Journal*, 33(5), 488-498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Liu, J., Wang, Y., Lu, Y., Ni, X., Guo, X., Zhao, J., Chen, J., Dele-Osibanjo, T., Zheng, P., Sun, J., & Ma, Y. (2018). Mutations in peptidoglycan synthesis gene ponA improve electrotransformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(24), e02225-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02225-18>
- Luo, C., Zhou, H., Zou, J., Wang, X., Zhang, R., Xiang, Y., & Chen, Z. (2015). Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1897-1910. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6195-4>
- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., & Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture : An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Lyng, M., Jørgensen, J. P. B., Schostag, M. D., Jarmusch, S. A., Aguilar, D. K. C., Lozano-Andrade, C. N., & Kovács, Á. T. (2024). Competition for iron shapes metabolic antagonism between *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas marginalis*. *The ISME Journal*, 18(1), wrad001. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrad001>

## M

- Ma, Z., Wang, N., Hu, J., & Wang, S. (2012). Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *The Journal of Antibiotics*, 65(6), 317-322. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.19>
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S.-W., & Sa, T.-M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. Nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2490-2495. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.015487-0>
- Maget-Dana, R., Ptak, M., Peypoux, F., & Michel, G. (1985). Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 815(3), 405-409. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90367-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90367-0)
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., & Ptak, M. (1992). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74(12), 1047-1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V)

- Malki, A. M., Alaeq, R. A., Alosaimi, A. A., Ageeli, M. M., Alshehri, G. M., Shati, R. O., Almalki, T. J., Almalki, A. A., Alotaibi, K. N., Alsaedi, K. A., & Alheddi, A. M. (2023). Antibiotic synergy as a strategy for combating multidrug-resistant bacteria : A review of mechanisms and clinical implications. *International Journal Of Community Medicine And Public Health*, 10(10), 3885-3890. <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20232868>
- Mandwal, A. (2022). Diverse survival functions of secondary metabolites in nature. In *Secondary Metabolites—Trends and Reviews*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101977>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology : Top 10 plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Mareš, J., Hájek, J., Urajová, P., Kopecký, J., & Hrouzek, P. (2014). A Hybrid non-ribosomal peptide/polyketide synthetase containing fatty-acyl ligase (FAAL) synthesizes the  $\beta$ -Amino fatty acid lipopeptides puwainaphycins in the *Cyanobacterium cylindrospermum alatosporum*. *PLoS ONE*, 9(11), e111904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111904>
- Martínez-Núñez, M. A., & López, V. E. L. y. (2016). Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0057-6>
- Marty, L. (2016). Structures et spécificités de Protéines Périplasmiques de Fixation pour les mannitylopinés chez *Agrobacterium tumefaciens*. [Phdthesis, Université Paris-Saclay]. <https://theses.hal.science/tel-01884406>
- Mary, C., & Baron, C. (2019). Bases moléculaires de l'infection de plantes par *Agrobacterium tumefaciens* via un système de sécrétion de type IV. *Biochemistry and Cell Biology*, 97(3), 215-223. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0160>
- Medeot, D. B., Fernandez, M., Morales, G. M., & Jofré, E. (2019). Fengycins from *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 exhibit antibacterial activity by producing alterations on the cell surface of the pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03107>
- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents : Applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 473050. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
- Mhammedi, A., Peypoux, F., Besson, F., & Michel, G. (1982). Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group : Isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 35(3), 306-311. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.35.306>
- Mihalache, G., Balaes, T., Gostin, I., Stefan, M., Coutte, F., & Krier, F. (2018). Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants.

- Minto, R. E., & Townsend, C. A. (1997). Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Chemical Reviews*, 97(7), 2537-2556. <https://doi.org/10.1021/cr960032y>
- Moldovan, C.-V., Savu, M., Dussert, E., Aboubacar, H., Sarbu, L. G., Matiut, S., Cudenneq, B., Krier, F., Ravallec, R., Birsa, L. M., & Stefan, M. (2022). Synthetic flavonoid BrCl-Flav—An alternative solution to combat ESKAPE pathogens. *Antibiotics*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101389>
- Molinatto, G., Puopolo, G., Sonogo, P., Moretto, M., Engelen, K., Viti, C., Ongena, M., & Pertot, I. (2016). Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499, a rhizobacterium that triggers plant defences and inhibits fungal phytopathogens. *Journal of Biotechnology*, 238, 56-59. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.013>
- Moriya, S., Iwanami, H., Haji, T., Okada, K., Shimizu, T., Suzaki, K., Kitamoto, N., Katayose, Y., Wu, J., Yamamoto, T., & Abe, K. (2021). QTL analysis of crown gall disease resistance in apple : First plant R gene candidates effective against *Rhizobium rhizogenes* (Ti). *Tree Genetics & Genomes*, 17(3). <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01508-9>
- Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., De Lajudie, P., & Lindström, K. (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae : Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(2), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>

## N

- Nagao, T., Adachi, K., Sakai, M., & Nishijima, M. (s. d.). Novel macrolactins as antibiotic lactones from a marine bacterium. *THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, 7.
- Nagao, T., Adachi, K., Sakai, M., Nishijima, M., & Sano, H. (2001). Novel macrolactins as antibiotic lactones from a marine bacterium. *The Journal of Antibiotics*, 54(4), 333-339. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.54.333>
- Naruse, N., Tenmyo, O., Kobaru, S., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M., & Oki, T. (1990). Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 43(3), 267-280. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.43.267>
- Nasir, M. N., Benichou, E., Guez, J. S., Jacques, P., Brevet, P.-F., & Besson, F. (2012). Second harmonic generation to monitor the interactions of the antimicrobial mycosubtilin with membrane-mimicking interfacial monolayers. *BioNanoScience*, 2(2), 108-112. <https://doi.org/10.1007/s12668-012-0037-6>
- Nazir, N., Kamili, A., & Shah, D. (2019). Mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth-A Review.

Nguyen, M. L., Glaes, J., Spaepen, S., Bodson, B., du Jardin, P., & Delaplace, P. (2019). Biostimulant effects of *Bacillus* strains on wheat from *in vitro* towards field conditions are modulated by nitrogen supply. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 182(3), 325-334. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700610>

## O

Ongena, M., & Jacques, P. (2008b). *Bacillus* lipopeptides : Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Ophel, K., & Kerr, A. (1990). *Agrobacterium vitis* sp. Nov. For Strains of *Agrobacterium* biovar 3 from Grapevines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(3), 236-241. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-236>

## P

Pandin, C., Le Coq, D., Deschamps, J., Védie, R., Rousseau, T., Aymerich, S., & Briandet, R. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713 : A biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease. *Journal of Biotechnology*, 278, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.014>

Pankewitz, F., & Hilker, M. (2008). Polyketides in insects : Ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(2), 209-226. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00040.x>

Parker, J. B., & Walsh, C. T. (2013). Action and timing of *BacC* and *BacD* in the late stages of biosynthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. *Biochemistry*, 52(5), 889-901. <https://doi.org/10.1021/bi3016229>

Parthasarathy, R., & Sathiyabama, M. (2015). Lovastatin-producing endophytic fungus isolated from a medicinal plant *Solanum xanthocarpum*. *Natural Product Research*, 29(24), 2282-2286. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1016938>

Patel, P. S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., & Meyers, E. (1995). Characterization and biological activity. *THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, 7.

Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation : A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 962619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>

Pei, D., Zhang, Q., Zhu, X., & Zhang, L. (2022). Biological control of *Verticillium* wilt and growth promotion in tomato by rhizospheric soil-derived *Bacillus amyloliquefaciens* Oj-2.16. *Pathogens*, 12(1), 37. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010037>

- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P. S., Faulds, C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020). *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture : Recent studies and innovations. *Planta*, 251(3), 70. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., & Delcambe, L. (1981). Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *European Journal of Biochemistry*, 118(2), 323-327. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06405.x>
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Delcambe, L., & Das, B. C. (1978). Structure de l'iturine C de *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron*, 34(8), 1147-1152. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(78\)80138-0](https://doi.org/10.1016/0040-4020(78)80138-0)
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Lenzen, C., Dierickx, L., & Delcambe, L. (1980). Characterization of a new antibiotic of iturin group : Bacillomycin D. *The Journal of Antibiotics*, 33(10), 1146-1149. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.33.1146>
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., Labbé, H., Das, B. C., Ptak, M., & Michel, G. (1991). Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7]surfactin. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 101-106. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16349.x>
- Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B. C., & Lederer, E. (1978). Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 17(19), 3992-3996. <https://doi.org/10.1021/bi00612a018>
- Peypoux, F., Marion, D., Maget-Dana, R., Ptak, M., Das, B. C., & Michel, G. (1985). Structure of bacillomycin F, a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. *European Journal of Biochemistry*, 153(2), 335-340. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09307.x>
- Peypoux, F., Michel, G., & Delcambe, L. (1976). The structure of mycosubtilin, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis* (author's transl). *European Journal of Biochemistry*, 63(2), 391-398. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10240.x>
- Peypoux, F., Pommier, M. T., Marion, D., Ptak, M., Das, B. C., & Michel, G. (1986). Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics*, 39(5), 636-641. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.636>
- Phister, T. G., O'Sullivan, D. J., & McKay, L. L. (2004). Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from pozol, a mexican fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 631-634. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.631-634.2004>
- Pitzschke, A., & Hirt, H. (2010). New insights into an old story : *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29(6), 1021-1032. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.8>
- Platel, R., Lucau-Danila, A., Baltenweck, R., Maia-Grondard, A., Trapet, P., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Duret, M., Halama, P., Hilbert, J.-L., Coutte, F., Jacques, P., Huguency, P.,

- Reignault, P., & Siah, A. (2023). Deciphering immune responses primed by a bacterial lipopeptide in wheat towards *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074447>
- Platel, R., Sawicki, M., Esmaeel, Q., Randoux, B., Trapet, P., El Guilli, M., Chtaina, N., Arnauld, S., Bricout, A., Rochex, A., Bourdon, N., Halama, P., Jacquard, C., Barka, E. A., Reignault, P., Magnin-Robert, M., & Siah, A. (2021). Isolation and identification of lipopeptide-producing *Bacillus velezensis* strains from wheat phyllosphere with antifungal activity against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Agronomy*, *12*(1), 95. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010095>
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* (p. 129-157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00007-0>
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., & Berkeley, R. C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. Nov., nom. Rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *37*(1), 69-71. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-69>
- Pršić, J., & Ongena, M. (2020). Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.594530>
- Puławska, J., Willems, A., De Meyer, S. E., & Süle, S. (2012). *Rhizobium nepotum* sp. Nov. isolated from tumors on different plant species. *Systematic and Applied Microbiology*, *35*(4), 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.03.001>
- Pyne, M. E., Moo-Young, M., Chung, D. A., & Chou, C. P. (2013). Development of an electrotransformation protocol for genetic manipulation of *Clostridium pasteurianum*. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-50>

## Q

- Qin, W., Liu, Y., Ren, P., Zhang, J., Li, H., Tian, L., & Li, W. (2014). Uncovering a glycosyltransferase provides insights into the glycosylation step during macrolactin and bacillaène biosynthesis. *ChemBioChem*, *15*(18), 2747-2753. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402384>
- Qin, W.-Q., Fei, D., Zhou, L., Guo, Y.-J., An, S., Gong, O.-H., Wu, Y.-Y., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., & Mu, B.-Z. (2023). A new surfactin-C17 produced by *Bacillus subtilis* TD7 with a low critical micelle concentration and high biological activity. *New Journal of Chemistry*, *47*(16), 7604-7612. <https://doi.org/10.1039/D3NJ00123G>

## R

- Rabbee, M., Ali, Md., Choi, J., Hwang, B., Jeong, S., & Baek, K. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, *24*(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>

- Rabbee, M. F., Hwang, B.-S., & Baek, K.-H. (2023). *Bacillus velezensis* : A beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture. *Agronomy*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030840>
- Ramírez-Bahena, M. H., Vial, L., Lassalle, F., Diel, B., Chapulliot, D., Daubin, V., Nesme, X., & Muller, D. (2014). Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium/Rhizobium* supercluster characterized by the presence of a linear chromid. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 73, 202-207. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.005>
- Rapp, C., Jung, G., Katzer, W., & Loeffler, W. (1988). Chlorotetain from *Bacillus subtilis*, an antifungal dipeptide with an unusual chlorine-containing amino acid. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27(12), 1733-1734. <https://doi.org/10.1002/anie.198817331>
- Raval, K., Vaswani, S., & Majumder, D. (2012). Microbial biotransformation : Pharmaceutical peptides. *Journal of Biological and Food Science Research*, 1, 1-14.
- Regmi, S., Choi, Y. S., Choi, Y. H., Kim, Y. K., Cho, S. S., Yoo, J. C., & Suh, J.-W. (2017). Antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* CSB138 : Characterization, killing kinetics, and synergistic potency. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 20(1), 43-53. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.284>
- Rhouma, A., Ferchichi, A., Hafsa, M., & Boubaker, A. (2004). Efficacy of the non-pathogenic *Agrobacterium* strains K84 and K1026 against crown gall in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(2), 167-176.
- Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., & Sagen, H. (s. d.). Studies on infectious hairy root of nursery Apple trees. *Journal of Agricultural Research*. Consulté 9 avril 2024, à l'adresse <https://www.semanticscholar.org/paper/Studies-on-infectious-hairy-root-of-nursery-Apple-Riker-Banfield/9603f6b9a4cb759d468f50c3d7f5712f158f342c>
- Riley, L. A., & Guss, A. M. (2021). Approaches to genetic tool development for rapid domestication of non-model microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01872-z>
- Rizzo, D. M., Lichtveld, M., Mazet, J. A. K., Togami, E., & Miller, S. A. (2021). Plant health and its effects on food safety and security in a One Health framework : Four case studies. *One Health Outlook*, 3(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00038-7>
- Robbins, T., Liu, Y.-C., Cane, D. E., & Khosla, C. (2016). Structure and mechanism of assembly line polyketide synthases. *Current Opinion in Structural Biology*, 41, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.05.009>
- Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2014). Chapter 1—Introduction to the analysis of bioactive compounds in marine samples. In T. Rocha-santos & A. C. Duarte (Éds.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 65, p. 1-13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63359-0.00001-X>

- Rokem, J. S., Lantz, A. E., & Nielsen, J. (2007). Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports*, 24(6), 1262-1287. <https://doi.org/10.1039/b617765b>
- Romero-Tabarez, M., Jansen, R., Sylla, M., Lünsdorf, H., Häußler, S., Santosa, D. A., Timmis, K. N., & Molinari, G. (2006). 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(5), 1701-1709. <https://doi.org/10.1128/aac.50.5.1701-1709.2006>
- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2010). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 141-172. <https://doi.org/10.3390/ijms12010141>
- Rudd, B. A., & Hopwood, D. A. (1979). Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, 114(1), 35-43. <https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-35>
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero-Rodriguez, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodriguez-Sanoja, R., Sánchez, S., & Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites : Regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36, 146-167. <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. Nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 191-195. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63310-0>

## S

- Salazar, F., Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2020). A strong antifungal activity of 7-O-Succinyl macrolactin A vs macrolactin A from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. *Current Microbiology*, 77(11), 3409-3413. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02200-2>
- Salmassi, T. M., Venkateswaren, K., Satomi, M., Newman, D. K., & Hering, J. G. (2002). Oxidation of Arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. Nov., Isolated from hot creek, california. *Geomicrobiology Journal*, 19(1), 53-66. <https://doi.org/10.1080/014904502317246165>
- Santiago, C., Sun, L., Munro, M. H. G., & Santhanam, J. (2014). Polyketide and benzopyran compounds of an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum mollissimum* : Biological activity and structure. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(8), 627-632. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0030>
- Sapunaric, F., Franssen, C., Stefanic, P., Amoroso, A., Dardenne, O., & Coyette, J. (2003). Redefining the role of *psr* in  $\beta$ -Lactam resistance and cell autolysis of *Enterococcus hirae*. *Journal of Bacteriology*, 185(20), 5925-5935. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.5925-5935.2003>

- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides : Biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 496. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>
- Schneider, K., Chen, X.-H., Vater, J., Franke, P., Nicholson, G., Borriss, R., & Süssmuth, R. D. (2007). Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Natural Products*, 70(9), 1417-1423. <https://doi.org/10.1021/np070070k>
- Schultz, J., & Rosado, A. S. (2020). Extreme environments : A source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 24(2), 189-206. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01151-2>
- Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides : From genes to products. *Natural Product Reports*, 20(3), 275-287. <https://doi.org/10.1039/b111145k>
- Scientific review of the impact of climate change on plant pests.* (2021). FAO on behalf of the IPPC Secretariat. <https://doi.org/10.4060/cb4769en>
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L., La Marta, J., & Carrillo, R. (2016). The generally recognized as safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Industrial Biotechnology*, 12(5), 295-302. <https://doi.org/10.1089/ind.2016.0011>
- Shahid, I., Han, J., Hanoq, S., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. (2021). Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2021.605195>
- Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X., & Lavire, C. (2013). Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. Using recA-based PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(5), 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.002>
- Shim, J.-S. (1987). Biological Control of Crown Gall : Construction and testing of new biocontrol agents. *Phytopathology*, 77(3), 463. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-463>
- Shushni, M. A. M., Singh, R., Mentel, R., & Lindequist, U. (2011). Balticolid : A new 12-membered macrolide with antiviral activity from an ascomycetous fungus of marine origin. *Marine Drugs*, 9(5), 844-851. <https://doi.org/10.3390/md9050844>
- Sicuia, O., Constantinescu, F., & Cornea, C. P. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters*, 20, 10737-10750.
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G.-H., & Sa, T. (2010). Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(11), 1577-1584. <https://doi.org/10.4014/jmb.1007.07011>

- Sieber, S. A., & Marahiel, M. A. (2003). Learning from nature's drug factories : Nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7036-7043. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7036-7043.2003>
- Singh, M., Srivastava, M., Kumar, A., Singh, A. K., & Pandey, K. D. (2020). 4—Endophytic bacteria in plant disease management. In A. Kumar & V. K. Singh (Éds.), *Microbial Endophytes* (p. 61-89). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818734-0.00004-8>
- Singh, P., & Cameotra, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, 22(3), 142-146. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>
- Sirajuddin, S. A., & Sundram, S. (2020). Evaluation of two transformation protocols and screening of positive plasmid introduction into *Bacillus cereus* EB2, a gram-positive bacterium using qualitative analyses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 919-929. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00241-0>
- Smith, E. F., & Townsend, C. O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science (New York, N.Y.)*, 25(643), 671-673. <https://doi.org/10.1126/science.25.643.671>
- Sohn, M.-J., Zheng, C.-J., & Kim, W.-G. (2008). Macrolactin S, a new antibacterial agent with FabG-inhibitory activity from *Bacillus* sp. AT28. *The Journal of Antibiotics*, 61(11), 687-691. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.98>
- Sopheareth, M., Chan, S., Naing, K. W., Lee, Y. S., Hyun, H. N., Kim, Y. C., & Kim, K. Y. (2013). Biocontrol of late blight (*Phytophthora capsici*) disease and growth promotion of pepper by *Burkholderia cepacia* MPC-7. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 67-76. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2012.0114>
- Stachelhaus, T., & Marahiel, M. A. (1995). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 125(1), 3-14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07328.x>
- Stachelhaus, T., & Walsh, C. T. (2000). Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, 39(19), 5775-5787. <https://doi.org/10.1021/bi9929002>
- Staunton, J., & Weissman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis : A millennium review. *Natural Product Reports*, 18(4), 380-416. <https://doi.org/10.1039/a909079g>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics : Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Stinear, T. P., Mve-Obiang, A., Small, P. L. C., Frigui, W., Pryor, M. J., Brosch, R., Jenkin, G. A., Johnson, P. D. R., Davies, J. K., Lee, R. E., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S. F., Leadlay, P. F., & Cole, S. T. (2004). Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5), 1345-1349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305877101>

- Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E., & Yuan, Z.-C. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>
- Sui, X., Han, X., Cao, J., Li, Y., Yuan, Y., Gou, J., Zheng, Y., Meng, C., & Zhang, C. (2022). Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* EM-1 associated with suppressive rhizosphere soil microbes against tobacco bacterial wilt. *Frontiers in Microbiology*, 13, 940156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.940156>
- Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., & Visessanguan, W. (2010). *Bacillus siamensis* sp. Nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2364-2370. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.018879-0>
- Sun, F.-H., Luo, D., Shu, D., Zhong, J., & Tan, H. (2014). Development of an intergeneric conjugal transfer system for xinaomycins-producing *Streptomyces noursei* Xinao-4. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms150712217>
- Suzuki, H. (2012). Host-mimicking strategies in DNA methylation for improved bacterial transformation. In *Methylation—From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/51691>

## T

- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin : An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157-170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
- Tareq, F. S., Kim, J. H., Lee, M. A., Lee, H.-S., Lee, J.-S., Lee, Y.-J., & Shin, H. J. (2013). Antimicrobial gageomacrolactins characterized from the fermentation of the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis* under optimum growth conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(14), 3428-3434. <https://doi.org/10.1021/jf4009229>
- Théâtre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., Medema, M. H., Léonard, A., Lins, L., Arabolaza, A., Gramajo, H., Gross, H., & Jacques, P. (2021). The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp. : Natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.623701>
- Tian, H., Liu, B., Yang, J., Zhou, C., Xu, X., Zhang, Y., Lu, Z., & Zhang, W. (2021). Genetic transformation system for *Bacillus velezensis* NSZ-YBGJ001 and curing of the endogenous plasmid pBV01. *Biotechnology Letters*, 43(8), 1595-1605. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03127-9>
- Tomino, S., Yamada, M., Itoh, H., & Kurahashi, K. (1967). Cell-Free Synthesis of Gramicidin S\*. *Biochemistry*, 6(8), 2552-2560. <https://doi.org/10.1021/bi00860a037>

- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(5), 1151-1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Tran, P. N., Yen, M.-R., Chiang, C.-Y., Lin, H.-C., & Chen, P.-Y. (2019). Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(8), 3277-3287. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09708-z>
- Trinh, T., Vân, Đ., Liên, N., Lương, Đ., & Hop, D. (2018). Potential application on preparation for bio-fertilizer using *Bacillus velezensis* strains isolated from various regions in Vietnam. *Vietnam Journal of Biotechnology*, *15*, 169-179. <https://doi.org/10.15625/1811-4989/15/1/12332>
- Tsai, S.-C. (Sheryl), & Ames, B. D. (2009). Structural enzymology of polyketide synthases. *Methods in enzymology*, *459*, 17-47. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04602-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04602-3)
- Tsalgatidou, P. C., Thomloui, E.-E., Baira, E., Papadimitriou, K., Skagia, A., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2022). Integrated genomic and metabolomic analysis illuminates key secreted metabolites produced by the novel endophyte *Bacillus halotolerans* Cal.1.30 involved in diverse biological control activities. *Microorganisms*, *10*(2), 399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020399>
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2007). *Agrobacterium : From Biology to Biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Tzfira, T., Hohn, B., & Gelvin, S. B. (2017). Transfer of genetic information from *Agrobacterium* to plants☆. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.07278-2>

## U

- Ur Rehman, F., Naz, N., & Kalsoom, M. (2021). *Plant diseases and food security : An Overview*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35480.52487>

## V

- Vaishnav, P., & Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, *29*(2), 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006>
- van de Donk, N. W. C. J., Kamphuis, M. M. J., Lokhorst, H. M., & Bloem, A. C. (2002). The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia*, *16*(7), 1362-1371. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402501>
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Jung, G. (1986). Fengycin—A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The Journal of Antibiotics*, *39*(7), 888-901. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>

- Vassaux, A., Rannou, M., Peers, S., Daboudet, T., Jacques, P., & Coutte, F. (2021). Impact of the purification process on the spray-drying performances of the three families of lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 815337. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.815337>
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from *Petroleum Sludge*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6210-6219. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(5), 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Volpon, L., Tsan, P., Majer, Z., Vass, E., Hollósi, M., Noguéra, V., Lancelin, J.-M., & Besson, F. (2007). NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of l-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *67*(5), 1374-1381. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.10.027>

## W

- Wang, J., Qiu, J., Yang, X., Yang, J., Zhao, S., Zhou, Q., & Chen, L. (2022). Identification of Lipopeptide Iturin A Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 and Its Antifungal Activities against *Fusarium oxysporum* f. Sp. Niveum. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(19), 2996. <https://doi.org/10.3390/foods11192996>
- Wang, J., Zhang, R., Chen, X., Sun, X., Yan, Y., Shen, X., & Yuan, Q. (2020). Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. *Microbial Cell Factories*, *19*(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01367-4>
- Wang, Y., Zhang, C., Liang, J., Wang, L., Gao, W., Jiang, J., & Chang, R. (2020). Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(17), 7467-7481. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10773-y>
- Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M. A., & Holak, T. A. (2000). Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure (London, England: 1993)*, *8*(4), 407-418. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00120-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00120-9)
- Weissman, K. J. (2009). Chapter 1 Introduction to polyketide biosynthesis. In *Methods in Enzymology* (Vol. 459, p. 3-16). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04601-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04601-1)
- Weissman, K. J. (2015). The structural biology of biosynthetic megaenzymes. *Nature Chemical Biology*, *11*(9), 660-670. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1883>
- Weissman, K. J. (2017). Polyketide stereocontrol : A study in chemical biology. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *13*(1), 348-371. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.39>

- Wekesa, T. B., Wekesa, V. W., Onguso, J. M., Wafula, E. N., & Kavesu, N. (2022). Isolation and characterization of *Bacillus velezensis* from lake bogoria as a potential biocontrol of *Fusarium solani* in *Phaseolus vulgaris* L. *Bacteria*, 1(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/bacteria1040021>
- W. Hamley, I. (2015). Lipopeptides : From self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications*, 51(41), 8574-8583. <https://doi.org/10.1039/C5CC01535A>
- Wibberg, D., Blom, J., Jaenicke, S., Kollin, F., Rupp, O., Scharf, B., Schneiker-Bekel, S., Sczcepanowski, R., Goesmann, A., Setubal, J. C., Schmitt, R., Pühler, A., & Schlüter, A. (2011). Complete genome sequencing of *Agrobacterium* sp. H13-3, the former *Rhizobium lupini* H13-3, reveals a tripartite genome consisting of a circular and a linear chromosome and an accessory plasmid but lacking a tumor-inducing Ti-plasmid. *Journal of Biotechnology*, 155(1), 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.010>
- Wilson, K. E., Flor, J. E., Schwartz, R. E., Joshua, H., Smith, J. L., Pelak, B. A., Liesch, J. M., & Hensens, O. D. (1987). Difficidin and oxydifficidin : Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization. *The Journal of Antibiotics*, 40(12), 1682-1691. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1682>
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 31(5), 560-567. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Xie, S., Zang, H., Borriss, R., & Gao, X. (2014). Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7512-7520. <https://doi.org/10.1128/AEM.02605-14>
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., & Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 5, 12975. <https://doi.org/10.1038/srep12975>
- Wu, T., Xiao, F., & Li, W. (2021). Macrolactins : Biological activity and biosynthesis. *Marine Life Science & Technology*, 3(1), 62-68. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00068-6>
- Wu, Y.-S., Ngai, S.-C., Goh, B.-H., Chan, K.-G., Lee, L.-H., & Chuah, L.-H. (2017). Anticancer activities of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00761>

## X

- Xia, B., Luo, M., Pang, L., Liu, X., & Yi, Y. (2021). Lipopeptides against COVID-19 RNA-dependent RNA polymerase using molecular docking. *Biomedical Journal*, 44(6 Suppl 1), S15-S24. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.11.010>

- Xin, Q., Chen, Y., Chen, Q., Wang, B., & Pan, L. (2022). Development and application of a fast and efficient CRISPR-based genetic toolkit in *Bacillus amyloliquefaciens* LB1ba02. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01832-2>
- Xin, Q., Wang, B., & Pan, L. (2022). Development and application of a CRISPR-dCpf1 assisted multiplex gene regulation system in *Bacillus amyloliquefaciens* LB1ba02. *Microbiological Research*, 263, 127131. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127131>
- Xu, B.-H., Lu, Y.-Q., Ye, Z.-W., Zheng, Q.-W., Wei, T., Lin, J.-F., & Guo, L.-Q. (2018). Genomics-guided discovery and structure identification of cyclic lipopeptides from the *Bacillus siamensis* JFL15. *PLoS ONE*, 13(8), e0202893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202893>
- Xu, T., Chen, J., Mitra, R., Lin, L., Xie, Z., Chen, G.-Q., Xiang, H., & Han, J. (2022). Deficiency of exopolysaccharides and O-antigen makes *Halomonas bluephagenesis* self-flocculating and amenable to electrotransformation. *Communications Biology*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03570-y>
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., & Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 808-815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>
- Xue, C., Tian, L., Xu, M., Deng, Z., & Lin, W. (2008). A new 24-membered lactone and a new polyene delta-lactone from the marine bacterium *Bacillus marinus*. *The Journal of Antibiotics*, 61(11), 668-674. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.94>

## Y

- Yan, H., Qiu, Y., Yang, S., Wang, Y., Wang, K., Jiang, L., & Wang, H. (2021). Antagonistic activity of *Bacillus velezensis* SDTB038 against *Phytophthora infestans* in Potato. *Plant Disease*, 105(6), 1738-1747. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1666-RE>
- Yan, J., Li, Y., Han, X. Z., Chen, W. F., Zou, W. X., Xie, Z., & Li, M. (2017). *Agrobacterium deltaense* sp. Nov., an endophytic bacteria isolated from nodule of *Sesbania cannabina*. *Archives of Microbiology*, 199(7), 1003-1009. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1367-0>
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>
- Yuan, J., Li, B., Zhang, N., Waseem, R., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 2976-2981. <https://doi.org/10.1021/jf204868z>
- Yuan, J., Zhao, M., Li, R., Huang, Q., Rensing, C., Raza, W., & Shen, Q. (2016). Antibacterial compounds-macrolactin alters the soil bacterial community and abundance of the gene encoding PKS. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01904>

## Z

- Zahradník, J., Nunvar, J., Pařízková, H., Kolářová, L., Palyzová, A., Marešová, H., Grulich, M., Kyslíková, E., & Kyslík, P. (2018). *Agrobacterium bohemicum* sp. Nov. Isolated from poppy seed wastes in central Bohemia. *Systematic and Applied Microbiology*, *41*(3), 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.01.003>
- Zhang, G., Bao, P., Zhang, Y., Deng, A., Chen, N., & Wen, T. (2011). Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing. *Analytical Biochemistry*, *409*(1), 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.10.013>
- Zhang, L., & Sun, C. (2018). Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus magnaporthe grisea by Inducing Reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(18), e00445-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>
- Zhang, Z., Ding, Z.-T., Shu, D., Luo, D., & Tan, H. (2015). Development of an efficient electroporation method for iturin a-producing *Bacillus subtilis* ZK. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms16047334>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(15), 5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zheng, C.-J., Lee, S., Lee, C.-H., & Kim, W.-G. (2007). Macrolactins O-R, glycosylated 24-membered lactones from *Bacillus* sp. AH159-1. *Journal of Natural Products*, *70*(10), 1632-1635. <https://doi.org/10.1021/np0701327>
- Zhou, D., Hu, F., Lin, J., Wang, W., & Li, S. (2019). Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to d-/l-leucine. *MicrobiologyOpen*, *8*(8), e00794. <https://doi.org/10.1002/mbo3.794>
- Zhu, Y., Sun, D., Deng, Y., An, G., Li, W., Si, W., Liu, J., & Sun, X. (2020). Comparative transcriptome analysis of the effect of different heat shock periods on the unfertilized ovule in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Journal of Integrative Agriculture*, *19*(2), 528-540. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62777-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62777-2)
- Zimmerman, S. B., Schwartz, C. D., Monaghan, R. L., Pelak, B. A., Weissberger, B., Gilfillan, E. C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S. A., Tejera, E., & Stapley, E. O. (1987). Difficidin and oxydifficidin : Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics*, *40*(12), 1677-1681. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1677>

